

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija N. Todosijević

**FORMULACIJA, FIZIČKO-HEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA ISPITIVANJA
BIOKOMPATIBILNIH MIKROEMULZIJA ZA
DERMALNU I TRANSDERMALNU ISPORUKU
ACEKLOFENAKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija N. Todosijević

**FORMULATION, PHYSICO-CHEMICAL
CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL
TESTING OF BIOCOMPATIBLE
MICROEMULSIONS FOR DERMAL AND
TRANSDERMAL DELIVERY OF ACECLOFENAC**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor

Dr Snežana Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Mirjana Gašperlin, redovni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

U Beogradu, _____

Izrada ove doktorske disertacije realizovana je u okviru projekta TR34031 „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju”, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru ove doktorske disertacije prof. dr Snežani Savić za nesebičnu pomoć, stalnu motivaciju, i bezrezervnu podršku. Njeno znanje i stručnost su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije, a visoki moralni principi su bili dodatni podstrek da uspešno prevaziđem sve prepreke na koje sam nailazila.

Želim posebno da istaknem doprinos, i da se zahvalim prof. dr Miroslavu Saviću na bezrezervnom ličnom angažovanju, na svesrdnoj pomoći u svakoj fazi izrade ove doktorske disertacije, optimizmu i velikoj podršci tokom eksperimentalnog rada. Profesoru dugujem ogromnu zahvalnost što mi je preneo svoj istraživački duh i optimizam, ali i naučna i etička načela.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Nebojši Cekiću za uvođenje u oblast mikroemulzija, na strpljenju u početnim fazama rada i uloženom trudu u toku pripreme publikacija.

Zahvaljujem se prof. dr Mirjani Gašperlin na pruženoj prilici za rad na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani.

Veliki doprinos ovoj disertaciji dali su prof. dr Reinhard Neubert i prof. dr Gerald Brezesinski, kao i njihovi timovi, kojima se najiskrenije zahvaljujem na ukazanoj prilici da deo eksperimenata uradim na Institutu za farmaciju, Martin Luter Univerziteta, Halle (Saale) i Maks Plank Institutu u Potsdamu, kao i na korisnim savetima u toku eksperimentalnog rada i pripreme publikacija.

Zahvalnost dugujem i dr Danijeli Randelović sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu na saradnji i pomoći u mikrografskoj analizi uzoraka.

Takođe, zahvaljujem se i kolegama iz Grčke, sa Instituta za biologiju, medicinsku hemiju i biotehnologiju, na korisnim savetima i pomoći u analizi uzoraka.

Želim da se zahvalim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju i Katedre za farmaceutsku hemiju na podršci, pomoći i razumevanju tokom zajedničkog rada, i timu sa Katedre za farmakologiju na entuzijazmu, zajedničkim idejama, timskom duhu i odličnoj radnoj atmosferi.

Najveću zahvalnost dugujem porodici, roditeljima i sestri, koji su mi bili najveći oslonac i čije su razumevanje, podrška i ljubav najlepša inspiracija da istrajem u teškim momentima. Hvala im na beskrajnoj ljubavi, sigurnosti, i motivaciji koju mi konstantno pružaju.

Formulacija, fizičko-hemijska karakterizacija i biološka ispitivanja biokompatibilnih mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku aceklofenaka

Sažetak

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) su heterogena grupa lekovitih supstanci sa antiinflamatornim, antipiretičkim i analgetskim delovanjem. Iako postoji više od 50 različitih NSAIL na svetskom tržištu, stalno istraživanje i razvoj novih lekovitih supstanci ove terapijske grupe je posledica njihovog nepovoljnog farmakokinetičkog profila (npr. kratko poluvreme eliminacije) i/ili ispoljavanja neželjenih efekata (npr. na nivou gastrointestinalnog trakta). Aceklofenak je indikovano za oralnu primenu u terapiji reumatoidnih bolesti, kao i u terapiji drugih upalnih i bolnih stanja. I pored prednosti u odnosu na ostale lekovite supstance iz ove grupe, hronična oralna primena aceklofenaka može dovesti do pojave neželjenih efekata koji su karakteristični i za ostale NSAIL, te se nameće potreba za prevazilaženjem ovih problema primenom farmaceutsko-tehnoloških pristupa i/ili drugim putem primene. Jedan od načina za smanjenje neželjenih efekata i zaobilaženje metabolizma prvog prolaza je lokalna primena aceklofenaka u terapiji reumatoidnih bolesti.

Da bi koncentracija lokalno primenjenog aceklofenaka bila dovoljna za ispoljavanje kliničkog efekta, neophodno je prevazići *stratum corneum*, primarnu barijeru za difuziju lekovitih supstanci u kožu. Koloidni nosači tipa mikroemulzija su perspektivni nosači lekovitih supstanci, čijom se primenom može poboljšati dermalna/transdermalna isporuka, a time i lokalna i/ili sistemska raspoloživost. Sa druge strane, neophodno je posvetiti posebnu pažnju izboru ekscipijenasa, kako sa aspekta bezbednosti/iritacije, tako i sa aspekta njihovog potencijalnog uticaja na dermalnu/transdermalnu isporuku lekovite supstance. Saharozni estri su nejonski surfaktanti, a njihove osobine poput biokompatibilnosti, biodegradabilnosti, niskog rizika da dovedu do iritacije, i potencijala da deluju kao pojačivači penetracije, predstavljaju značajne prednosti ovih surfaktanata u odnosu na tradicionalno korišćene, sintetske, etoksilovane surfaktante.

Imajući to u vidu, osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije predstavlja proučavanje molekularnih mehanizama kojima saharozni estri, sa različitom dužinom

lipofilnog lanca, povećavaju penetraciju lekovitih supstanci. Pored toga, cilj je bio i da se razviju biokompatibilne, nejonske mikroemulzije na bazi saharoznih estara, kao potencijalni nosači za dermalnu i/ili transdermalnu isporuku aceklofenaka, kao i poredenje fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, bezbednosnih i (dermato)farmakokinetičkih karakteristika formulisanih mikroemulzija na bazi saharoznih estara sa nejonskim mikroemulzijama na bazi etoksilovanih nejonskih surfaktanata.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da saharozni estri povećavaju fluidnost lipida *stratum corneum*-a, te samim tim mogu da povećaju dermalnu/transdermalnu isporuku lipofilnih lekovitih supstanci kroz interkorneocitni put površinskih slojeva kože. Takođe, rezultati ukazuju da su uspešno razvijene biokompatibilne, nejonske mikroemulzije na bazi saharoznih estara, sa bikontinuiranom strukturom. Aceklofenak je, kao površinski aktivan molekul sa svoja dva aromatična prstena, lokalizovan u delu međupovršinskog filma bikontinuiranih mikroemulzija koji se nalazi u blizini ugljovodoničnih lanaca saharoznih estara, dok je njegova hidrofilna glava lokalizovana u blizini saharoznog dela molekula surfaktanta. Konačno, prednost mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije na bazi etoksilovanih nejonskih surfaktanata je višestruka: pored bolje podnošljivosti, tj. boljeg bezbednosnog profila, postiže se veći stepen i brzina oslobađanja, i dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka iz mikroemulzija na bazi saharoznih estara.

Iako rezultati ove doktorske disertacije nedvosmisleno ukazuju na višestruku prednost mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije na bazi etoksilovanih surfaktanata, neophodna su dalja istraživanja kako bi se ispitala sudbina aceklofenaka nakon penetracije kroz *stratum corneum* i potvrdila efikasnost ovih formulacija na različitim animalnim modelima.

Ključne reči: aceklofenak, saharozni estri, mikroemulzije, dermalna isporuka, transdermalna isporuka, penetracioni inhenseri

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.276:615.07 (043.3)

Formulation, physico-chemical characterization and biological testing of biocompatible microemulsions for dermal and transdermal delivery of aceclofenac

Abstract

Despite the diversity of the chemical structures, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) share the same activity, such as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory. Interestingly, there are more than 50 different NSAIDs on the global market – the continuous research and development of new active substances from this therapeutic group is related to their unfavourable pharmacokinetic properties (e.g. short half-life) or is associated with a broad spectrum of adverse reactions (e.g. gastrointestinal side effects). Aceclofenac is indicated in the therapy of rheumatoid diseases, as well as in the symptomatic therapy of pain and inflammation. Although effective and relatively safe, chronic oral aceclofenac administration may cause systemic side effects typical of other NSAIDs, which warrants the search for a new route of its administration and/or implementation of pharmaceutical-technological approaches in the therapy of musculoskeletal disorders, in order to decrease the incidence of adverse reactions, as well as to avoid the first-pass metabolism.

The crucial step during any topical NSAID therapy is the ability of drug to overcome the outermost layer of the skin – *stratum corneum*, as a critical barrier for penetration of an active through the skin in sufficiently high amount to exert its clinical effect. Microemulsions are colloidal systems that are currently of pharmaceutical interest as promising vehicles which can improve dermal/transdermal drug delivery, and thus, its local/systemic bioavailability. However, the choice of excipient is one of the key factors in preformulation studies, due to their potential influence on skin tolerability, as well as their ability to act as penetration enhancers. Described as very mild and nonirritant with regard to dermatological properties, sucrose esters are of growing research interest, with promising features of low skin sensitization potential and enhancing skin penetration effect, as well as with a high environmental compatibility, all of which may be distinct advantages when compared to traditionally used synthetic ethoxylated surfactants.

Bearing that in mind, the main aims of this doctoral dissertation were to discover the molecular mechanisms by which sucrose esters, having different alkyl chains, act as penetration enhancers, and to develop biocompatible, nonionic microemulsions, based on sucrose esters, as advanced colloidal carriers for dermal and/or transdermal aceclofenac delivery. Additionally, the aim of this thesis was to compare their physico-chemical and biopharmaceutical properties, as well as their skin tolerability and ability for dermal/transdermal aceclofenac delivery with those of non-ionic microemulsion based on the synthetic ethoxylated surfactant.

This thesis revealed the fundamental mechanisms which define the penetration enhancing effect of sucrose esters, leading to the conclusion that these surfactants act as penetration enhancers, by increasing fluidity of *stratum corneum* lipids, thereby promoting dermal/transdermal delivery of lipophilic drugs through the hydrocarbon regions in the intercorneocyte space of the uppermost skin layer. Moreover, the results of this thesis indicate that bicontinuous sucrose ester-based microemulsions for topical aceclofenac application were successfully developed. Aceclofenac, with two aromatic rings, was mainly solubilized in the interfacial film of the bicontinuous microemulsions, close to lipid chains of surfactant, whereas its polar head group was localized in the region of sucrose groups of surfactants. Eventually, the sucrose ester-based microemulsions appeared to be superior over the microemulsion based on ethoxylated surfactant – besides better skin tolerability, the presence of sucrose esters improved the rate and extent of release and penetration/absorption of the drug.

Despite the promising results, such an enhanced topical delivery needs to be further tracked by assessing attainable concentrations of aceclofenac in musculoskeletal tissues as well as by proving its effectiveness in different animal models of inflammation.

Key words: aceclofenac, sucrose ester, microemulsion, dermal delivery, transdermal delivery, penetration enhancer

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.276:615.07 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)	2
1.1.1. Selektivnost za izoenzime COX-1 i COX-2	3
1.1.2. Neželjene reakcije i topikalna primena NSAIL	4
1.1.3. Preporuke za lečenje reumatoidnih bolesti	7
1.1.3.1. <i>Reumatoidni artritis</i>	7
1.1.3.2. <i>Osteoartritis</i>	8
1.1.3.3. <i>Ankilozirajući spondilitis</i>	8
1.1.3.4. <i>Preporuke za lečenje hroničnog bola skeletno-mišićnog sistema</i>	8
1.1.3.5. <i>Preporuke za lečenje akutnog bola skeletno-mišićnog sistema</i>	8
1.1.4. Budućnost u terapiji bolesti skeletno-mišićnog sistema	9
1.1.5. Aceklofenak	9
1.1.5.1. <i>Mehanizam delovanja aceklofenaka</i>	10
1.1.5.2. <i>Neželjene reakcije</i>	12
1.1.5.3. <i>Terapijska efikasnost aceklofenaka</i>	12
1.1.5.3.1. <i>Reumatoidni artritis</i>	12
1.1.5.3.2. <i>Osteoartritis</i>	12
1.1.5.3.3. <i>Ankilozirajući spondilitis</i>	12
1.1.5.3.4. <i>Analgetska aktivnost</i>	12
1.1.5.4. <i>Budućnost aceklofenaka kao lekovite supstance u terapiji i kontroli bola kod reumatoidnih bolesti</i>	13
1.1.5.5. <i>Ograničenja u formulaciji farmaceutskih oblika sa aceklofenakom</i>	13
1.2. Koža – dermalna/transdermalna isporuka NSAIL	17
1.2.1. Ciljevi dermalne/transdermalne isporuke	19
1.2.1.1. <i>Uticaj fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance na penetraciju/permeaciju supstanci</i>	19
1.2.1.2. <i>Uticaj fizičko-hemijskih osobina nosača na penetraciju/permeaciju supstanci</i>	20
1.2.2. Povećanje dermalne/transdermalne isporuke lokalno primenjenih lekovitih supstanci	22
1.3. Mikroemulzije kao potencijalni nosači za lokalnu primenu NSAIL	23
1.3.1. Teorija nastanka mikroemulzija – termodinamička stabilnost	25
1.3.2. Kinetička stabilnost	26

1.3.3.	Dinamički karakter nanostrukture mikroemulzija	27
1.3.4.	Studije faznog ponašanja i metodologija faznih dijagrama	29
1.3.5.	Kritična uloga surfaktanta (i kosurfaktanta)	32
1.3.6.	Potencijal mikroemulzija da povećaju penetraciju lekovite supstance u/kroz kožu	34
1.3.7.	Potencijal mikroemulzija za dermalnu/transdermalnu isporuku NSAIL	36
1.4.	Nejonski surfaktanti u formulaciji mikroemulzija	38
1.4.1.	Etoksilovani surfaktanti.....	40
1.4.2.	Polihidroksilni surfaktanti.....	41
1.4.3.	Potencijal za povećanje penetracije u/kroz kožu lekovitih supstanci primenom surfaktanta	45
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	53
2.1.	Cilj prve faze eksperimentalnog rada	54
2.2.	Cilj druge faze eksperimentalnog rada	54
2.3.	Cilj treće faze eksperimentalnog rada	55
2.4.	Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada	55
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	56
3.1.	Materijali	57
3.2.	Metode	58
3.2.1.	Prva faza eksperimentalnog rada	58
3.2.1.1.	Langmuir-ov monosloj i fazni prelazi.....	58
3.2.1.2.	Infracrvena refleksiono-apsorpciona spektroskopija (IRRAS)	59
3.2.1.3.	Brewster-ova ugaona mikroskopija (BAM)	60
3.2.2.	Druga faza eksperimentalnog rada	61
3.2.2.1.	Konstruisanje pseudo-ternarnih faznih dijagrama	62
3.2.2.2.	Primena D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše za predviđanje granica mikroemulzione oblasti	62
3.2.2.3.	Polarizaciona mikroskopija	65
3.2.2.4.	Ispitivanje rastvorljivosti saharoznih estara u vodenoj i uljanoj fazi mikroemulzija.....	66
3.2.2.5.	Merenje električne provodljivosti.....	66
3.2.2.6.	Reološka ispitivanja	67
3.2.2.7.	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	67
3.2.2.8.	Mikroskopija atomskih sila (AFM).....	67
3.2.3.	Treća faza eksperimentalnog rada	68

3.2.3.1.	<i>Ispitivanje rastvorljivosti aceklofenaka u komponentama mikroemulzija</i> ...	68
3.2.3.2.	<i>Odabir formulacija za fizičko-hemijsku karakterizaciju i ispitivanje solubilizacionog kapaciteta za aceklofenak</i>	69
3.2.3.2.1.	<i>Ispitivanje solubilizacionog kapaciteta za aceklofenak duž odabrane linije razblaženja u pseudo-ternarnom faznom dijagramu</i>	69
3.2.3.2.2.	<i>Izrada optimalnih mikroemulzija sa i bez aceklofenaka</i>	70
3.2.3.3.	<i>Polarizaciona mikroskopija</i>	70
3.2.3.4.	<i>Merenje pH vrednosti</i>	70
3.2.3.5.	<i>Merenje električne provodljivosti</i>	70
3.2.3.6.	<i>Reološka merenja</i>	71
3.2.3.7.	<i>Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)</i>	71
3.2.3.8.	<i>Termogravimetrijska analiza (TGA)</i>	71
3.2.3.9.	<i>Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija)</i>	71
3.2.3.10.	<i>Mikroskopija atomskih sila (AFM)</i>	72
3.2.3.11.	<i>Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje lokalizacije aceklofenaka u odabranim mikroemulzijama</i>	72
3.2.3.11.1.	<i>Ispitivanje faznog ponašanja aceklofenaka i interakcije sa saharoznim estrima na međufazi voda/vazduh</i>	72
3.2.3.11.2.	<i>Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) – ispitivanje interakcije aceklofenaka sa saharoznim estrima na međufazi mikroemulzija</i>	73
3.2.4.	Četvrta faza eksperimentalnog rada	76
3.2.4.1.	<i>In vitro ispitivanje brzine oslobađanja aceklofenaka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija</i>	76
3.2.4.2.	<i>In vitro procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija – test iritacije na horioalantoinskoj membrani inkubiranih kokošijih jaja (engl. Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane, HET-CAM test)</i>	77
3.2.4.3.	<i>In vivo procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija</i>	78
3.2.4.4.	<i>In vivo ispitivanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka – metoda sa trakama (engl. tape stripping method)</i>	79
3.2.4.5.	<i>In vivo ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka iz izrađenih formulacija na pacovima Wistar soja</i>	80
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	83
4.1.	Rezultati i diskusija prve faze istraživanja	84
4.1.1.	π-A izoterme i kompresibilnost monosloja na međupovršini voda/vazduh ..	84
4.1.2.	Termodinamičko i fazno ponašanje smeša SC lipida i saharoznih estara	90

4.1.3.	IRRAS	99
4.1.4.	BAM	106
4.2.	Rezultati i diskusija druge faze istraživanja	113
4.2.1.	Konstruisanje pseudo-ternarnih faznih dijagrama – uticaj dužine ugljovodoničnog lanca na formiranje mikroemulzija	113
4.2.2.	Primena D-optimalnog dizajna smeše u cilju predviđanja mikroemulzione oblasti za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda	117
4.2.3.	Indirektne metode karakterizacija koloidne strukture izabranih mikroemulzija	122
4.2.3.1.	<i>Električna provodljivost</i>	122
4.2.3.2.	<i>Reološka merenja</i>	126
4.2.3.3.	<i>Termalna analiza</i>	130
4.2.4.	Direktne metode karakterizacije koloidne strukture izabranih mikroemulzija	135
4.3.	Rezultati i diskusija treće faze istraživanja	138
4.3.1.	Solubilizacija aceklofenaka u mikroemulzionim sistemima zasnovanim na saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca	138
4.3.2.	Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje nanostrukture odabranih mikroemulzija	140
4.3.2.1.	<i>Merenje pH vrednosti, električne provodljivosti i reološka merenja</i>	141
4.3.2.2.	<i>Termalna analiza odabranih uzoraka mikroemulzija</i>	144
4.3.2.3.	<i>Morfološka analiza odabranih formulacija mikroemulzija</i>	148
4.3.3.	Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje lokalizacije aceklofenaka u odabranim mikroemulzijama	150
4.3.3.1.	<i>Fazno ponašanje saharoznih estara i aceklofenaka</i>	151
4.3.3.2.	<i>EPR kao efikasna tehnika za procenu lokalizacije aceklofenaka</i>	159
4.4.	Rezultati i diskusija četvrte faze istraživanja	162
4.4.1.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanja aceklofenaka primenom <i>Franz</i>-ovih difuzionih ćelija	162
4.4.2.	<i>In vitro</i> procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija – HET-CAM test	165
4.4.3.	<i>In vivo</i> procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija	166
4.4.4.	<i>In vivo</i> ispitivanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka – metoda sa trakama (engl. <i>tape stripping method</i>)	169
4.4.5.	<i>In vivo</i> ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka na pacovima <i>Wistar</i> soja	171

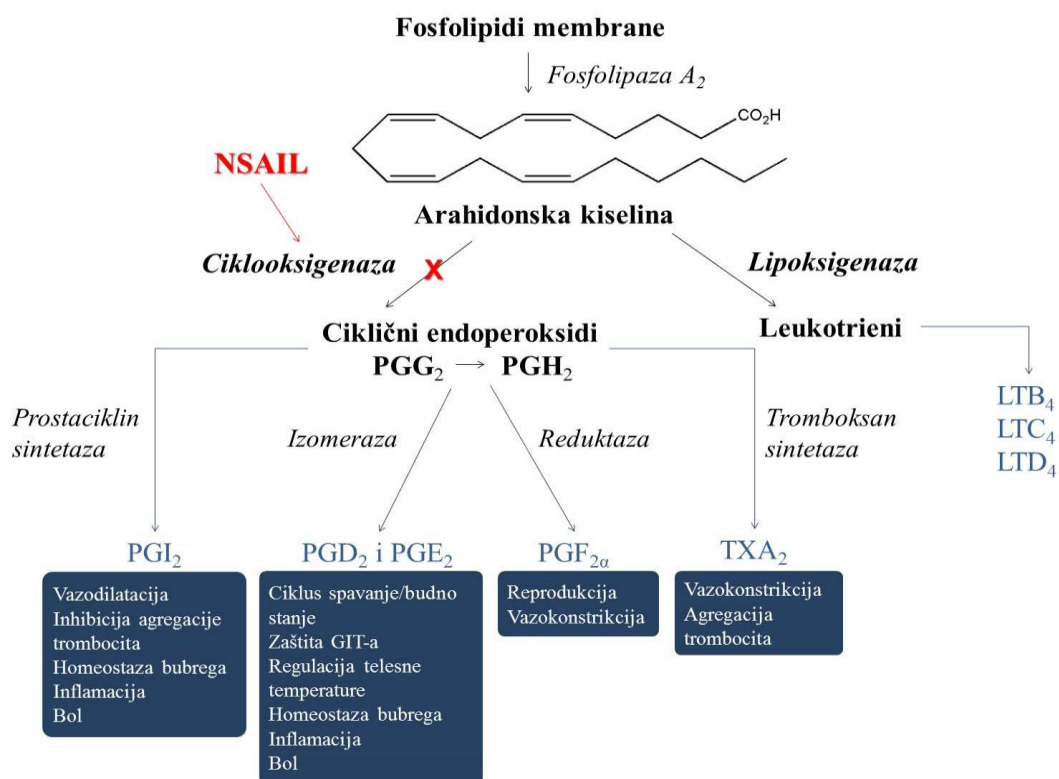
5. ZAKLJUČAK	176
5.1. Prva faza eksperimentalnog rada	177
5.2. Druga faza eksperimentalnog rada	180
5.3. Treća faza eksperimentalnog rada	182
5.4. Četvrta faza eksperimentalnog rada	184
5.5. Konačan osvrt i dalji koraci	186
6. LITERATURA	189
7. PRILOZI	206
7.1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije	207
7.2. Biografija autora	210

1. UVOD

Hronični bol je čest zdravstveni problem, prisutan kod više od četvrtine populacije u Evropi [1]. S obzirom da remeti obavljanje uobičajenih dnevnih aktivnosti, kao što su spavanje, socijalni život i radna produktivnost, hronični bol ima snažan uticaj na kvalitet života pacijenta. Postoje dve osnovne grupe lekova koje su indikovane u terapiji bola: i) nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) i ii) opioidni analgetici [1].

1.1. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)

NSAIL su indikovani u terapiji akutnog i hroničnog bola, u stanjima povišene telesne temperature, kao i u bolestima skeletno-mišićnog sistema, gde je u osnovi patološki proces inflamacije [1, 2]. Iako se u terapiji primenjuju još od 1898. godine, Vejn i saradnici su tek 1971. godine otkrili da mehanizam delovanja NSAIL potiče od inhibicije enzima ciklooksigenaza (COX) i posledično sinteze prostaglandina (PG). U literaturi se povremeno navode i drugi mehanizmi, poput inhibicije faktora nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor*, TNF- α) i inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS) [3], ali se u svakom slučaju ne može govoriti o drugim direktnim dejstvima karakterističnim za celu klasu NSAIL, mimo inhibicije COX.



Slika 1.1. Šematski prikaz mehanizma delovanja NSAIL (prilagođeno na osnovu reference [1]).

Katalitičkim dejstvom enzima fosfolipaza A₂ iz ćelijske membrane se oslobađa arahidonska kiselina, koja se delovanjem enzima COX ili lipooksigenaze dalje prevodi u različite medijatore (**Slika 1.1**) uključene u proces agregacije trombocita, inflamacije, bola i povišene telesne temperature [2, 4]. Takođe, PG (npr. PGI₂, PGE₂) su uključeni u senzitivizaciju aferentnih nocioceptivnih neurona, i time u bol koji je povezan sa inflamacijom. Periferna inflamacija je udružena sa ushodnom regulacijom COX i povećanjem nivoa PGE₂ u centralnom nervnom sistemu, što doprinosi centralnoj hiperalgeziji. Stoga, jasno je da je terapijska primena NSAIL vezana za njihovo analgetičko, antipiretičko i antiinflamatorno delovanje.

1.1.1. Selektivnost za izoenzime COX-1 i COX-2

NSAIL inhibiraju sintezu prostanoida kompetitivnom i prolaznom inhibicijom vezivanja arahidonske kiseline za aktivno mesto enzima COX [1]. Postoji nekoliko izoformi ovog enzima – COX-1 je izoenzim prisutan u većini ćelija, i ima ulogu u sintezi PG koji učestvuju u fiziološkim procesima. Nasuprot tome, izoenzim COX-2 je prisutan u patofiziološkim procesima, te je stoga uključen u sintezu inflamatornih PG. Međutim, treba imati u vidu da je ovaj izoenzim normalno prisutan u mozgu, kičmenoj moždini, bubrezima, uterusu, i nekim drugim organima [1, 2]. Kao što je već rečeno, 1971. godine je pokazano da enzim COX predstavlja ciljni molekul za delovanje NSAIL. Tek je u periodu od 1989. do 1992. godine otkriveno postojanje inducibilne forme enzima COX (COX-2) od strane tri nezavisne laboratorije [4]. COX-1 i COX-2 izoforma pokazuju 60% sličnosti u svojim aminokiselinskim sekvencama, a imaju različitu tkivnu raspodelu, kao i regulaciju genske ekspresije [2]. Izoforma COX-1 je prisutna u brojnim ćelijama i tkivima: u endotelu, monocitima, epitelu gastrointestinalnog trakta (GIT-a), bubrezima, i trombocitima, dok je COX-2 u normalnim uslovima prisutna u bubrezima, kardiovaskularnom sistemu i mozgu [5]. Tokom procesa inflamacije, ekspresija COX-2 je ushodno regulisana u ćelijama vaskularnog endotela, endotelnim ćelijama sinovije, monocitima i makrofagama. Povećan nivo COX-2 u procesu inflamacije odgovoran je za povećan nivo PGI₂ u endotelu koji dovodi do vazodilatacije [4]. Međutim, ne treba isključiti ulogu COX-1 u procesima bola i inflamacije – naime, postoje dokazi da je COX-1 ekspimirana zajedno sa izoformom COX-2 u cirkulišućim inflamatornim ćelijama i inflamiranim tkivima [1]. Treba imati u vidu da je terapijski efekat NSAIL najvećim delom posledica inhibicije

izoenzima COX-2 na mestu inflamacije, dok je najveći broj neželjenih efekata posledica inhibicije protektivnih efekata prostanoida sintetisanih izoformom COX-1 [1]. Inhibicija sinteze PGI₂ i PGE₂ je najvećim delom odgovorna za smanjenje simptoma inflamacije usled inhibicije vazodilatacije i bola [3].

Na osnovu izolacije uvijene informacione RNK (iRNK) enzima COX-1 prisutne u visokoj koncentraciji u srcu i kori velikog mozga kod pasa, 2002. godine je pretpostavljeno postojanje treće izoforme enzima (COX-3). Dok izoforme COX-1 i COX-2 pokazuju 81% homolognosti, COX-3 predstavlja uvijen oblik COX-1. Naime, iRNK od koje nastaje COX-3 protein, iako kodirana istim genom kao i COX-1, zadržava intron od 90 nukleotida, što dovodi do 30 novih aminokiselina prisutnih u molekulu COX-3 u odnosu na izoformu COX-1, koje su odgovorne za razlike u enzimskoj aktivnosti ove dve izoforme. I pored toga što je kodirana istim genom, COX-3 je farmakološki različita u odnosu na oba poznata izoenzima – COX-1 i COX-2 [3, 4]. Pokazano je da paracetamol selektivno inhibira COX-3 ali ne i COX-1 izoenzim [6]. Međutim, s obzirom da gen za COX-1 kodira i iRNK COX-3 izoforme, u literaturi se često za COX-3 može naći naziv COX-1b ili COX-1v [4, 6].

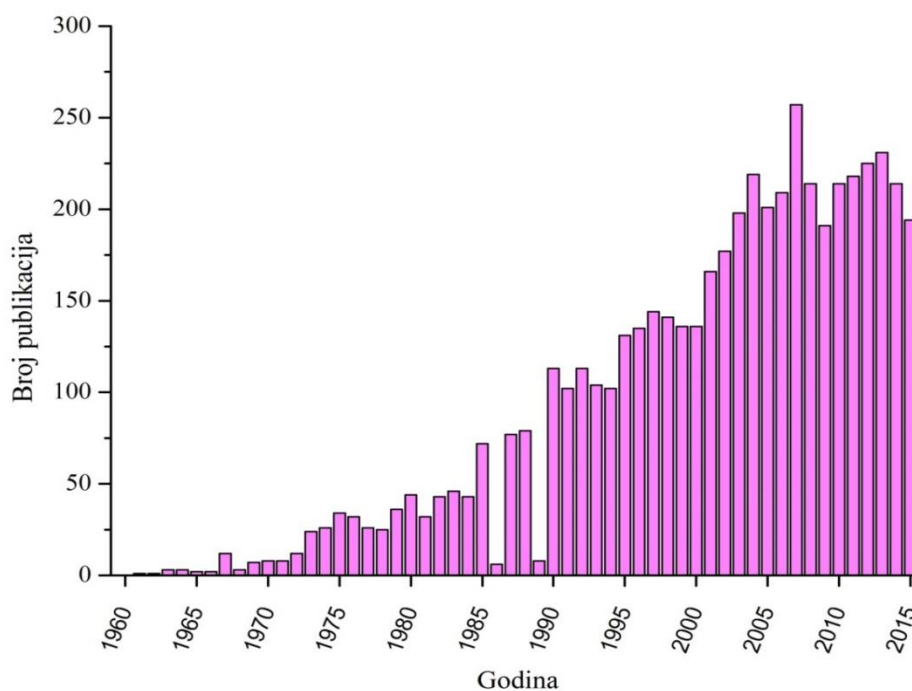
1.1.2. Neželjene reakcije i topikalna primena NSAIL

Dugotrajna primena NSAIL povećava rizik od smrtnog ishoda (npr. srčani udar), ozbiljnih neželjenih reakcija (oštećenje GIT-a, želudačne ulceracije), kao i pojave neželjenih reakcija na nivou bubrega, jetre i kardiovaskularnog sistema [3]. Od pomenutih, najčešći su neželjeni efekti u GIT-u, koji su posledica inhibicije konstitutivnog izoenzima COX-1. Ovi neželjeni efekti mogu biti blagi (dispepsija, nauzeja, abdominalni bol), ozbiljni (lezije tipa ulkusa) i potencijalno životno ugrožavajući (krvarenje, perforacija i opstrukcija). Naime, izoenzim COX-1 je eksprimiran duž GIT-a i odgovoran je za sintezu mukoznih PG koji imaju ulogu u povećanju protoka krvi kroz mukozu, sekreciji mukusa i bikarbonata. Kao posledica inhibicije ovog izoenzima može doći do oštećenja sluzokože GIT-a sa posledičnim komplikacijama. Dodatno, COX-2 može doprineti zarastanju lezija na nivou GIT-a, te samim tim i inhibicija ove izoforme enzima može imati značajnu ulogu u progresiji ulceracija [1]. Takođe, primena NSAIL je povezana sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih neželjenih efekata, uključujući hipertenziju i infarkt miokarda, pri

čemu treba imati u vidu da su ovi efekti dozno-zavisni. Smatra se da je kardiovaskularni rizik posledica inhibicije COX-2 i sinteze PGI₂, koji ima protektivnu ulogu u cirkulaciji time što izaziva vazodilataciju, inhibiciju aktivacije i agregacije trombocita i ćelijsku adheziju [1, 4].

Imajući u vidu sve pomenute neželjene efekte koji se vezuju za oralnu primenu NSAIL, lokalno primenjeni NSAIL indikovani su u terapiji akutnih i/ili hroničnih bolnih i inflamatornih stanja skeletno-mišićnog sistema, kao i u terapiji različitih sportskih povreda [7]. Naime, u terapiji reumatoidnih bolesti, odgovor na lekovite supstance ove terapijske grupe može značajno varirati – nijedan NSAIL ne može da se izdvoji u odnosu na druge u terapiji reumatoidnog artritisa i osteoartritisa [5]. Arbitrarno, kako bi se postigao terapijski efekat, stepen inhibicije enzima COX-2 treba da bude 80%. Međutim, problem u praksi predstavlja činjenica da se lekovi iz ove terapijske grupe neretko primenjuju u dozama koje su veće od optimalnih, a inhibicija COX-2 aktivnosti od preko 80% ne dovodi do povećanja efikasnosti – naprotiv, dolazi do povećanja neželjenih efekata. Takođe, treba imati u vidu da se pojedini NSAIL u apoteci izdaju bez lekarskog recepta, što može povećati rizik od pojave neželjenih efekata [8].

S obzirom na to da epidemiološki podaci pokazuju da hronična oralna primena NSAIL može da poveća rizik od akutne koronarne bolesti i, svakako, GIT neželjenih efekata, i pored velikih napora da se razviju novi NSAIL koji imaju bolji bezbednosni profil [1, 3], nameće se potreba za prevazilaženjem ovog problema primenom specifičnih farmaceutsko-tehnoloških pristupa. Jedan od načina predstavlja lokalna primena NSAIL, te i ne čudi sve veći broj istraživačkih radova koji razmatraju lokalnu primenu NSAIL u terapiji različitih bolnih i zapaljenjskih patoloških stanja (**Slika 1.2**).



Slika 1.2. Kumulativni broj publikacija o lokalno primenjenim NSAID od 1995. do 2015. godine (u skladu sa pretragom koja je izvedena na PubMed-u koristeći termin „topical NSAID“).

Uzimajući u obzir da je prvi lokalni NSAID (benzidamin) registrovan u Velikoj Britaniji još 1980. godine, jasno je da je koncept dermalne/transdermalne isporuke NSAID oduvek privlačio veliko interesovanje. U teoriji, lokalno primenjeni NSAID može da postigne visoke koncentracije u dubljim tkivima ispod mesta primena, uz izuzetno niske sistemske koncentracije. Ovo za posledicu ima potencijalne brojne koristi lokalne primene NSAID, a pre svega izbegavanje sistemskih neželjenih efekata i presistemskog metabolizma. Pored toga, s obzirom da je većina neželjenih efekata NSAID dozno-zavisna, na ovaj način mogu biti izbegnuti toksični efekti koji su posledica produženih nivoa NSAID u cirkulaciji (npr. akutna bubrežna insuficijencija). Takođe, lokalnom primenom NSAID mogu biti izbegnute lek-lek interakcije sa lekovima koji se u visokom stepenu vezuju za proteine plazme [7]. Najčešći neželjeni efekti nakon lokalne primene NSAID su reakcije na koži tipa pruritusa, koji se javlja u sličnom procentu kao i nakon oralne primene. Međutim, lokalno primenjeni NSAID imaju izuzetno nizak potencijal da izazovu ozbiljne neželjene efekte na nivou GIT-a, u odnosu na učestalost od 15% koja je zabeležena nakon oralne primene.

1.1.3. Preporuke za lečenje reumatoidnih bolesti

Iako je pokazano da svi NSAIL smanjuju nivo PGE₂, ostale potencijalne aktivnosti (smanjenje nivoa različitih citokina, efekat na normalne i obolele hondroците, aktivnost na sintezu matriksa hrskavice) zavise od vrste NSAIL, te su, samim tim, i odgovorne za različitu efikasnost lekova ove terapijske grupe u tretmanu reumatoidnih bolesti [9]. Klinički podaci o efikasnosti koji ukazuju na opravdanost lokalne primene NSAIL u terapiji reumatoidnih bolesti su oskudni, te stoga ovo polje predstavlja veliki interes za istraživače [7, 10]. Klinički podaci ukazuju da su u terapiji pojedinih hroničnih reumatoidnih bolesti lokalno primenjeni NSAIL efikasni bar kao oralni [7]. Američka agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je preparate sa diklofenakom za primenu na koži u terapiji osteoartritisa (diklofenak-natrijum, gel i diklofenak-natrijum, rastvor za kožu), dok je dermalni flaster sa diklofenak-epolaminom registrovan u terapiji povreda, ali ne i u terapiji osteoartritisa [10]. Svakako, treba imati i uvid u odnos cene i efikasnosti lokalno primenjenih NSAIL – iako naizgled skuplja terapija, u velikom broju slučajeva pacijenti sa reumatoidnim bolestima su hospitalizovani zbog GIT komplikacija izazvanih sistemskom primenom NSAIL, te stoga, troškovi sekundarnog lečenja neželjenih reakcija daju veliku prednost lokalno primenjenim NSAIL sa aspekta odnosa cena/efikasnost [7]. Mada se u istraživačkoj literaturi mogu pronaći različite indikacije za primenu NSAIL, u nastavku je dat pregled reumatoidnih bolesti, kao i pregled zvanično preporučenih lekova za njihovu terapiju.

1.1.3.1. Reumatoidni artritis

U referentnim izvorima se često mogu naći podaci da se NSAIL koriste u terapiji reumatoidnog artritisa, te da je ovo jedna od najznačajnijih indikacija za njihovu primenu, budući da ovi lekovi dovode do smanjenja bola, otoka, jutarnje ukočenosti, i povećanja pokretljivosti [5]. Ipak, Američki koledž za reumatologiju (engl. *American College of Rheumatology*, ACR) i Evropsko udruženje protiv reumatizma (engl. *European League Against Rheumatism*, EULAR) ne preporučuju ni oralne ni topikalne NSAIL u terapiji reumatoidnog artritisa [11, 12], već se terapija izbora zasniva na primeni antireumatika koji modifikuju bolest (metotreksat, leflunomid, sulfasalazin).

1.1.3.2. Osteoartritis

U skladu sa referentnim izvorima, NSAIL su indikovani i u terapiji osteoartritisa, gde primena leka ublažava ukočenost, bol prilikom pokreta, noćni bol, a takođe doprinosi i povećanju pokretljivosti [5]. Interesantno, vodič iz 2014. godine Međunarodnog istraživačkog društva osteoartritisa (engl. *Osteoarthritis Research Society International*, OARSI) [13], navodi da lokalno primenjeni NSAIL imaju uporedivu efikasnost kao oralni, uz značajno ređe neželjene efekte u terapiji osteoartritisa kod pacijenata kod kojih je zahvaćeno jedno koleno. Takođe, ACR [14] uslovno preporučuje i daje prednost lokalnim u odnosu na oralne NSAIL (za osobe starije od 75 godina), dok Američka akademija ortopedskih hirurga (engl. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, AAOS) [15] preporučuje (stepen preporuke: jak) i oralne i lokalne NSAIL. S druge strane, EULAR preporučuje NSAIL u terapiji osteoartritisa tek nakon neuspeha terapije paracetamolom [10, 16, 17].

1.1.3.3. Ankilozirajući spondilitis

Kada je reč o terapiji ankilozirajućeg spondilitisa, EULAR i ACR preporučuju NSAIL kao lekove prvog izbora kada su kod pacijenata prisutni bol i ukočenost, pri čemu se ne ističe razlika između oralnih i lokalnih NSAIL [18, 19].

1.1.3.4. Preporuke za lečenje hroničnog bola skeletno-mišićnog sistema

NSAIL predstavljaju lekove izbora ukoliko je prisutan hronični inflamatorni bol, udružen sa crvenilom i otokom, a koji se pojavljuje kod artritisa, tendinitisa i hroničnih infekcija [20]. Takođe, preporuke u slučaju povremenog ili bola srednjeg intenziteta, kao i u nekim slučajevima neuropatskog bola, usmerene su ka primeni NSAIL. Međutim, preporuke se zasnivaju na periodičnoj primeni NSAIL, pre nego na hroničnoj terapiji. Primena visokih doza, kao i dugotrajna primena, nosi veliki rizik od neželjenih efekata na nivou GIT-a, odnosno kardiovaskularnog sistema, usled primene COX-1, odnosno COX-2 selektivnih NSAIL. Lokalno primenjeni NSAIL mogu značajno ublažiti bol, naročito u predelu kolena ili šake [20].

1.1.3.5. Preporuke za lečenje akutnog bola skeletno-mišićnog sistema

Koes i saradnici su 2010. godine analizirali terapijske vodiče iz velikog broja zemalja širom sveta za terapiju akutnog bola skeletno-mišićnog sistema. Interesantno, u

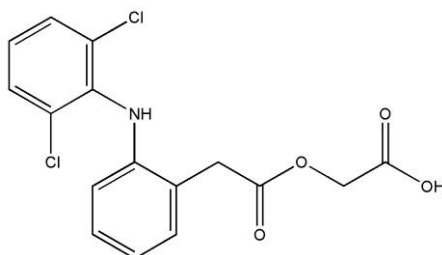
vodičima najvećeg broja zemalja ne navodi se odvojeno oralna i lokalna primena NSAID, dok se u nemačkom vodiču navodi da se za terapiju akutnog bola preporučuju ili oralni ili lokalno primenjeni NSAID. U Velikoj Britaniji se ne preporučuje lokalna primena NSAID [21].

1.1.4. Budućnost u terapiji bolesti skeletno-mišićnog sistema

2016. godine je publikovan izveštaj na osnovu sveobuhvatnog pregleda podataka o efikasnosti i bezbednosti lokalne primene NSAID sa najvećih istraživačkih baza podataka (*Cochrane Central Register of Controlled Trials* (CENTRAL), MEDLINE, EMBASE, i lične baze podataka autora). Na osnovu ovih studija, lokalna primena diklofenaka i ketoprofena nedvosmisleno je efikasna u smanjenju bola, dok su podaci za lokalnu primenu ostalih NSAID nedovoljni za donošenje konačnih zaključaka. Takođe, naučna literatura i kliničke studije ukazuju da su neželjene reakcije na lokalno primenjene NSAID prevashodno različite reakcije na koži, dok su sistemski neželjeni efekti nakon lokalne primene zanemarljivi. Autori su zaključili da se ovi rezultati i preporuke odnose primarno na pacijente sa osteoartritisom, dok za ostala stanja nema dovoljno podataka za donošenje konačnih zaključaka [22].

1.1.5. Aceklofenak

Aceklofenak (**Slika 1.3**) je lekovita supstanca iz grupe NSAID, koja ima analgetsko, antipiretičko i antiinflamatorno dejstvo. I pored veće selektivnosti za enzim COX-2 [23], hronična oralna primena može da dovode do pojave prethodno navedenih ozbiljnih neželjenih reakcija na nivou GIT-a, koje su posledica inhibicije sinteze fizioloških PG, i smanjenja njihovog zaštitnog efekta na želudačnu sluzokožu. Otuda i povećan istraživački interes ka razvoju farmaceutskih preparata sa aceklofenakom za primenu na koži u različitim patološkim stanjima skeletno-mišićnog sistema, a sa ciljem dermalne i/ili transdermalne isporuke ove lekovite supstance [24, 25].



Slika 1.3. Strukturna formula aceklofenaka.

1.1.5.1. Mehanizam delovanja aceklofenaka

Literaturni podaci sugerišu da aceklofenak pokazuje veću efikasnost u terapiji skeletno-mišićnih bolnih i/ili zapaljenjskih stanja u odnosu na diklofenak [26]. Međutim, i dalje ostaje nejasno da li aceklofenak i drugi NSAIL mogu da utiču na progresiju i tok reumatoidnih bolesti [26]. Aceklofenak smanjuje nivo PGE₂ u sinovijalnoj tečnosti i suprimira stvaranje PGE₂ u inflamatornim ćelijama krvi – polimorfonuklearnim leukocitima i mononuklearnim ćelijama imunog sistema, direktnom enzimskom inhibicijom, ali i smanjenjem ekspresije gena za enzim COX-2. Međutim, smanjenje nivoa i inhibicija sinteze PGE₂ ne mogu u potpunosti da objasne mehanizam delovanja aceklofenaka i poboljšanje simptoma kod pacijenata sa reumatoidnim bolestima [27]. Dodatno, već je pomenuto da NSAIL imaju različit potencijal da inhibiraju sintezu citokina, kao i da imaju različit uticaj na sintezu matriksa hrskavice [28]. Syggelos i saradnici [29] su na uzorcima dobijenim od pacijenata sa osteoartritisom pokazali da je prednost aceklofenaka, u odnosu na pojedine druge predstavnike ove terapijske grupe, nishodna regulacija ekspresije gena za produkciju interleukina-6 (IL-6) i gena za TNF- α . Takođe, aceklofenak smanjuje nivo TNF- α mehanizmom koji ne zavisi od uticaja na nivo PGE₂ [30]. Rezultati studija sprovedenih *in vitro* i *ex vivo* na krvnim ćelijama pacijenata sa osteoartritisom ukazali su da aceklofenak smanjuje produkciju IL-1 β i TNF- α , ali ne utiče na sintezu IL-6, dok utiče na bazalnu i IL-1 β indukovanu sintezu ovog medijatora u humanim hondrocitima *in vitro*. Potvrđeno je i smanjenje nivoa PGE₂ u sinovijalnoj tečnosti kod pacijenata sa akutnim bolom u kolenu [23, 31, 32]. Dodatno, studije sprovedene *in vitro* ukazuju da aceklofenak povećava sintezu glukozaminoglikana i hijalurona, i na taj način pomaže obnavljanju hrskavice [23, 31]. S druge strane, kontradiktorni su rezultati dobijeni *in vivo* na pacijentima koji imaju minimum šest meseci razvijene znake osteoartritisa, zasnovano na kliničkim i radiološkim pokazateljima, što ukazuje da aceklofenak smanjuje nivo PGE₂ u hrskavici, smanjuje i sintezu i ekspresiju gena za enzim COX-2, ali ne utiče na nivo TNF- α i IL-1 β [9, 28]. Takođe, na hondrocitima, koji su izolovani iz kolena pacijenata sa osteoartritisom, pokazano je da aceklofenak smanjuje indukovanu sintezu IL-1 β [33]. Dodatno, aceklofenak je smanjio bazalnu, kao i IL-8 i IL-1 β indukovanu sintezu IL-6 [34]. Henrotin i saradnici [35] su na izolovanim humanim hondrocitima pokazali da aceklofenak smanjuje bazalnu i IL-1 β indukovanu produkciju

IL-6 kako u normalnim, tako i u hondroцитima pacijenata sa osteoartritisom. Sve ovo nedvosmisleno ukazuje na potencijalni značaj primene aceklofenaka u terapiji zapaljenjskih i bolnih patoloških stanja.

Glavni metabolit aceklofenaka je 4'-hidroksiaceklofenak (oko 80%), dok su u manjem procentu (oko 20%) zastupljeni: diklofenak, 5-hidroksiaceklofenak, 4'-hidroksidiklofenak, 5-hidroksidiklofenak. U humanoј populaciji, aceklofenak se primarno metaboliše preko izoenzima citohrom P450 2C9 (CYP 450 2C9), pri čemu nastaje 4'-hidroksiaceklofenak, metabolit za koji je pokazano da ima hondroprotektivnu aktivnost inhibicijom aktivnosti IL-1, kao i nishodnom regulacijom bazalne i IL-1 indukovane sinteze matriks metaloproteinaza. Takođe, ovaj metabolit aceklofenaka smanjuje oslobađanje proteoglikana, mehanizmom nezavisnim od PGE₂ [23, 27-30, 36], čime se dodatno doprinosi delovanju lekovite supstance. Dodatno, hidrolizom aceklofenaka nastaje diklofenak, mada je njegova koncentracija u sistemskoј cirkulaciji oko 100 puta niža [37], prisustvo ovog metabolita obezbeđuje produženo delovanje. Pored toga, na izolovanim hondroцитima pokazano je da i 4'-hidroksiaceklofenak i diklofenak inhibiraju bazalnu i IL-1 indukovanu sintezu IL-6 [35]. Ista grupa istraživača pokazala je da 4'-hidroksiaceklofenak utiče i na smanjenje nivoa IL-8, za razliku od aceklofenaka za koji je u više studija pokazano da nema uticaj na sintezu ovog citokina. Takođe, CYP 450 2C9 učestvuje u metabolizmu nastalog diklofenaka u 4'-hidroksidiklofenak, kao i u prevođenju 4'-hidroksiaceklofenaka u 4'-hidroksidiklofenak. Međutim, metabolizam aceklofenaka kod životinja je različit u odnosu na metabolizam u humanoј populaciji. U toku pretkliničkih ispitivanja i farmakokinetičkih studija na pacovima, treba imati u vidu da je osnovni metabolit aceklofenaka diklofenak [37]. Takođe, sve se više u fokus istraživanja stavlja ekstrahepatički metabolizam, pre svega u plućima i koži, koji može značajno uticati na frakciju lekovite supstance dostupnu za resorpciju. Zapravo, pokazano je da je koncentracija esteraza u epidermalnim ćelijama i u blizini folikula dlake značajno veća nego u samom dermisu, što može imati direktan uticaj na frakciju aceklofenaka koja permeira, te stoga i na frakciju koja je dostupna za resorpciju [38].

1.1.5.2. Neželjene reakcije

Literaturni podaci vezani za aceklofenak su oskudni, i smatra se da su neželjene reakcije iste kao nakon primene diklofenaka, koji, kao što je već rečeno, predstavlja jedan od metabolita aceklofenaka. Najčešći neželjeni efekti su dispepsija i abdominalni bol sa incidencom pojavljivanja većom od 5%. Rezultati meta-analize iz 2012. godine sugerišu da aceklofenak pokazuje manji rizik od diklofenaka za ispoljavanje GIT neželjenih efekata [1]. Najčešći neželjeni efekti van GIT-a nakon oralne primene aceklofenaka su vertigo, svrab, crvenilo i dermatitis, sa incidencom manjom od 5% [23, 32]. I pored manje pojave neželjenih reakcija u odnosu na druge lekovite supstance iz ove terapijske grupe (npr. u odnosu na diklofenak i indometacin) [31, 32], i dalje je rizik od izazivanja neželjenih efekata u GIT-u nakon oralne primene leka značajan, i ne može se zanemariti [23].

1.1.5.3. Terapijska efikasnost aceklofenaka

1.1.5.3.1. Reumatoidni artritis

Pokazano je da je antiinflamatorna i analgetska aktivnost aceklofenaka efikasna bar kao i terapija ostalim NSAIL (ketoprofen, indometacin, diklofenak i tenoksikam) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom [23, 31, 32].

1.1.5.3.2. Osteoartritis

Aceklofenak je efikasan bar kao i ostali NSAIL (diklofenak, piroksikam i naproksen) u smanjenju bola i poboljšanju funkcionalnosti pacijenata sa osteoartritismom [23, 31, 32]. Naime, aceklofenak smanjuje bol, i poboljšava funkcionalni kapacitet pogođenih zglobova kod pacijenata sa osteoartritismom.

1.1.5.3.3. Ankilozirajući spondilitis

Aceklofenak je efikasan u smanjenju bola i motorne ukočenosti bar kao i ostali NSAIL (naproksen, indometacin i tenoksikam) u duplo-slepoj studiji sprovedenoj na pacijentima sa ankilozirajućim spondilitismom [23, 31, 32].

1.1.5.3.4. Analgetska aktivnost

U jednoj od studija u kojima je poređena efikasnost aceklofenaka i diklofenaka potvrđeno je da su oba leka jednako efikasna u smanjenju bola zgloba, mada je taj

efekat bio brži nakon primene aceklofenaka, pri čemu je samo nakon primene aceklofenaka došlo do smanjenje nivou PGE₂ u sinovijalnoj tečnosti [31, 32]. Takođe, aceklofenak je bio efikasniji u odnosu na diklofenak u terapiji akutnog lumbaga, kao i u odnosu na paracetamol u smanjenju bola nakon epiziotomije [32]. Potvrđena je i efikasnost aceklofenaka u odnosu na placebo u terapiji umerene ili jake zubobolje [23].

1.1.5.4. Budućnost aceklofenaka kao lekovite supstance u terapiji i kontroli bola kod reumatoidnih bolesti

Osnovni ciljevi terapije osteoartritis, reumatoidnog artritis i ankilozirajućeg spondilitisa farmaceutskim preparatima sa aceklofenakom jesu smanjenje bola, inflamacije zglobova, poboljšanje pokretljivosti i funkcionalnosti, kao i sprečavanje i/ili usporavanje dalje progresije nastanka deformiteta [23]. Shodno tome, osim u kontroli simptoma, aceklofenak može imati i veliki potencijal uticajem na nivo i sintezu proinflamatornih citokina, kao i potencijalnim efektima na regeneraciju hrskavice [23]. Uzimajući u obzir da je terapija reumatoidnih bolesti hronična, poželjno je izabrati NSAIL koji ima minimalne neželjene efekte, što dodatno opravdava primenu aceklofenaka [23]. Međutim i pored svega, aceklofenak je i dalje nedovoljno istražen lek, i neophodna su dalja proučavanja kako bi se pronašlo njegovo mesto na tržištu velikog broja NSAIL [32].

1.1.5.5. Ograničenja u formulaciji farmaceutskih oblika sa aceklofenakom

Biofarmaceutski sistema klasifikacije (BSK) omogućava procenu resorpcije lekovitih supstanci na osnovu njihove rastvorljivosti i permeabilnosti kroz membrane, čime su proširene mogućnosti za sagledavanje *in vivo* ponašanja lekova. BSK klasifikuje lekove u četiri grupe na osnovu njihove rastvorljivosti i permeabilnosti. S obzirom da je maksimalna doza aceklofenaka 100 mg, a minimalna rastvorljivost $c_s = 0,01$ mg/ml, vrednost doznog broja (D_o) aceklofenaka iznosi 40. Kako je vrednost D_o veća od 1, za rastvaranje preporučene doze aceklofenaka neophodno je više od 250 ml vodenog medijuma, te stoga aceklofenak spada u grupu nisko rastvorljivih supstanci. Usled niske rastvorljivosti i visoke lipofilnosti, odnosno visoke permeabilnosti, aceklofenak spada u grupu II prema BSK sistemu klasifikacije [39, 40]. Stoga, može se zaključiti da rastvorljivost aceklofenaka predstavlja ograničavajući faktor za resorpciju ove lekovite supstance iz farmaceutskih preparata. Samim tim, ograničavajući proces za

bioraspoloživost i terapijsku efikasnost preparata namenjenih za *per os* primenu aceklofenaka je brzina rastvaranja aceklofenaka *in vivo*. Imajući to u vidu, iako su registrovani preparati na tržištu namenjeni za oralnu primenu leka (preporučeni režim doziranja je 100 mg dva puta dnevno), sve se više razmatra topikalna primena aceklofenaka, s ciljem povećanja lokalne/sistemske raspoloživosti i smanjenja neželjenih efekata [36, 41]. Dodatno, prednost lokalne primene ogleda se u jednostavnosti primene, smanjenju učestalosti primene preparata, što sve vodi ka boljoj komplijansi pacijenata [36]. Shodno tome, opravdan je i sve veći istraživački interes ka različitim savremenim nosačima koji su namenjeni za dermalnu/transdermalnu isporuku aceklofenaka (npr. nanokristali [40], etozomi [36], čvrste lipidne nanočestice [41], i dr.). U **Tabeli 1.1** je dat prikaz istraživačkih studija u kojima je sprovedena *in vivo* procena različitih savremenih nanonosača sa ciljem dermalne i/ili transdermalne isporuke aceklofenaka.

Tabela 1.1. Prikaz in vivo dermato(farmakokinetičkih) i farmakodinamičkih studija nanonosača formulisanih sa ciljem dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka.

Nanonosač	<i>In vivo</i> studija	Životinje/ljudi	Literatura
Nanostrukturirani lipidni nosači	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	BALB/c miševi	[42]
Elastične membranske vezikule, etozomi	Farmakodinamička studija – metod povlačenja repa usled izlaganja izvoru toplote	<i>Laca</i> miševi	[36]
	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Wistar</i> pacovi	
Nanoemulzije	Dermatofarmakokinetička studija – metoda sa trakama	Dobrovoljci	[43]
Hidrogel zasnovan na čvrstim lipidnim nanočesticama	Studija penetracije kroz kožu – konfokalna laserska mikroskopija	<i>Sprague Dawley</i> pacovi	[41]
	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Sprague Dawley</i> pacovi	
Gel zasnovan na lipidnim nanovezikulama	Farmakokinetička studija – određivanje koncentracije u krvi životinje	<i>Wistar</i> pacovi	[44]
	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Wistar</i> pacovi	
Gel zasnovan na hitozan-albumin nanočesticama	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Sprague Dawley</i> pacovi	[24]
Nanoemulzije, gel zasnovan na nanoemulzijama	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Wistar</i> pacovi	[45]
Nanovezikule	Farmakokinetička studija – određivanje koncentracije u krvi životinje	<i>Wistar</i> pacovi	[46]
	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Wistar</i> pacovi	
Gel zasnovan na nanostrukturiranim lipidnim nosačima	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	<i>Wistar</i> pacovi	[47]

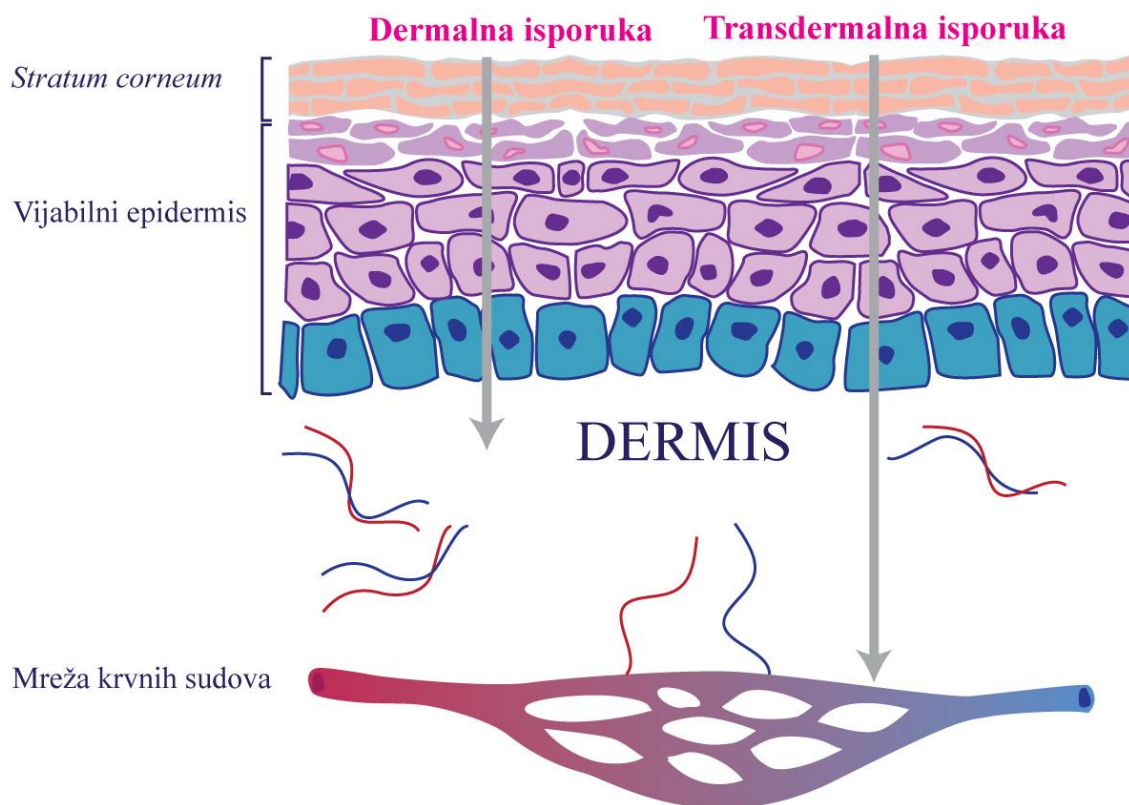
Nanoemulzije, gel zasnovan na nanoemulzijama	Farmakokinetička studija – određivanje koncentracije u krvi životinje	Wistar pacovi	[25]
Lipozomi, niozomi	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	Wistar pacovi	[48]
Mikroemulzije*	Farmakodinamička studija – edem šape izazvan karageninom	Wistar pacovi	[49]
Mikroemulzije	Farmakodinamička studija – odložen početak mišićne osetljivosti	Dobrovoljci	[50]

**Iako se u naučnoj publikaciji sistem klasifikuje kao nanoemulzija, sastav, način dobijanja i struktura sistema ukazuju da je u pitanju mikroemulzija.*

1.2. Koža – dermalna/transdermalna isporuka NSAIL

Koža (**Slika 1.4**) predstavlja efikasnu barijeru koja je nepropusna za vodu i jone, a takođe sprečava resorpciju (a time i sistemsku izloženost) lokalno primenjenih supstanci. Nasuprot tome, koža je permeabilna za lipofilne supstanci, kao i gasovite ksenobiotike, što je čini neefikasnom barijerom za ovakva jedinjenja. Površinski sloj kože – *stratum corneum* (SC) – predstavlja glavnu barijeru za penetraciju/permeaciju/resorpciju lekovitih supstanci u vijabilni epidermis/dermis/sistemsku cirkulaciju. SC se u literaturi opisuje kao „*brick and mortar model*“ (**Slika 1.4**), s obzirom da se sastoji od mrtvih keratinocita (cigle) uronjenih u lipidni matriks (malter), koji se sastoji od ceramida, sterola i slobodnih masnih kiselina. Korneociti su međusobno vezani korneodezmozomima, čijom degradacijom proteolitičkim enzimima dolazi do deskvamacije. Oko deset lipidnih dvosloja se nalazi između dva sloja korneocita [51, 52]. Dakle, između dva sloja korneocita se nalazi prostor veličine oko 75 nm, koji je ispunjen lipidima, koji zajedno sa korneodezmozomima ograničava prolazak supstanci kroz taj vijugav put. Međutim, u poređenju sa ostalim putevima resorpcije, humana koža se najviše razlikuje od kože različitih životinjskih vrsta, što otežava kvantitativno predviđanje brzine i stepena perkutane penetracije (u kožu) ili resorpcije (kroz kožu) lekova primenjenih na koži (**Slika 1.4**) [53]. Postoje dva osnovna puta resorpcije u/kroz kožu: alternativni transport kroz lipide i korneocite, ili samo transport kroz lipidni sloj. S obzirom da su korneociti mrtve ćelije bez nukleusa, one ne mogu da sintetišu proteine, tako da se aktivni ili olakšani transport supstanci odvija nezavisno od SC. Stoga, prihvaćeno je da je osnovni mehanizam transporta supstanci kroz kožu difuzija. Iako je SC najznačajniji put penetracije za mnoge lekovite supstance, dermalna resorpcija se može vršiti i kroz folikul dlake ili znojne žlezde (transglandularno). Takođe, SC predstavlja glavnu barijeru koja sprečava gubitak vode. Dakle, transport lekovitih supstanci kroz SC se najvećim delom odvija pasivnom difuzijom, i može se odvijati na tri načina [51]:

1. transcelularno,
2. intercelularno,
3. kroz folikul dlake (apendegalno).



Slika 1.4. Šematski prikaz građe kože.

Veza između permeabilnosti i anatomije kože i dalje nije potpuno objašnjena. Jedan od puteva transporta je svakako preko transkutanih pora, kao što su folikuli dlake, ili preko površinskih mikroperforacija, kao što su lokalni transportni regioni koji nastaju tokom ultrazvučne- ili elektroporacije. Korneociti su organizovani u klasterne od po dvanaest korneocita. Ovi klasteri su međusobno odvojeni delom koji ima manji otpor penetraciji lekovitih supstanci. Stoga, kod normalne kože, najmanji otpor za penetraciju kroz SC je između klastera korneocita, na mestima gde se preklapaju mobilne grupe. Bolje zatvorena, i veza koja pokazuje veći otpor je intra-klaster/inter-korneocitni put. Ovaj put vodi između lipidnih intercelularnih multilamela i/ili spoljašnje membrane susednih korneocita. Hidrofilne supstance imaju tendenciju da prođu između klastera korneocita, ili kroz zakrivljenu ćelijsku membranu korneocita. Lipofilna barijera je uska, i za razliku od hidrofilne barijere, prolazak supstanci je definisan molekulskom masom i koeficijentom distribucije, pre nego veličinom molekula. Molekuli veći od 500 Da ne mogu da prođu ovu barijeru s obzirom na nedostatak dovoljno širokih defekata u intercelularnom lipidnom matriksu neophodnih za difuziju molekula [52,

54]. Pored toga, pokazano je da koža može da ima značajnu ulogu, kako u toku prve, tako i u toku druge faze metabolizma lokalno primenjenih lekova, što može imati značajan uticaj na frakciju leka koja permeira/se resorbuje, povećavajući složenost ovog procesa [53].

1.2.1. Ciljevi dermalne/transdermalne isporuke

Lokalna primena preparata na koži ima brojne prednosti u odnosu na druge puteve primene (npr. parenteralni, oralni): i) smanjenje sistemske toksičnosti, ii) odsustvo metabolizma prvog prolaza kroz jetru, iii) pogodnost za pacijente sa GIT problemima, iv) odsustvo invazivnosti, v) jednostavna primena, vi) jednostavan završetak terapije uklaňanjem preparata sa kože, vii) pogodnost za pacijente sa lošom komplijansom, viii) smanjeno oštećenje GIT-a izazvano lekovitom supstancom [55].

Osnovni ciljevi dermalne/transdermalne isporuke lekovitih supstanci su povećanje komplijanse pacijenata, uz minimalnu invazivnost ili odsustvo invazivnosti, poboljšanje farmakokinetike leka, i ciljna isporuka leka. Međutim, sva dosadašnja istraživanja u ovoj oblasti ukazuju da postoje brojni faktori koji utiču na penetraciju/permeaciju/resorpciju supstanci nakon primene na koži. U naučnoj literaturi je prihvaćeno da su ti faktori podeljeni u tri celine: i) stanje kože na mestu primene, ii) fizičko-hemijske osobine lekovite supstance, iii) osobine nosača lekovite supstance. Iako stanje kože, tj. integritet kože, debljina kože, veličina vodenih i lipidnih pora, gustina žlezda i folikula dlake, protok krvi, i dr., utiču u velikom stepenu na prolazak supstance kroz SC [52], u ovoj doktorskoj disertaciji biće opisana preostala dva faktora koja su od izuzetne važnosti u razvoju nanonosača sa ciljem dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka.

1.2.1.1. Uticaj fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance na penetraciju/permeaciju supstanci

Pri formulaciji farmaceutskih oblika namenjenih dermalnoj/transdermalnoj isporuci lekovite supstance, važno je razmotriti sledeće fizičko-hemijske osobine supstance koje su od značaja za penetraciju kroz SC, permeaciju/resorpciju na ciljno mesto dejstva/u sistemsku cirkulaciju:

- i) **rastvorljivost i količina rastvorene lekovite supstance u nosaču** – termodinamička aktivnost supstance predstavlja pokretačku silu za permeaciju, te

samim tim, maksimalna penetracija će biti postignuta pri zasićenim koncentracijama lekovite supstance u nosaču;

ii) **jonizacija i pK_a vrednost lekovite supstance i pH vrednost nosača**, s obzirom da je prihvaćeno da samo nejonizovana frakcija leka prolazi u vijabilni epidermis;

iii) **rastvorljivost lekovite supstance u vodi i lipidima** – lipofilni molekuli će lako proći u SC, iako će teško proći u dublje slojeve kože, dok će hidrofilni molekuli imati lošu penetraciju;

iv) **molekulska masa/veličina molekula lekovite supstance** – molekuli manji od 500 – 600 Da mogu lako da penetriraju u SC, mada treba imati u vidu da i veći molekuli mogu da dospeju u SC i da dovedu do reorganizacije lipidnih slojeva SC;

v) **potencijal za formiranje veza i metabolizam u koži** moraju biti dobro razmotreni – vezivanje supstance za komponente kože otežava dalji transport dok metabolizam smanjuje količinu supstance dostupnu za permeaciju/resorpciju;

vi) **difuzioni koeficijent između nosača i SC** – važno je da se supstanca oslobodi iz nosača i pređe u SC, što primarno zavisi od njenih particionih osobina, i rastvorljivosti u SC-u [52].

Poznato je da je glavni put permeacije kroz SC preko intercelularnih lipida, te stoga, obim penetracije/permeacije u najvećem stepenu zavisi od fizičko-hemijskih osobina supstance. Supstance koje imaju LogP vrednost u rasponu od 1 do 3 permeiraju kroz kožu relativno brzo, te ovakve supstance predstavljaju dobre kandidate za dermalnu/transdermalnu isporuku [56].

1.2.1.2. Uticaj fizičko-hemijskih osobina nosača na penetraciju/permeaciju supstanci

Nakon nanošenja formulacije, pored lekovite supstance, sve komponente formulacije su dostupne za penetraciju u kožu. Shodno tome, penetracija lekovite supstance je uslovljena potencijalnim sinergizmom/interakcijama između komponenata nosača, solubilizovanih/dispergovanih lekovitih supstanci i komponenata kože. Stoga

formulacija može u značajnom stepenu da utiče na permeaciju lekovite supstance povećanjem ili smanjenjem difuzije i/ili njene rastvorljivosti u SC [52, 56].

Okluzivni efekat nakon nanošenja formulacije na koži dovodi do povećanja dermalne/transdermalne isporuke. Podloge koje vrše okluziju kože utiču na povećanje hidratacije iznad nivoa koji je potreban za održavanje normalne funkcije kože, što može dovesti do bubrenja korneocita, raskidanja intracelularnih lipidnih dvosloja i međucelijskih veza, povećanja fluidnosti lipida, i posledično povećanja permeabilnosti kože. Visoko lipofilne formulacije otežavaju prelazak supstanci u SC. Koeficijent permeabilnosti lipofilne supstance raste kada se primeni inkorporirana u hidrofilni nosač, dok opada sa porastom lipofilnosti formulacije [52, 56]. Iako se maksimalni fluks tradicionalno određivao iz zasićenih rastvora, pokazano je da je oslobađanje bolje iz presićenih rastvora. Shodno tome, pokretačka sila za penetraciju nije koncentracija već gradijent hemijskog potencijala. To se može objasniti *Higuchi*-jevom jednačinom:

$$J = Da/h(\gamma_{sc})$$

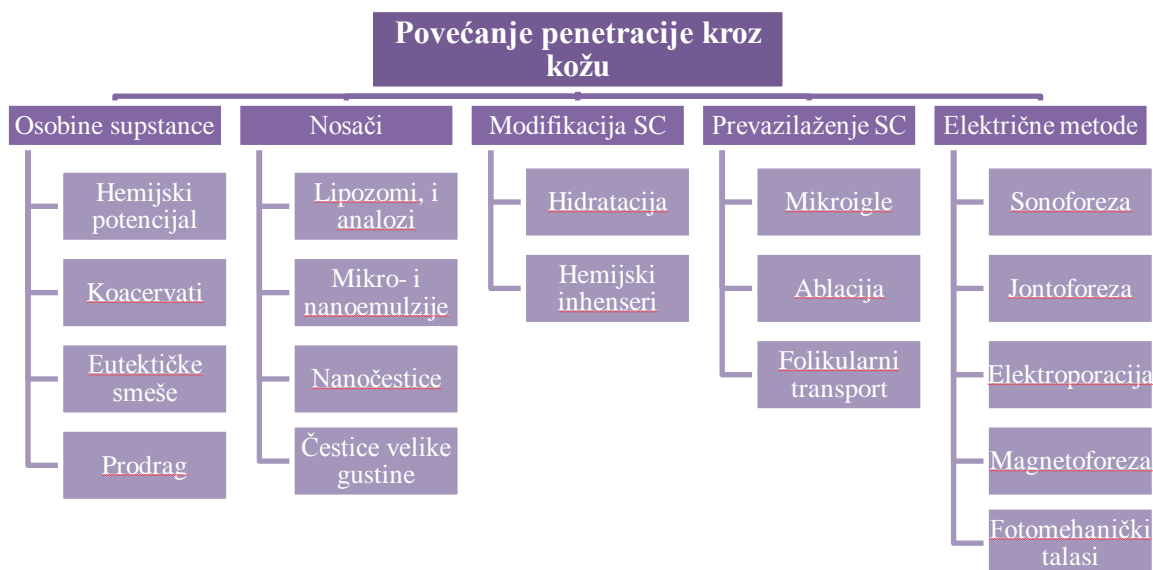
Jednačina 1.1

gde je a termodinamička aktivnost supstance u nosaču, γ_{sc} koeficijent aktivnosti permeanta u SC, D je prividni difuzioni koeficijent, a h je dužina puta kroz koji supstanca difunduje. Na taj način može se očekivati da bi presićenje supstance u nosaču povećalo njenu penetraciju/permeaciju, s obzirom da presićenje dovodi do povećanja rastvorljivosti u SC preko i nezavisno od rastvorljivosti zasićenja. Međutim, problem kod ovakvih formulacija je održavanje dugotrajne fizičke stabilnost zbog moguće kristalizacije aktivne supstance [56].

Takođe, neophodno je postići odgovarajući viskozitet nosača s obzirom da on direktno utiče na pravilnu primenu, a time i na zadržavanje lekovite supstance na površini kože, što je preduslov za terapijsku aktivnost. Pored toga, jako viskozne formulacije smanjuju difuzioni koeficijent supstance u nosaču, te se na taj način usporava/odlaže oslobađanje i posledično penetracija/permeacija u kožu [52]. Kao što je već objašnjeno pH vrednost nosača je veoma važan faktor. Kako bi se obezbedio transport kroz SC, potrebno je da pH vrednost podloge bude odgovarajuća i da pogoduje nejonizovanom obliku lekovite supstance [52, 56].

1.2.2. Povećanje dermalne/transdermalne isporuke lokalno primenjenih lekovitih supstanci

S obzirom da barijerna funkcija SC i fizičko-hemijske osobine lekovite supstance značajno ograničavaju transport lekovitih supstanci ka dubljim slojevima epidermisa/dermisa, postoje različite strategije za prevazilaženje ove barijere i povećanje propustljivosti SC koje se mogu podeliti na: i) fizičke, ii) hemijske, iii) biohemijske, iv) formulacione (**Slika 1.5**). Na osnovu mehanizma koji dovodi do povećanja transporta kroz SC, ove tehnike se mogu podeliti na aktivne i pasivne. Aktivne tehnike uključuju primenu spoljašnje sile u cilju povećanja isporuke kroz SC (npr. jontoforeza, sonoforeza, i dr.) dok se pasivne tehnike zasnivaju na prirodnim silama kao što su difuzija, rastvorljivost, koncentracioni gradijent [57].



Slika 1.5. Različiti biohemijski, hemijski, fizički i formulacioni pristupi za povećanje penetracije supstanci kroz kožu (prilagođeno na osnovu reference [57]).

Od navedenih pristupa u cilju poboljšanja dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka, u sklopu ove doktorske disertacije biće detaljno obrađeni: i) **formulacioni pristup**, kao i ii) **modifikacija SC** upotrebom penetracionih inhensera.

1.3. Mikroemulzije kao potencijalni nosači za lokalnu primenu NSAIL

Koncept mikroemulzija je razvijen četrdesetih godina dvadesetog veka kada su Hoar i Schulman formulisali jednofaznu, transparentnu, voda u ulju (v/u) disperziju, titracijom makroemulzije bele boje heksanolom [58]. Međutim, **termin mikroemulzija** je prvi put uveden tek 1959. godine od strane iste istraživačke grupe, mada je, nakon toga, ovaj termin više puta i redefinisano [59]. S obzirom da različita terminologija dovodi do stvaranja zabune kada su u pitanju ovi koloidni sistemi, u većini literaturnih izvora se koristi definicija iz 1981. godine koju su predložili Danielsson i Lidman, i koja mikroemulzije opisuje kao transparentne, izotropne i termodinamički stabilne smeše ulja, vode i amfifila [59, 60].

Tabela 1.2. Osnovne karakteristike različitih disperzionih sistema (prilagođeno na osnovu [60-63]).

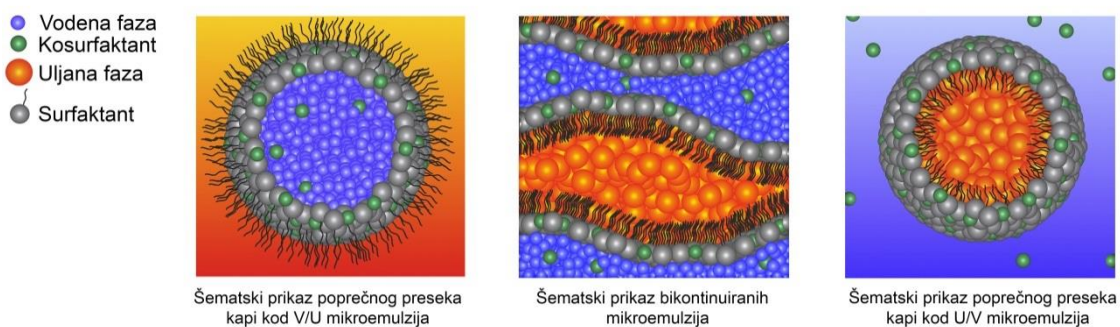
	Micelarni rastvori	Mikroemulzije	Nanoemulzije	Emulzije
Spontano nastajanje	Da	Da	Ne	Ne
Termodinamička stabilnost	Da	Da	Ne*	Ne
Turbiditet	Transparentni	Transparentni do translucetni	Translucetni do mlečno beli	Mutni
Izotropnost	Da	Da	Ne	Ne
Veličina dispergovane faze	< 5 nm	< 100 nm	20 – 200 nm	0,5 – 50 µm
Kosurfaktant	Ne	Da	Da	Ne
Koncentracija surfaktanta	< 5%	> 10%	< 10%	1 – 20%

*Kinetički stabilni sistemi.

Premda sam termin mikroemulzija ne korelira sa njihovom stvarnom strukturom, u praksi je zadržan. Kako se u literaturi često sreće pogrešno tumačenje i klasifikacija koloidnih sistema, u **Tabeli 1.2** je dat prikaz sličnosti i razlika mikroemulzija u odnosu na micelarne rastvore i (nano)emulzije. Osnovna razlika mikroemulzija u odnosu na ostale oblike emulzija (**Tabela 1.2**) je termodinamička stabilnost, te samim tim tokom

vremena ne dolazi do pojave nestabilnosti koje su tipične za emulzije (flokulacija, razdvajanje faza, koalescencija, inverzija faza) [64]. Pored toga, za razliku od belih emulzija, mikroemulzije su transparentni (ili translucetni) sistemi, za čiju izradu nije neophodna spoljašnja energija, što čini ove sisteme veoma interesantnim za farmaceutsku industriju [59].

Dalja istraživanja u ovoj oblasti su doprinela razjašnjenju strukture i određivanju karakteristika mikroemulzija. Naime, istraživači u ovoj oblasti dele mišljenje da mikroemulzije imaju definisanu unutrašnju strukturu, tj. da su uljana i vodena faza razdvojene međupovršinskim slojem koji se sastoji od molekula amfifila. **Slika 1.6** daje šematski prikaz tri različita tipa mikroemulzija koje mogu nastati u zavisnosti od udela komponenata: **ulje u vodi (U/V)**, **voda u ulju (V/U)** i **bikontinuirane mikroemulzije** [59].



Slika 1.6. Šematski prikaz strukture V/U, bikontinuiranih i U/V mikroemulzija.

Iako su sve tri strukture prikazane na **Slici 1.6** očigledno različite, na svakoj se može primetiti sloj amfifila koji se nalazi na granici između uljane i vodene faze. Mikroemulzije tipa U/V se formiraju kada je vodena faza u višku, dok V/U mikroemulzije nastaju pri većem udelu uljane faze. U/V i V/U mikroemulzije imaju unutrašnju fazu u formi dispergovanih kapi, dijametra između 10 nm i 100 nm. Mada su na **Slici 1.6** ove kapi prikazane u sfernom obliku, u zavisnosti od udela komponenata ove kapi mogu biti i asimetrične, izduženog do elipsoidnog oblika [59]. U slučaju bikontinuiranih mikroemulzija se ne može jasno definisati koja faza je unutrašnja, a koja spoljašnja, te su stoga obe faze prisutne kao kontinuirane, a razdvaja ih međupovršinski, fluidizirajući film sastavljen od surfaktanta (i kosurfaktanta) [59].

Takođe, debata o vezi između U/V mikroemulzija i micela, kao i između V/U i reverznih micela je odavno prisutna u naučnoj javnosti. U zavisnosti od udela komponenata, postoji jasan prelaz od (reverznih) micela, preko nabubrelih micela pa do mikroemulzionih kapi. Međutim, treba imati u vidu da veliki broj istraživačkih grupa ne pravi razliku između ovih struktura [59].

1.3.1. Teorija nastanka mikroemulzija – termodinamička stabilnost

Iako se u literaturi mogu naći različiti pristupi koji opisuju nastajanje (tj. formiranje) mikroemulzija i njihovu stabilnost [65-67], termodinamička teorija se izdvaja kao najčešće korišćen pristup [59, 60, 63, 68]. Na konstantnoj temperaturi (T) i pritisku (P), međupovršinski napon (γ) u sistemu se može prikazati Jednačinom 1.2:

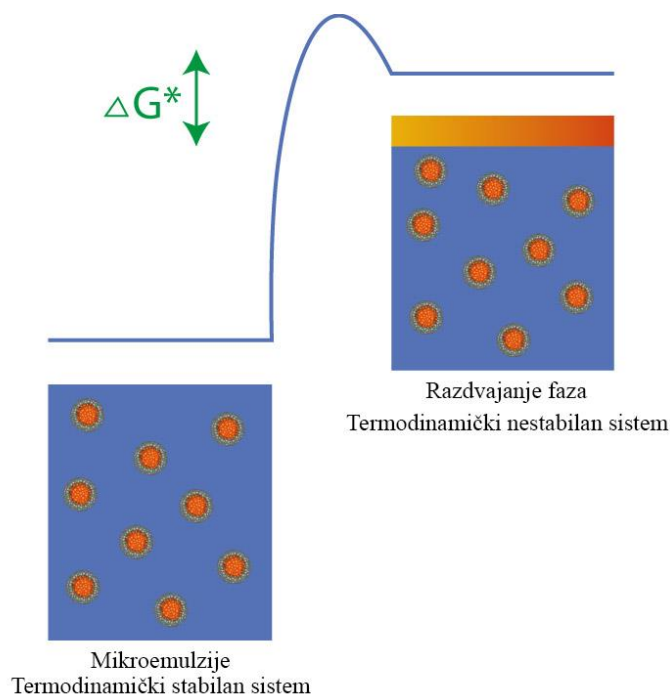
$$\gamma = \frac{\Delta G}{\Delta A} \quad \text{Jednačina 1.2}$$

gde je ΔG Gibsova slobodna energija, tj. razlika energetske stanja mikroemulzije i energetske stanja kada su uljana i vodena faza razdvojene, dok je ΔA promena u dodirnoj površini između faza [68]. Naime, veoma visok međupovršinski napon između vodene i uljane faze onemogućava mešanje dve tečnosti. U tom slučaju, kada je vrednost γ pozitivna, vrednost ΔG je takođe pozitivna, što ukazuje da ne dolazi do mešanja uljane i vodene faze. Taj fenomen se prevazilazi dodatkom surfaktanta i kosurfaktanta u smešu uljane i vodene faze, što je opisano Jednačinom 1.3:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S + \gamma\Delta A \quad \text{Jednačina 1.3}$$

gde su ΔH , ΔS , i T promena entalpije, entropije sistema, i temperatura, respektivno. Pri mešanju vodene i uljane faze vrednost ΔH je zanemarljiva. Smanjenje veličine kapi dovodi do pozitivne promene u entropiji sistema, stoga je $T\Delta S \gg \gamma\Delta A$, čineći ukupnu slobodnu Gibsovu energiju negativnom. Na taj način nastala disperzija nastaje spontano, a nastali sistem je termodinamički stabilan. ΔA vrednost je veoma visoka, uzimajući u obzir veliki broj sitnih kapi koje nastaju. Iako se verovalo da je međupovršinski napon u mikroemulzijama negativan ili nula, ova teorija je promenjena. Konstantan, ali značajan međupovršinski napon, usled prisustva surfaktanta, omogućava nastajanje međupovršinskog filma, dok je dodatak kosurfaktanta neophodan za smanjenje vrednosti γ do veoma niskih vrednosti [68]. Dakle, iako se smatralo da su ove vrednosti čak i negativne, došlo se do zaključka da je vrednost γ pozitivna tokom celog procesa,

međutim, treba imati na umu da je ova vrednost veoma niska (reda veličine $10^{-2} - 10^{-3}$ mN/m). Stoga, član $\gamma\Delta A$ u Jednačini 1.3 je uvek pozitivan, s obzirom da su i međupovršinski napon i promena u dodirnoj površini između faza pozitivne veličine, te se ovaj faktor u jednačini odupire spontanom formiranju mikroemulzija [60]. Sa druge strane, porast entropije, koji nastaje kao posledica povećanja broja kapi malih dimenzija (veličina ispod 100 nm) je veliki, i favorizuje spontani nastanak mikroemulzija. Dodatno, kapi unutrašnje faze (malih dimenzija) se mogu organizovati na neograničen broj načina, dovodeći tako do porasta entropije sistema. Porastu entropije sistema doprinose i dinamički procesi difuzije molekula surfaktanta na međupovršinski film kao i razmena molekula surfaktanta između micela/kapi. Shodno tome, veliko smanjenje međupovršinskog napona uz značajno povećanje entropije sistema rezultuje u smanjenju ukupne slobodne energije sistema, te je proces nastajanja mikroemulzija **spontan (Slika 1.7)**, a nastala disperzija **termodinamički stabilna** [59, 62, 68, 69].



Slika 1.7. Šematski prikaz energetske stanja razdvojenih faza i mikroemulzionog sistema.

1.3.2. Kinetička stabilnost

Kao što je već objašnjeno, **termodinamička stabilnost** određenog stanja koloidne disperzije je određena energetsom razlikom između tog stanja i stanja sa razdvojenim

fazama. Poznato je da sistem uvek teži da pređe u stanje sa minimumom slobodne energije pri datim uslovima pritiska i temperature. Međutim, ukoliko je **kinetički stabilan**, sistem može da bude i u metastabilnom stanju određeni vremenski period. Kinetička stabilnost metastabilnog stanja je određena sa dva faktora: i) energetsom barijerom, i ii) fenomenom transporta mase. U slučaju kada postoji bilo kakva energetska barijera za prelazak u najstabilnije stanje (npr. aktivaciona energija) sporije dolazi do razdvajanja faza. Fenomen transporta mase se zasniva na tome da stepen prelaska iz jednog u drugo stanje zavisi od brzine kojom komponente zauzimaju nove konformacije, tj. od brzine kojom komponente mogu da se kreću. Mikroemulzije su termodinamički stabilni sistemi, i ostaće stabilne ukoliko ne dođe do promene uslova sredine. U praksi, može se desiti da mešanjem uljane, vodene faze i amfifila ne dolazi do spontanog nastajanja mikroemulzija jer postoji energetska barijera ili spor transfer mase. U takvim slučajevima može biti neophodno mešanje komponentata, ili zagrevanje sistema da bi nastala mikroemulzija. Treba imati u vidu da fizičko-hemijski mehanizmi u osnovi ove energetske barijere nisu poznati, ali se pretpostavlja da mogu biti posledica slobodne energije povezane sa kretanjem nepolarnih molekula iz uljane u vodenu fazu. Kontakt nepolarnih molekula sa vodenom fazom je termodinamički nepovoljno stanje, koje u kombinaciji sa hidrofobnim efektom, povećava dodirnu površinu između nepolarnih grupa i vode. Dakle, ovi fenomeni mogu biti prisutni kod mikroemulzija čiju uljanu fazu čine veliki molekuli ulja. Naime, veliki molekuli uljane faze imaju veoma nisku rastvorljivost u vodi, te će, samim tim, njihov transport kroz vodu biti veoma spor [60].

1.3.3. Dinamički karakter nanostrukture mikroemulzija

Nasuprot prvobitnim pretpostavkama da su mikroemulzije statički sistemi, u literaturi je poslednjih decenija prihvaćeno da su mikroemulzije izuzetno dinamički sistemi, s obzirom da komponente koje ulaze u sastav mikroemulzija mogu pokazati visok stepen difuzije. Visok stepen fluktuacije molekula koji grade međupovršinski film može dovesti do koalescencije/dekoalescencije kapi, fenomena perkolacije, i sl. Ovi procesi su odgovorni za razmenu solubilizovanih supstanci između kapi, i imaju snažan uticaj na reaktivnost u ovakvoj mikroheterogenoj sredini. Upravo ovi fenomeni imaju glavnu ulogu u stabilizaciji mikroemulzija, kao i njihovoj primeni [70].

Često (gotovo uvek) mikroemulzije sadrže visoku koncentraciju surfaktanta, te je dinamika promena u takvom sistemu, u kome je koncentracija komponenata van okvira standardnih razblaženih sistema, veoma složena. Dodatak alkohola (kosurfaktanta) i uljane faze u micelarni rastvor može imati veliki uticaj na brzinu ovih procesa, iako su u suštini, ovi fenomeni isti kao kod micelarnih rastvora. Dodatno prisustvo ostalih aditiva u vodenoj fazi, kao i temperatura, imaju snažan uticaj na stepen dinamičkih procesa u sistemu [70]. Shodno tome, dinamički proces simultane agregacije/dezintegracije koji se kontinuirano dešava u mikroemulzionim sistemima uključuje: i) razmenu slobodne i vezane vode, ii) u slučaju jonskih mikroemulzija, razmenu jona između polarnih grupa surfaktanta i vodenog jezgra, iii) razmenu molekula kosurfaktanta između međupovršinskog filma, vodene i uljane faze, i iv) razmenu molekula surfaktanta između međupovršinskog filma i vodene faze. Shodno tome, iako su mikroemulzije termodinamički stabilni sistemi koji nastaju spontano, u sistemu postoji kontinuirana razmena komponenata kroz dva tipa procesa:

- i) koliziju kapi koja je udružena sa privremenim spajanjem kapi u veće kapi (fuzija) i posledičnim razbijanjem većih kapi u manje (fizija);
- ii) delimičnu fragmentaciju kapi uz gubitak fragmenata koji se udružuju sa drugim kapima (koagulacija).

Pokazano je da je prvi proces prisutan u slučaju V/U, dok je proces fragmentacije/koagulacije prisutan kod U/V mikroemulzija. Naime, difuzija predstavlja pokretački mehanizam koji je odgovoran za koliziju agregata. Nakon kolizije, otvaranje vodenih kanala (fuzija) uključuje formiranje prolazne pozitivne zakrivljenosti međupovršine u regionu kontakta kapi. Upravo pojava otvaranja filma surfaktanta je proces koji kontroliše brzinu ovih promena. Za određeni sistem priroda surfaktanta čini glavni faktor koji određuje elastičnost/rigidnost međupovršinskog filma, a samim tim i brzinu opisanih promena. U slučaju nejonskih surfaktanata ove promene su izuzetno brze s obzirom da amfifili formiraju fluidnu međupovršinu, dok u slučaju jonskih surfaktanata (npr. AOT) samo jedna u 10000 kolizija vodi spajanju i razmeni materije [61].

1.3.4. Studije faznog ponašanja i metodologija faznih dijagrama

Jedna od osnovnih karakteristika mikroemulzija je transparentnost (**Tabela 1.2**), koja je posledica male veličine kapi unutrašnje faze¹. Međutim, kao što je već rečeno, termin mikroemulzije obuhvata sisteme različitih struktura. Promena udela komponenata, tj. povećanje udela vodene faze, ili promene temperature, dovode do kontinuiranog prelaza iz sistema bogatih uljanom fazom ka sistemima bogatim vodenom fazom, koji se dešava preko međusistema sa bikontinuiranom strukturom, što ukazuje na promenu u zakrivljenosti međupovršinskog filma koji se sastoji od surfaktanta (i kosurfaktanta) [70]. Veza između faznog ponašanja sistema i udela komponenata najčešće se opisuje korišćenjem faznih dijagrama [59].

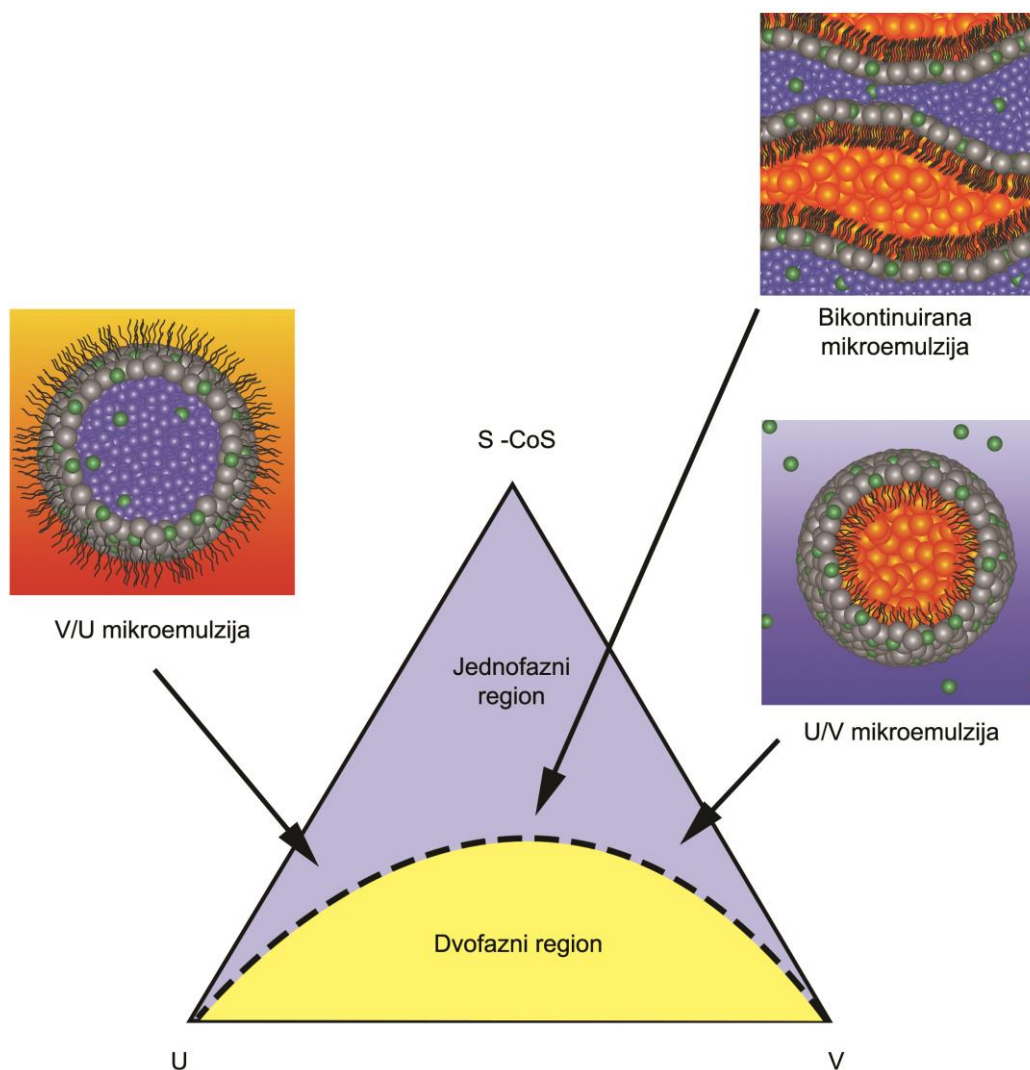
U ispitivanju **faznog ponašanja** mikroemulzija koriste se različiti tipovi **faznih dijagrama**. Još 1894. godine Roozeboom je dao predlog različitih tipova faznih dijagrama: „Gibsov trougao“, fazna prizma i fazni tetraedar [71]. 1970. godine Gillberg i saradnici [72] su prvi put koristili fazne dijagrame u svrhu proučavanja mikroemulzija. U odsustvu spoljašnjih komponenata, smeša od m komponenata ima $m + 1$ nezavisnih termodinamičkih varijabli (temperatura i pritisak). Binarni sistem ($m = 2$), može biti prikazan tačno u tri dimenzije, dok se za prikazivanje ternarnog sistema ($m = 3$) u tri dimenzije jedna komponenta mora držati fiksiranom. U slučaju kvaternarnog sistema ($m = 4$) dve komponente moraju biti fiksirane. S obzirom da je spoljašnji pritisak najčešće konstantan, istraživači često ovu komponentu drže fiksnom. Ukoliko komponenta A predstavlja vodenu fazu, komponenta B uljanu fazu, a komponenta C surfaktant, fazno ponašanje na konstantnom pritisku može se predstaviti prizmom, gde se u osnovi nalazi Gibsov trougao (A-B-C) a na ordinati je prikazana temperatura. Svaka tačka unutar faznog dijagrama predstavlja sastav sistema A-B-C na određenoj temperaturi. Horizontalni presek prizme, tj. osnova fazne prizme predstavlja **izotermalni fazni dijagram** [68, 71]. U slučaju kvaternarnih sistema A-B-C-D, fazni dijagrami mogu biti u obliku faznih prizmi, gde se komponenta D nalazi na ordinati, ili

¹ U zavisnosti od literarnog izvora, mogu se pronaći različiti podaci o veličini kapi mikroemulzija, od 70. Tondre CE. Dynamics of Surfactants Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases. In. CRC Press (Online) 2005.
62. Heuschkel S, Goebel A, Neubert RH. Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. Journal of pharmaceutical sciences 2008; 97: 603-631.

se fazno ponašanje istražuje konstruisanjem **pseudo-ternarnih faznih dijagrama** gde se u jednom uglu osnove trougla nalazi fiksna smeša dve komponente [71].

Kako je konstruisanje faznih prizmi i tetraedara vremenski zametan postupak, u literaturi se najčešće mogu naći fazni dijagrami tipa faznog trougla, kod kojih se u uglovima nalaze komponente A, B, i C. Na ovaj način se korišćenjem izotermalnih i izobaričnih uslova izbegava uticaj temperature i pritiska na fazno ponašanje višekomponentnog sistema [68]. U slučaju ternarnog faznog dijagrama A-B-C, u uglovima dijagrama se nalaze tačke koje odgovaraju 100% udelu odgovarajuće komponente, dok se na stranicama jednakostraničnog trougla nalaze različiti odnosi binarnog sistema. Međutim, treba imati u vidu da se u mikroemulzijama najčešće sreće (bar) još jedna dodatna komponenta – kosurfaktant, koja može biti amfifil, alkohol, alkan-diol, alkan-amin ili alkanolna kiselina. Stoga, u slučaju četvoro- ili višekomponentnih sistema, koriste se **pseudo-ternarni fazni dijagrami (Slika 1.8)**, gde uglovi predstavljaju komponentu ili konstantan maseni odnos smeše komponenata (npr. smeša surfaktant-kosurfaktant) [68]. Korišćenje pseudo-ternarnih faznih dijagrama može dati korisne informacije o uticaju strukture surfaktanta/kosurfaktanta na fazno ponašanje, kao i o uticaju uljane faze na osobine sistema pri bilo kom udelu komponenata [68].

Iako se prelazak iz V/U ka U/V mikroemulzijama može postići kroz različite strukture – bikontinuirane, lamelarne ali isto tako i multifazne sisteme [59] – na **Slici 1.8** je prikazan prelazak kroz bikontinuirane mikroemulzije, s obzirom da je ovaj prelazak od značaja u ispitivanjima sprovedenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Međutim, treba imati u vidu da su studije faznog ponašanja višekomponentnih sistema izuzetno složene, i da je fazno ponašanje uslovljeno velikim brojem faktora, dok uvođenje svake nove komponente u sistem daje dodatni stepen slobode koji utiče na fazno ponašanje. Van okvira mikroemulzione oblasti nema dovoljne količine surfaktanta (i kosurfaktanta) koja bi omogućila spontano nastajanje mikroemulzija.



Slika 1.8. Šematski prikaz hipotetičkog pseudo-ternarnog faznog dijagrama za sistem vodena faza/uljana faza/surfaktant-kosurfaktant, sa obeleženim različitim mikroemulzionim regionima.

U ovim slučajevima mikroemulzije mogu da postoje u ravnoteži sa viškom vodene ili uljane faze. U periodu između 1948. do 1950. godine Winsor je objavio seriju publikacija o osobinama smeša voda-ulje-amfifil [71]. Za višefazne oblasti na faznim dijagramima koje se nalaze van granica mikroemulzione oblasti široko je prihvaćena Winsor-ova terminologija [70]. Stoga se ovi sistemi jednostavno mogu opisati korišćenjem Winsor-ove klasifikacije koja se može koristiti na sledeći način [68, 70]:

Winsor I – U/V mikroemulzija u ravnoteži sa uljanom fazom u višku;

Winsor II – V/U mikroemulzija u ravnoteži sa vodenom fazom u višku;

Winsor III – trofazni sistem koji se sastoji od bikontinuirane mikroemulzije u ravnoteži sa uljanom i vodenom fazom u višku;

Winsor IV – makroskopski, homogene, jednofazne mikroemulzije bez viška faza.

Konstruisanje (pseudo-)ternarnih faznih dijagrama može se vršiti na dva načina:

- i) pravljenjem velikog broja uzoraka različitog sastava, ili
- ii) titracijom binarne ili pseudo-binarnе smeše trećom komponentom.

Ukoliko nastala smeša brzo postigne stanje ravnoteže, obe metode daju uporedive rezultate. Najčešće se za konstruisanje faznih dijagrama, koristi metoda titracije vodom, gde se smeša uljane faze i surfaktanta (i kosurfaktanta) titrira malim količinama vodene faze a rezultujuće smeše se posmatraju vizuelno ili polarizacionim mikroskopom. Međutim, ukoliko je neophodno duže vreme za postizanje stanja ravnoteže, favorizuje se korišćenje prve metode s obzirom da kontinuirano dodavanje treće (pseudo-)komponente može onemogućiti identifikaciju stanja za koje je neophodno vreme za postizanje stanja ravnoteže [68]. Imajući u vidu ekonomski faktor (tj. potrošnju velike količine ekscipijenasa) kao i vremenski aspekt, postoje veliki naponi da se konstrukcija faznih dijagrama pojednostavi primenom različitih tehnika: veštačkih neuronskih mreža [73-75] ili eksperimentalnog dizajna [76].

1.3.5. Kritična uloga surfaktanta (i kosurfaktanta)

Različiti surfaktanti se mogu koristiti za nastajanje i stabilizaciju jednofaznog mikroemulzionog sistema (*Winsor IV*): i) nejonski; ii) amfoterni; iii) katjonski; ili iv) anjonski. Često, kombinacijom različitih surfaktanata dolazi do povećanja mikroemulzionog regiona na faznim dijagramima. U cilju pravilnog izbora surfaktanata, uloženi su značajni naponi kako bi se definisale ključne osobine surfaktanata kao što su **hidrofilno-lipofilna ravnoteža/balans (HLB)** i **kritičan parametar pakovanja (CPP)**.

• *Hidrofilno-lipofilna ravnoteža*

HLB vrednost površinski aktivne materije ukazuje na afinitet za uljanu, odnosno vodenu fazu. U zavisnosti od udela i vrste polarnih i nepolarnih grupa u molekulu,

amfifili mogu imati HLB vrednost od 0 do 20, pri čemu vrednost od 0 do 10 ukazuje na veći afinitet ka uljanoj fazi (lipofilne površinski aktivne materije), dok HLB između 10 i 20 ukazuje na veći afinitet prema vodenoj fazi (hidrofilne površinski aktivne materije) [59].

• *Kritičan parametar pakovanja*

Kada se molekuli amfifila nađu u vodenom medijumu, oni se orijentišu na granici dve faze (u ovom slučaju voda/vazduh) smanjujući površinski napon na granici dve faze. Sa povećanjem koncentracije amfifila, dolazi do zasićenja međupovršine voda/vazduh, te samim tim dolazi do formiranja agregata (micela) u unutrašnjosti vodenog medijuma, kako bi se postiglo stanje sa minimumom slobodne energije. Do formiranja micela dolazi kada se međupovršinski sloj zasiti molekulima amfifila, i ta tačka se naziva kritična micelarna koncentracija (CMC). Nastali agregati, mogu biti različitog oblika, koji zavisi od geometrije molekula amfifila, a to se može opisati i kritičnim parametrom pakovanja (CPP) prikazanim u Jednačini 1.4:

$$CPP = \frac{V}{l_a a} \qquad \text{Jednačina 1.4}$$

gde je V – volumen (zapremina) hidrofobnog dela amfifila (nepolarnog repa), l – dužina alkil lanca, a – optimalna površina poprečnog preseka hidrofilnog dela molekula (polarne glave). Parametar l se često predstavlja kao l_c , što označava kritičnu dužinu hidrofobnog lanca koja najčešće čini 70 – 80% ukupne dužine. Navedeni parametri definišu kritičan radijus zakrivljenosti, i shodno tome oblik nastalog agregata. Kada je $CPP < 1/3$, formiraće se sferne micelle. To je slučaj kod surfaktanata sa jednim hidrofobnim lancem i jednostavnom jonskom ili nejonskom polarnom glavom. U slučaju $1/3 \leq CPP \leq 1/2$, nastaju cilindrične strukture, a ukoliko je $CPP \sim 1$, nastaje lipidni dvosloj. Kada se molekuli amfifila nađu u nepolarnom medijumu obrazovaće se reverzne micelle ($CPP > 1$) u kojima su molekuli amfifila organizovani tako da su hidrofobni regioni okrenuti ka nepolarnom medijumu, a polarne glave ka sredini reverzne micelle [59, 77].

Najveći broj PAM od interesa za formulaciju farmaceutskih preparata se sastoje od jednog hidrofobnog lanca i jonske ili nejonske hidrofilne glave. U velikom broju slučajeva jednolančani surfaktanti ne mogu samostalno da smanje međupovršinski

napon u meri koja omogućava spontano formiranje mikroemulzija, te je, shodno tome, za spontano nastajanje mikroemulzija neophodno i prisustvo kosurfaktanta. Upotreba alkohola dovodi do dodatnog smanjenja međupovršinskog napona, povećavajući fluidnost međusloja, i shodno tome i entropiju sistema. Takođe, dodatak alkohola povećava mobilnost ugljovodoničnih lanaca omogućavajući veći stepen penetracije uljane faze u međupovršinski film. Treba imati u vidu da dodatak alkohola, usled preraspodele između uljane i vodene faze, menja i njihove osobine rastvorljivosti. Sve ovo ukazuje da dodatak alkohola jednolančanim molekulima surfaktanta olakšava formiranje mikroemulzija [59]. Iako prisustvo alkohola može dovesti do iritacije kože, njegovom primenom se smanjuje ukupna količina surfaktanta neophodna za stabilizaciju mikroemulzija, čime se može postići bolji bezbednosni profil nosača [78].

Generalno, na sobnoj temperaturi, amfifili (i jonski i nejonski) imaju veću rastvorljivost u vodenoj nego u uljanoj fazi. Međutim, sa povećanjem termalne energije, može se uočiti značajna razlika između nejonskih i jonskih amfifila: i) sa povećanjem temperature, u skladu sa Winsor-ovim predviđanjem, dolazi do značajnog smanjenja rastvorljivosti nejonskih surfaktanata u vodenoj fazi, dok ii) u slučaju jonskih amfifila dolazi do povećanja rastvorljivosti [71].

1.3.6. Potencijal mikroemulzija da povećaju penetraciju lekovite supstance u/kroz kožu

Pored značaja poznavanja fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, već je spomenuto da sam nosač, tj. formulacija, može da utiče na penetraciju/permeaciju supstance, različitim mehanizmima poput delipidizacije, dehidratacije, fluidizacije, razaranja dezmozoma u SC, kao i uticajem na rastvorljivost i raspodelu lekovite supstance u SC [55]. Iako je u naučnoj zajednici prihvaćeno da mikroemulzije povećavaju penetraciju lekovitih supstanci, i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi koji do toga dovode [62, 69]. Bez obzira na unutrašnju strukturu (V/U, U/V ili bikontinuirane), mikroemulzije nisu rigidni sistemi, već imaju dinamički karakter, kao što je opisano u poglavlju 1.3.3. Fluktuacije unutar mikroemulzija i fluidnost međupovršinskog filma utiču na mobilnost lekovite supstance u nosaču, a samim tim i na njeno oslobađanje i posledično na biološku raspoloživost [62, 69, 79]. Fizičko-hemijski fenomeni kao što su nizak međupovršinski napon, velika fluidna

međupovršina, i visok solubilizacioni kapacitet su posebno izraženi u slučaju bikontinuiranih mikroemulzija, dajući često prednost ovom tipu mikroemulzija u formulaciji preparata namenjenih za primenu na koži u odnosu na kapljične vrste. Smatra se da velika međupovršina i izuzetno nizak međupovršinski napon doprinose povećanju penetracije lekovite supstance iz nosača tipa mikroemulzija [62, 69, 80]. Naime, veoma nizak međupovršinski napon je odgovoran za odlične vlažeće osobine ovih sistema, obezbeđujući na taj način veliku kontaktnu površinu između nosača i kože, što dovodi do kvašenja i najsitnijih pora kože nosačem [68, 69]. Takođe, razmatran je i direktan transport lekovite supstance iz mikroemulzija u SC – mala veličina kapi obezbeđuje veliku površinu za transport lekovite supstance direktno u kožu [68].

Pretpostavlja se da je mehanizam povećane penetracije udružen sa različitim faktorima na koji utiču, kako sastav, tako i hemijska struktura komponenata i unutrašnja struktura sistema. Iako se verovalo da je koncentracija surfaktanta veoma važan faktor, veliki broj istraživačkih grupa je pokazao da taj stav nije u potpunosti opravdan, s obzirom da povećanje koncentracije surfaktanta nije uvek dovelo do povećanja fluksa lekovite supstance [62, 81]. Interesantno, čak može doći i do obrnutog fenomena, isključujući na taj način uticaj surfaktanta na barijerna svojstva SC, koji se često navodio kao glavni faktor koji doprinosi povećanju penetracije lekovite supstance iz nosača tipa mikroemulzija [62]. Takođe, količina vode u mikroemulzijama je prepoznata kao važan faktor – pri niskom sadržaju vode svi molekuli vode su vezani za polarne glave surfaktanata te stoga nisu dostupni za učestvovanje u penetraciji kroz kožu. Stoga, neophodna količina vode zavisi od prirode surfaktanta i kosurfaktanta, kao i od stepena i sposobnosti vezivanja molekula vode za polarne glave amfifila [62]. Iako se prvobitno pretpostavilo da se ovo može primeniti samo na hidrofilne lekovite supstance, permeabilnost lipofilnih supstanci takođe zavisi od sadržaja vode, ali se pretpostavlja da u ovom slučaju hidratacija SC nosačem (tj. mikroemulzijom) ima ključnu ulogu [62, 69]. Dakle, može se zaključiti da niža koncentracija surfaktanta i veći udeo vodene faze imaju pozitivan uticaj na isporuku lekovitih supstanci u dublje slojeve kože. Iako su mnogi istraživači pokazali da visok surfaktant-kosurfaktant odnos ima pozitivan uticaj na fluks lekovite supstance [82, 83], drugi istraživači su pokazali suprotan uticaj [62].

Pored uticaja mobilnosti, visok solubilizacioni kapacitet mikroemulzija za lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih osobina (lipofilne, hidrofilne i amfifilne) je veoma važan faktor koji doprinosi povećanju dermalne/transdermalne isporuke. Ukoliko je postignuta maksimalna termodinamička aktivnost, visok koncentracioni gradijent predstavlja silu koja je odgovorna za povećan transport lekovite supstance [62]. Dodatno, ne treba isključiti i uticaj komponenata mikroemulzija na isporuku lekovitih supstanci, s obzirom da prisustvo pojačivača penetracije značajno utiče na penetraciju kroz/u kožu. Pored toga, komponente mikroemulzija mogu da prođu u kožu kao monomeri i da na taj način povećaju rastvorljivost lekovite supstance u koži. U tom slučaju može se stvoriti visok koncentracioni gradijent u koži između površinskih i dubljih slojeva, koji predstavlja pokretačku silu za transdermalnu resorpciju lekovite supstance.

1.3.7. Potencijal mikroemulzija za dermalnu/transdermalnu isporuku NSAIL

Karakteristike mikroemulzija zavise od tipa surfaktanta i kosurfaktanta, ali i od tipa uljane i sastava vodene faze, u koju se mogu dodati puferi, penetracioni inhenseri, konzervansi, itd. Pažljivim odabirom ekscipijenasa, mogu se formulirati mikroemulzije za različite puteve primene – dermalni/transdermalni, okularni, oralni, i intravenski. Brojni istraživači su ispoljili interes za proučavanje mikroemulzija kao potencijalnih nosača za lekovite supstance. Već su napomenute prednosti ovakvih sistema za dermalni i transdermalni put primene, pogotovo kada je reč o hroničnoj terapiji. Posebno je značajno istaći lagodnost prilikom primene preparata na koži, kao i stabilnost koja se obezbeđuje hemijski i enzimski osetljivim lekovitim supstancama, uz poboljšanje biofarmaceutskih aspekata primenom mikroemulzionih nosača.

Distribucija lekovite supstance u mikroemulzionom nosaču zavisi od njenih fizičko-hemijskih karakteristika, tj. od afiniteta lekovite supstance prema uljanoj ili vodenoj fazi, ili prema međufaznom sloju amfifila. U naučnoj literaturi se mogu naći raznovrsni rezultati koji ukazuju da je oslobađanje lekovite supstance iz nosača uslovljeno tipom mikroemulzija. U slučaju U/V mikroemulzija, liposolubilne aktivne supstance mogu biti rastvorene u uljanoj fazi, te im je oslobađanje sporije, i zavisi od vodeno/lipidne raspodele. Hidrosolubilne lekovite supstance su najvećim delom rastvorene u vodenoj fazi, te su, samim tim, odmah dostupne na mestu primene i oslobađanje im je brže kada

su inkorporirane u U/V mikroemulzije. Kod V/U mikroemulzija, liposolubilne supstance se oslobađaju brže, jer su dominantno rastvorene u kontinuiranoj, uljanoj fazi, dok su hidrosolubilne supstance lokalizovane u jezgru kapi unutrašnje faze i sporije se oslobađaju. Nasuprot tome, lekovita supstanca se oslobađa brzo iz bikontinuiranih mikroemulzija usled visoke fluidnosti međupovršinskog sloja, i činjenice da se uljana i vodena faza međusobno prožimaju bez postojanja jasno definisane unutrašnje i spoljašnje faze, što omogućava da je supstanca dostupna na mestu primene, nezavisno od vodeno/lipidne raspodele. S obzirom na već ukazan značaj lokalne primene NSAIL u terapiji reumatoidnih bolesti, ne čudi što su mnoge istraživačke grupe proučavale primenu mikroemulzija kao koloidnih nosača za dermalnu/transdermalnu isporuku različitih model lekovitih supstanci iz grupe NSAIL: flurbiprofen [84, 85], tenoksikam [86], diklofenak-natrijum [87-92], diklofenak-dietilamin [93-95], diklofenak-epolamin [96], aceklofenak [49, 50, 97, 98], indometacin [99, 100], ibuprofen [101-103], ketoprofen [81, 104-109], naproksen [110, 111], meloksikam [112, 113], piroksikam [114, 115], celekoksib [116, 117], etodolak [118], flufenaminska kiselina [119, 120], nifluminska kiselina [79], rofekoksib [121], i dr².

U odnosu na mnogobrojne *in vitro* i *ex vivo* studije, posebnu pažnju treba posvetiti *in vivo* podacima koji ukazuju na poboljšanje biofarmaceutskih/farmakokinetičkih ili farmakodinamskih karakteristika nakon inkorporiranja NSAIL u koloidni nosač tipa mikroemulzija. Naime, u *in vivo* studijama pokazana je veća efikasnost (permeacija, antiinflamatorni efekat) mikroemulzija sa etodolakom [118] i tenoksikamom [86] u odnosu na konvencionalnu formulaciju. Takođe, pokazana je i antiinflamatorna efikasnost mikroemulzija sa ibuprofenom [101], diklofenak-epolaminom [96], diklofenak-natrijumom [90], ketoprofenom [109], flurbiprofenom [84] i aceklofenakom [49] u *in vivo* testu nakon intraplantarne injekcije karagenina na pacovima *Wistar* soja. U farmakodinamičkoj studiji na dobrovoljcima muškog pola pokazana je efikasnost mikroemulzija sa aceklofenakom u testu odložene mišićne osetljivosti u poređenju sa kontrolnom grupom [50]. Takođe, antiinflamatorna efikasnost mikroemulzija sa ibuprofenom potvrđena je testom zagrejane ploče na miševima [102], dok je antiinflamatorna efikasnost mikroemulzija sa celekoksibom potvrđena na miševima

² Dat je prikaz samo nekih referenci u kojima je proučavana primena mikroemulzija kao koloidnih nosača za dermalnu/transdermalnu isporuku različitih model lekovitih supstanci iz grupe NSAIL.

nakon indukcije zapaljenja injekcijom arahidonske kiseline [116]. Takođe Sintov i saradnici [89] su pokazali da su koncentracije diklofenaka u krvi nakon lokalne primene mikroemulzija veće u odnosu na koncentracije nakon primene komercijalno dostupnog preparata. Sve ovo, nedvosmisleno opravdava dalja istraživanja sa ciljem formulacije mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku NSAID, kako bi se smanjili neželjeni efekti, a postigle terapijske koncentracije na ciljnom mestu delovanja, sa posebnim osvrtom na bezbednost i efikasnost primene ovakvih formulacija u specifičnim ciljnim grupama kao što su deca i gerijatrijska populacija [122].

1.4. Nejonski surfaktanti u formulaciji mikroemulzija

Veliki broj surfaktanata ima oprečan bezbednosni profil (tj. ima potencijal da izazove iritaciju kože), pri čemu treba imati na umu da je iritacioni potencijal uslovljen fizičko-hemijskim karakteristikama amfifila – anjonski surfaktanti imaju najveći potencijal da dovedu do iritacije, dok je rizik u slučaju katjonskih surfaktanata nešto niži, ali svakako nije zanemarljiv. Sa druge strane, **nejonski surfaktanti** su u većem stepenu biokompatibilni, imaju nizak toksični potencijal, a takođe i nizak rizik za iritaciju kože, te se stoga ovim ekscipijensima daje prednost u formulaciji preparata za primenu na koži [123, 124]. Istraživanja u oblasti nejonskih surfaktanta počela su nakon razvoja prvog komercijalnog alkil-fenol-poliglikoletra tokom četrdesetih godina prošlog veka [123]. Za razliku od jonskih, nejonski surfaktanti su kompatibilni sa velikim brojem ekscipijenasa i njihove osobine ne zavise od pH vrednosti s obzirom da su nenaelektrisani. Osim toga, oni predstavljaju najraznovrsniju grupu amfifila u pogledu hemijske strukture, osobina i mogućnosti primene. HLB vrednost nejonskih surfaktanata varira u opsegu od 0 do 20, što ukazuje na raznovrsnost strukture i međupovršinskih osobina. Sve ovo je podstaklo povećanu upotrebu nejonskih surfaktanata u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji [124].

Najčešće korišćeni nejonski surfaktanti su **etoksilovani surfaktanti**: etoksilovani alkoholi, etoksilovani sorbitanski estri, etoksilovani monoalkaloamidi, etoksilovani alkil-fenoli, etoksilovani amini masnih kiselina, etilenoksid-propilenoksid blok kopolimeri. Osim etoksilovanih surfaktanta, kod kojih je hidrofilna glava sastavljena od polietilenoksida, sve više se koriste i **polihidroksilni surfaktanti**, koji se dobijaju zamenom etilenoksidne grupe hidroksilnim grupama. Uobičajeni hidrofilni delovi u

strukturi polihidroksilnih surfaktanata su glicerol, ugljeni hidrati i njihovi alkoholi, i glikoli. U zavisnosti od strukture hidrofилne glave, razlikuje se nekoliko grupa polihidroksilnih surfaktanata: glikolni estri, glicerol (i poliglicerolski) estri, glukozidi (i poliglukozidi), i šećerni estri [63, 125].

Imajući u vidu visoke koncentracije amfifila u mikroemulzijama nameće se potreba za korišćenje nejonskih surfaktanata/kosurfaktanata koji su bezbedni za kožu [62, 69]. U tom kontekstu, kako bi se postigao zadovoljavajući bezbednosni profil mikroemulzija, važan cilj ka kome se teži jeste i da se uz upotrebu što nižih koncentracija surfaktanata/kosurfaktanata formulišu mikroemulzije koje ispunjavaju farmaceutsko-tehnološke i biofarmaceutske zahteve. Shinoda i Saito [126] su prvi proučavali ponašanje ternarnog nejonskog mikroemulzionog sistema u zavisnosti od promena temperature. Naime, pokazano je da sa povećanjem temperature dolazi do značajnog smanjenja rastvorljivosti nejonskog surfaktanta u vodenoj fazi, pa je na visokim temperaturama uljana faza spoljašnja (kontinuirana), na niskim temperaturama je vodena faza kontinuirana, a na temperaturama blizu temperature fazne inverzije (PIT) prisutan je bikontinuirani sistem [126]. Nakon toga, Shinoda i saradnici su utvrdili da na kritičnoj temperaturi (PIT) dolazi do inverzije U/V emulzija koje su stabilizovane nejonskim surfaktantima. Treba imati u vidu da je nejonski surfaktant (polioksi-etilen-nonilfeniletar) koji je korišćen u ovom ispitivanju iz grupe etoksilovanih surfaktanata. Vrednost PIT zavisi od HLB vrednosti surfaktanta, i ima veliki uticaj na stabilnost sistema. Shodno tome, veličina kapi emulzionog sistema zavisi od HLB i PIT vrednosti surfaktanta. Kapi su podložne koalescenciji na temperaturama bliskim PIT, ali se hlađenjem može dobiti stabilan sistem. Emulzije koje se dobijaju na temperaturi odmah ispod PIT, a zatim hlađenjem imaju manje veličine kapi. To se može objasniti pojavom da se međupovršinski napon smanjuje sa povećanjem temperature, dostižući minimum kada je temperatura blizu PIT, nakon čega počinje da raste. Shodno tome, manje kapi emulzija se dobijaju na temperaturi blizu PIT, pre nego na niskim temperaturama. Iako su ove kapi na temperaturi blizu PIT relativno nestabilne jer teže koalescenciji, hlađenjem se može zadržati mala veličina kapi, a sistem ostaje stabilan [125]. U literaturi se mogu naći brojni nejonski surfaktanti koji se koriste u formulaciji mikroemulzija za primenu na koži, a koji će biti navedeni u narednim poglavljima etoksilovanih ili polihidroksilnih surfaktanta.

1.4.1. Etoksilovani surfaktanti

Tradicionalno korišćeni nejonski surfaktanti za formiranje mikroemulzija se dobijaju postupkom etoksilacije [62]. Iako su kao surfaktanti nejonskih mikroemulzija tradicionalno korišćeni **etoksilovani sorbitanski estri masnih kiselina** (polisorbati – Tween[®]-ovi), u poslednje dve decenije istraživačke grupe koriste različite etoksilovane amfifile kao surfaktante za formulaciju nejonskih mikroemulzija, od kojih se mogu izdvojiti **etoksilovani estri masnih alkohola** (npr. Labrasol[®] [81, 83, 93-96, 98, 101, 103, 105, 110, 111, 115, 127], Solutol[®] [128, 129]); **etoksilovani masni alkoholi** (npr. Brij[®] [87, 88, 130-134]); **etoksilovani glicerolski estri masnih alkohola** (npr. Tagat[®] [135-137]); i **polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri** (npr. Pluronic[®]/Poloxamer[®] [138, 139])³. U određenom broju literaturnih podataka PEG-ilovana ricinusova ulja, kao što su Cremophor RH – PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje [83, 104, 127] i Cremophor ELP/Cremophor EL – PEG-35 ricinusovo ulje [85, 97], su korišćena kao surfaktanti, iako se u najvećem broju radova ove PAM koriste kao kosurfaktanti. Treba naglasiti da postoji i značajan broj literaturnih podataka u kojima se ovi amfifili koriste kao surfaktanti u samomikroemulgujućim sistemima, što nije predmet proučavanja ove doktorske disertacije.

Polisorbati, najčešće korišćeni surfaktanti u formulaciji mikroemulzija, se dobijaju reakcijom etilenoksida sa bilo kojom preostalom hidroksilnom grupom sorbitanskog estra. Pored Tween[®]-a 80, koji je najčešće korišćeni polisorbat u formulaciji mikroemulzija namenjenih za primenu lekovitih supstanci iz grupe NSAIL⁴ na koži sa ciljem dermalne/transdermalne isporuke [82, 116, 140, 141], u sličnim ispitivanjima korišćeni su i Tween[®] 40 [106, 107], i Tween[®] 85 [113]. Iako se već dugi niz godina ovi surfaktanti koriste u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a takođe su odobreni kao aditivi hrani, postoji niz činjenica koje osporavaju njihovu primenu. Naime, smatra se da, iako blagi, etoksilovani surfaktanti nisu potpuno bezbedni kao polihidroksilni surfaktanti [125]. Tokom sinteze može doći do nastanka toksične komponente dioksana,

³ Dat je prikaz odabranih referenci u kojima je proučavana primena etoksilovanih surfaktanata za formulaciju nejonskih mikroemulzija.

⁴ Treba imati u vidu da su polisorbati (Tween[®] 20, Tween[®] 21, Tween[®] 40, Tween[®] 80, Tween[®] 85) korišćeni kao surfaktanti za izradu mikroemulzija za dermalnu/transdermalnu isporuku lekovitih supstanci/aktivnih principa različitih terapijskih grupa (npr. silimarin, resveratrol, adapalen, lidokain, kurkumin, difenhidramin, hidrokortizon i dr.), a da je u ovom delu doktorske disertacije naglašena primena polisorbata u formulaciji mikroemulzija sa NSAIL.

koji je neprihvatljiv usled svoje karcinogenosti [125]. Uobičajeno, etoksilovani surfaktanti se čuvaju na sobnoj temperaturi s obzirom da su na niskim temperaturama polučvrste konzistencije [142]. Pokazano je da etoksilovani surfaktanti (npr. polisorbitat 80) u prisustvu atmosferskog kiseonika (i na dnevnoj svetlosti i u mraku) podležu reakciji autooksidacije u kojoj nastaju brojni produkti koji mogu dovesti do iritacije kože [125, 142, 143].

1.4.2. Polihidroksilni surfaktanti

Polihidroksilni surfaktanti se dobijaju zamenom etilenoksidne grupe hidroksilnim grupama, te su, za razliku od etoksilovanih surfaktanata, ovi surfaktanti blaži, i manje skloni da dovedu do reakcija na koži. Vezivanjem različitih hidrofilnih i hidrofobnih delova u molekulu polihidroksilnih surfaktanata dobijaju se molekuli sa različitim HLB vrednostima što omogućava njihovu široku primenu u farmaceutskoj/kozmetičkoj industriji. Dodatno, rizik od degradacije i fotooksidacije je sveden na minimum usled odsustva etoksilovanog dela molekula. Polihidroksilni surfaktanti pokazuju i visok stepen biodegradabilnosti. Sve ove činjenice usmeravaju savremena istraživanja ka korišćenju surfaktanata koji ne sadrže molekul etilenoksida, a koji se dobijaju iz prirodnih i obnovljivih izvora [125]. Dakle, nejonski polihidroksilni surfaktanti poseduju unapređene dermatološke i ekološke osobine, zbog čega se danas sve više ističe značaj njihove primene u preparatima za primenu na koži. Kao što je već rečeno, uobičajeni hidrofilni delovi u strukturi polihidroksilnih surfaktanata su glicerol, ugljeni hidrati i njihovi alkoholi (npr. saharoza, glukoza, sorbitol) i glikoli, te stoga razlikujemo nekoliko grupa polihidroksilnih surfaktanata: glikolni estri, glicerol (i poliglicerolski) estri, glukozidi (i poliglukozidi), i šećerni estri (saharozni estri) [63]. Pored saharoznih estara, često su kao surfaktanti u formulaciji mikroemulzija za farmaceutsku primenu ispitivani **alkil glukozidi (i poliglukozidi)**: decil(poli)glukozid [144-147], kaprilno-kaprilski-glukozid [147, 148], lauril-glukozid [149], koko-glukozid [150, 151]⁵. U daljem delu ovog poglavlja biće opisani saharozni estri, s obzirom da su ovi nejonski surfaktanti predmet proučavanja ove doktorske disertacije.

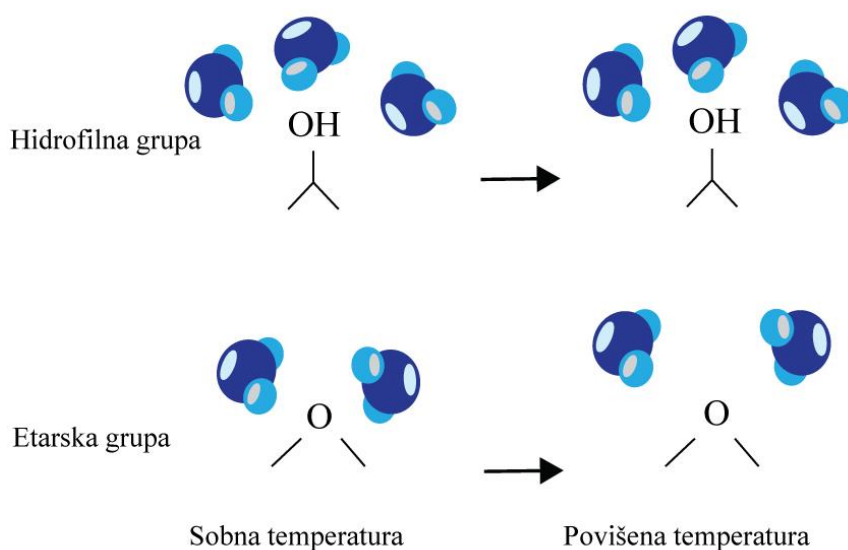
Iako se prve publikacije sa **saharoznim estrima** pojavljuju još sredinom pedesetih godina prošlog veka, pravo interesovanje za ove surfaktante počinje tek poslednje dve

⁵ Dat je prikaz odabranih referenci u kojima je proučavana primena polihidroksilnih surfaktanata za formulaciju nejonskih mikroemulzija.

decenije, nakon povećanja svesti istraživača o njihovoj biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i niskoj toksičnosti. Od 1959. godine saharozni monoestri su odobreni u Japanu kao aditivi u prehrambenoj industriji (E473) nakon čega su odobreni i u ostalim zemljama. Neki saharozni estri (saharoza monopalmitat i saharoza stearat) imaju svoje monografije u evropskoj farmakopeji [152], dok je veliki broj saharoznih estara (npr. saharoza laurat, saharoza miristat, saharoza palmitat, saharoza stearat, i dr.) uključen u Kozmetičku direktivu, pa se stoga mogu koristiti u kozmetičkim proizvodima na teritoriji Evropske unije [153]. Svakako, najveću primenu ovi surfaktanti nalaze u farmaceutskoj industriji, u formulacijama različitih konvencionalnih i naprednih sistema za isporuku lekova. Najveća prednost saharoznih estara je njihov metabolizam i biodegradabilnost posredstvom enzima esteraza prisutnih u ljudskom organizmu [154]. Pokazano je da se u ljudskom organizmu nesupstituisani saharozni estri, bez obzira na dužinu ugljovodoničnog lanca, degradiraju veoma brzo [155, 156]. Za razliku od etoksilovanih surfaktanata, nema rizika od nastanka štetnih produkata, s obzirom da se oni dobijaju iz obnovljivih sirovina, tj. esterifikacijom saharoze (hidrofilna grupa) sa masnim kiselinama (lipofilna grupa) [157]. Sa obzirom da molekul saharoze sadrži osam hidroksilnih grupa, najviše osam molekula masnih kiselina može biti vezano za jedan molekul saharoze. Variranjem broja masnih kiselina koje reaguju sa jednim molekulom saharoze, dobijaju se estri saharoze (mono-, di-, poliestri) sa različitim osobinama. Uobičajeno se esterifikacija saharoze vrši zasićenim masnim kiselinama različite dužine ugljovodoničnog lanca (npr. laurinska, miristinska, palmitinska, itd.) ili nezasićenim masnim kiselinama (npr. oleinska, linoleinska). Od tri primarne hidroksilne grupe, grupe na ugljenikovim atomima 6 i 6' su reaktivnije u odnosu na grupu na 1' ugljenikovom atomu ($6\text{-OH} \geq 6'\text{-OH} > 1'\text{-OH}$) [154]. Industrijski procesi sinteze nisu selektivni, te komercijalno dostupni saharozni estri predstavljaju kompleksne smeše koje se razlikuju po stepenu esterifikacije saharoze i dužini alkil lanca masnih kiselina [158]. Amfifilne osobine saharoznih estara potiču od hidrofilnih grupa saharoze i hidrofobnih ugljovodoničnih lanaca. Stepem esterifikacije i dužina ugljovodoničnog lanca utiču na fizičko-hemijske osobine (tačku topljenja, rastvorljivost), HLB vrednost i površinske osobine saharoznih estara. Lipofilne osobine rastu sa većim stepenom esterifikacije, te su tako estri saharoze sa visokim sadržajem monoestara hidrofilniji, dok su estri sa višim stepenom esterifikacije lipofilniji [159].

Stoga, može se zaključiti da na HLB vrednost saharoznih estara utiču: i) stepen esterifikacije, ii) dužina ugljovodoničnog lanca, i iii) stepen zasićenosti ugljovodoničnog lanca. Shodno tome, saharozni estri različite strukture, a samim tim i različitih fizičko-hemijskih i površinskih osobina, se mogu koristiti u brojnim farmaceutskim oblicima, što je prikazano u preglednom radu Szűts i Szabó-Révész [159]. U **Tabeli 1.3** je dat pregled saharoznih estara korišćenih u formulaciji mikroemulzija namenjenih za primenu na koži.

Za razliku od etoksilovanih surfaktanata, koji su osetljivi na promenu temperature (**Slika 1.9**) i/ili dodatak elektrolita [125], saharozni estri nisu. Saharozni estri su neosetljivi na temperaturu usled prisustva snažnih vodoničnih veza između saharoze i molekula vode koje sprečavaju dehidrataciju saharoznih estara na povišenoj temperaturi [125, 160]. Sa druge strane, za razliku od etoksilovanih surfaktanta, u slučaju saharoznih estara nema rizika od prisustva karcinogenih jedinjenja (npr. dioksana) s obzirom da se ova jedinjenja dobijaju esterifikacijom saharoze masnim kiselinama [161].



Slika 1.9. Interakcije saharoznih estara i etoksilovanih surfaktanata sa molekulima vode na sobnoj i povišenoj temperaturi.

Tabela 1.3. Pregled najčešće korišćenih saharoznih estara u formulaciji mikroemulzija namenjenih za primenu na koži.

Surfaktant/Kosurfaktant	Vodena faza	Uljana faza	Lekovita supstanca/ aktivni princip	Literatura
Saharoza laurat L-1695/etanol	Voda	Izopropilmiristat	Resveratrol i hlorogenska kiselina	[162]
Saharoza palmitat P-1570/etanol Saharoza oleat O-1570/etanol Saharoza palmitat P-1570/izopropanol Saharoza oleat O-1570/izopropanol	Voda	Izopropilmiristat	Resveratrol	[163]
Saharoza laurat L-1695/izopropanol Saharoza laurat L-1695 – lecitin LipoidS75/izopropanol	Voda	Izopropilmiristat	Flufenaminska kiselina, flukonazol	[150]
Saharoza laurat L-1695/etoksilovani monodigliceridi	Voda	Izopropilmiristat Izopropilmiristat – etanol	Diklofenak-natrijum	[91]
Saharoza laurat L-1695/etoksilovani monodigliceridi	Voda	R(+) limonen – etanol Izopropilmiristat – etanol	Diklofenak-natrijum	[92]
Saharoza laurat L-1695/etoksilovani monodigliceridi	Voda	R(+) limonen, R(+) limonen – etanol Izopropilmiristat – etanol	Diklofenak-natrijum	[164]
Saharoza laurat L-1695/etoksilovani monodigliceridi	Voda – propilenglikol	Izopropilmiristat – ulje peperminta	Cefaleksin	[165]
Saharoza laurat L-1695/Saharoza laurat L-595	Voda – propilenglikol	Izopropilmiristat	Hidrokortizon	[137]
Saharoza monolaurat – saharoza dilaurat/alkohol srednje dužine lanca	Voda	Oktiloktanoat	Nifluminska kiselina	[79]

1.4.3. Potencijal za povećanje penetracije u/kroz kožu lekovitih supstanci primenom surfaktanta

Uprkos brojnim prednostima lokalno primenjenih farmaceutskih preparata na koži, dermalna/transdermalna isporuka lekovite supstance zahteva pažljiva razmatranja kako fizičko-hemijskih osobina supstance, tako i strukture i sastava formulacije. Perkutana permeacija sadrži nekoliko koraka: i) oslobađanje lekovite supstance iz nosača, ii) prelazak u SC, iii) difuziju kroz SC i dalje u dublje slojeve kože. Kao što je već objašnjeno, postoje brojne strategije za prevazilaženje problema neadekvatne isporuke lekovite supstance nakon primene na koži. Treba imati u vidu da se formulacija/nosač sastoji iz različitih komponenata koje mogu imati uticaj na barijerna svojstva kože i/ili na raspodelu lekovite supstance u SC. Jedan od načina za prevazilaženje problema loše dermalne/transdermalne isporuke je primena **hemijskih penetracionih inhensera** (ubrzivači/pojačivači penetracije, promoteri apsorpcije), supstanci koje povećavaju penetraciju lokalno primenjenih supstanci [55, 166]. Penetracioni inhenseri su supstance koje se raspodeljuju u SC, i interaguju sa komponentama SC, povećavajući penetraciju/permeaciju supstanci. Naime, ove supstance reverzibilno utiču na barijerne osobine kože, tj. na otpor SC ka penetraciji lekovite supstance, omogućavajući na taj način da lekovita supstanca prodre do dubljih slojeva kože ili u nekim slučajevima u sistemsku cirkulaciju. I pored brojnih prednosti (npr. fleksibilnost, jednostavnost primene, inkorporiranje u jednostavne formulacije) postoje i određena ograničenja hemijskih penetracionih inhensera: i) neke od ovih supstanci dovode do iritacije kože, ii) mogu imati malu efikasnost, iii) nisu efikasni za isporuku makromolekula [166]. Shodno tome, da bi se neka supstanca koristila kao hemijski penetracioni inhenser mora da zadovolji sledeće kriterijume:

- ne sme da iritira kožu, da izazove alergije ili da bude toksična,
- mora da ima brz, ali predvidiv efekat,
- ne sme da bude farmakološki aktivna,
- treba da ima jednosmernu funkciju, tj. da poveća penetraciju lekovite supstance u/kroz kožu ali ne sme da dođe do gubitka endogenih komponenata iz kože,
- nakon njenog uklanjanja normalna funkcija kože mora brzo da se povрати,

- treba da bude bezbojna,
- treba da bude kompatibilna sa lekovitom supstancom i ostalim komponentama u formulaciji,
- treba da bude kozmetički prihvatljiva nakon primene na koži.

I pored dostupnosti velikog broja ekscipijenasa različite strukture i fizičko-hemijskih osobina, naučnici i dalje tragaju za supstancom koja može da ispuni sve ove kriterijume. Strukturna klasifikacija hemijskih penetracionih inhensera je prikazana u **Tabeli 1.4** [166].

Kada su u pitanju koloidni sistemi, izbor surfaktanata može biti od ključne važnosti, ne samo za stabilnost sistema, već i za uticaj na biološku raspoloživost lekovite supstance. Međutim, rizik od iritacije i toksičnosti ograničava primenu pojedinih surfaktanata u preparatima namenjenim za primenu na koži. Treba imati u vidu da surfaktanti mogu da smanje termodinamičku aktivnost lekovite supstance, i da, shodno tome, negativno utiču na penetraciju/permeaciju kroz SC. Jonski surfaktanti interaguju i sa keratinom i sa lipidnim matriksom SC. Međutim, katjonski i anjonski surfaktanti osim povećanja penetracije dovode i do značajnih oštećenja kožne barijere. Za razliku od njih, nejonski surfaktanti imaju povoljniji bezbednosni profil, ali se smatra da je njihova efikasnost manja. Barry [167] je predstavio tri moguća mehanizma delovanja penetracionih inhensera: i) *modifikacija lipida* (oštećenje intercelularnog lipidnog dvosloja), ii) *modifikacija proteina* (interakcija sa proteinima SC), iii) *promocija raspodele* (povećanje raspodele lekovite supstance, korastvarača ili koinhensera u SC). Smatra se da je uticaj nejonskih surfaktanata na denaturaciju proteina izuzetno mali, i da je redosled jačine tog efekta sledeći: anjonski > katjonski > *zwitter*-jonski > aminooksidi > nejonski surfaktanti [55].

Tabela 1.4. Klasifikacija hemijskih penetracionih inhensera na osnovu strukture (prilagođeno na osnovu [166]).

Klasa hemijskih penetracionih inhensera	Potklasa	Primer
Alkoholi	Kratkolančani alkoholi	Etanol Izopropanol
	Dugolančani alkoholi	Dekanol Oktanol
	Glikoli	Propilenglikol
Amidi	Ciklični amidi	Azone [®]
Masne kiseline	/	Laurinska, oleinska, linoleinska kiselina
Estri	Alkil estri	Etilacetat Butilacetat Metilacetat
	Estri masnih kiselina	Izopropilmiristat Izopropilpalmitat
Etri	/	Transcutol [®]
Surfaktanti	Anjonski surfaktanti	Natrijum-lauril sulfat
	Katjonski surfaktanti	Benzalkonijum-hlorid Cetilpiridinijum-hlorid Cetiltrimetilamonijum-bromid
	Zwitter-jonski surfaktanti	Dodecil betain
	Nejonski surfaktanti	Polisorbati (npr. Tween[®] 80) Saharozni estri (npr. saharoza laurat)
Sulfoksidi i analozi	/	Dimetilsulfoksid (DMSO) Decilmetilsulfoksid (DCMS)
Ulja	/	Ulje eukalptusa
Terpeni i njihovi derivati	/	d-Limonen l-Mentol 1,8-Cineol
Pirolidini	/	N-metil-1-2-pirolidon (NMP) 2- pirolidon
Oksazolidini	/	4-deciloksazolidin-2-on
Fosfolipidi	/	Fosfatidilholin
Enzimi	/	Kisela fosfataza Papain Fosfolipaza C

Nejonski surfaktanti utiču na penetraciju lekovitih supstanci na sledeće načine: i) na lipidnom nivou povećavaju fluidnost lipida i mogu dovesti do solubilizacije i ekstrakcije lipida, ii) na nivou proteina interaguju sa keratinskim filamentima korneocita, iii) i utiču na termodinamičku aktivnost lekovite supstance [166]. Pokazano je da polisorbati, kao nejonski surfaktanti, povećavaju penetraciju velikog broja lekovitih supstanci [55]. Takođe, postoje dokazi da saharozni estri povećavaju penetraciju lekovitih supstanci interakcijom sa lipidima SC [168], te će stoga, u ovoj doktorskoj disertaciji posebna pažnja biti usmerena ka proučavanju ovog mehanizma povećanja penetracije lekovitih supstanci.

Saharozni estri kao penetracioni inhenseri

Efikasnost surfaktanata kao penetracionih inhensera zavisi od njihove strukture, dužine hidrofobnog alkil lanca, hidrofilne glave, i polarnosti surfaktanta [55, 166]. Pretpostavljeni mehanizam interakcije saharoznih estara sa SC-om je interakcija sa lipidima, tj. umetanje ugljovodoničnog lanca između lipofilnih lanaca lipida SC što dalje omogućava interakciju saharoznog dela molekula sa hidrofilnim grupama lipida SC. Ove interakcije utiču na formiranje vodoničnih i jonskih veza, hidrataciju polarnih grupa, dovodeći na taj način do fluidizacije lipida SC [158]. I pored brojnih studija koje proučavaju saharozne estre kao penetracione inhensere (**Tabela 1.5**), vrlo ograničen broj studija proučava sam mehanizam povećanja penetracije lekovitih supstanci [158].

Svakako jedna od najznačajnijih studija o uticaju saharoznih estara na SC je sprovedena od istraživačke grupe Ayala-Bravo i saradnika [168], koji su nakon jednočasovne primene ispitivanih formulacija izvršili analizu traka dobijenih metodom sa trakama uz pomoć atenuisane ukupne refleksije-infracrvene spektroskopije udružene sa Furijeovom transformacijom (ATR-FTIR). Rezultati ove studije su pokazali pomeranje asimetričnih i simetričnih metilenskih vibracija udruženo sa smanjenim intenzitetom ovih vibracija što su pripisali fluidizaciji i ekstrakciji lipida SC, što je zajedno dovelo do povećanja penetracije 4-hidroksibenzonitrila, model supstance korišćene u ovoj studiji.

Tabela 1.5. Saharozni estri kao penetracioni inhenseri u konvencionalnim i naprednim sistemima.

Saharozni estar	Lekovita supstanca	Nosač	Literatura
Saharozni estar	Bromheksin	Mast	[169]
Saharoza laurat L-1695	Ciklosporin A	Gel	[170]
Saharoza laurat L-1695	Estradiol	Gel	[171]
Saharoza monolaurat, Saharoza dilaurat	Nifluminska kiselina	Mikroemulzije	[79]
Saharoza laurat L-595, Saharoza laurat L-1695	Hidrokortizon	Mikroemulzije	[137]
Saharoza laurat L-595	Apomorfin	Elastične vezikule	[172]
Saharoza laurat L-595	Pergolid	Elastične i rigidne vezikule	[173]
Saharoza laurat L-595	Lidokain	Elastične i rigidne vezikule	[174]
Saharozni estar J-1216, Saharozni estar J-1205 Saharozni estar J-1616, Saharozni estar J-1805 Saharozni estar J-1807, Saharozni estar J-1816	Lidokain, Ketoprofen	Rastvor	[175]
Saharoza oleat O-1570, Saharoza laurat L-1695	4-Hidroksibenzonitril	Rastvor	[168]
Saharoza laurat L-1695, Saharoza oleat O-1570	Lidokain-hidrohlorid	Rastvor	[176]
Saharoza laurat L-1695, Saharoza oleat O-1570	Oktilmetoksicinamat	Emulzije, nanoemulzije i nanokapsule	[177]
Saharoza stearat S-370, Saharoza stearat S-970 Saharoza stearat S-1670, Saharoza oleat O-1570 Saharoza palmitat P-1670, Saharoza laurat L-1695 Saharoza miristat M-1695	Metoprolol-tartrat	Transdermalni terapijski sistem (flaster)	[178]
Saharoza laurat L-1695	Diklofenak	Micelarni sistem	[179]
Saharoza erukat ER190, Saharoza erukat ER290	Diklofenak-natrijum	Nanodisperzija	[180]

Saharoza erukat ER290	Proteini	Nanodisperzija	[181]
Saharoza kokoat	Sulfadiazin-natrijum	Niosomi	[182]
Saharoza stearat S-1670, Saharoza stearat S-970 Saharoza stearat S-370, Saharoza laurat L-1695 Saharoza miristat M-1695, Saharoza palmitat P-1670	Timolol-maleat	Transdermalni flasteri	[183]
Saharoza laurat L-595, Saharoza laurat L-1695 Saharoza stearat S-1570, Saharoza oleat O-1570	Propofol	Rastvor	[184]
Saharoza kokoat	Hidrohinon Oktadecendikarboksilna kiselina	Emulzija	[185]
Saharoza stearat S-970	Progesteron	Nanoemulzija	[186]
Saharoza kokoat	Diklofenak-natrijum Sulfadiazin-natrijum	Niosomi	[187]
Saharoza laurat J-1216	Lidokain	Rastvor	[188]
Saharoza laurat D-1216	Ibuprofen	Gel	[155, 189]
Saharoza stearat S-970	Flufenaminska kiselina, diklofenak, kurkumin	Nanoemulzije i emulzije	[190]
Saharoza stearat S-970	Flufenaminska kiselina, fludrokortizonacetat, flukonazol, minoksidil	Nanoemulzije	[191]
Saharoza laurat L-1695, Saharoza miristat M-1695 Saharoza palmitat P-1670, Saharoza stearat S-370, Saharoza stearat S-970, Saharoza stearat S-1670	Vinpocetin	Proniosomi	[192]
Saharoza stearat S-970	Fluorescein-natrijum Kurkumin	Nanoemulzije i emulzije	[193]
Saharoza laurat D-1216, Saharoza palmitat P-1670 Saharoza stearat S-1670	Mefenaminska kiselina	Čvrsta disperzija	[194]

Saharoza erukat ER290	Metotreksat	Nanosuspenzije	[195]
Saharoza laurat L-1695, Saharoza miristat M-1695 Saharoza palmitat P-1670, Saharoza stearat S-370 Saharoza stearat S-970, Saharoza stearat S-1670	Katalaza	Vezikule	[196]
Saharoza palmitat P-1670, Saharoza stearat S-970	Aceklofenak	Nanoemulzije	[43]
Saharoza laurat D-1216, Saharoza miristat C-1416	Ibuprofen	Gel	[197]
Saharoza palmitat P-1570, Saharoza oleat O-1570	Resveratrol	Mikroemulzije	[163]
Saharoza stearat SP 50, Saharoza stearat SP 70, Saharoza stearat PS750	Silimarin	Krem	[198]

Dodatno, primenom iste tehnike (ATR-FTIR) u studiji Csizmazia i saradnika [189], pokazano je da saharozni estri ne dovode do modifikacije proteinskog dela SC, s obzirom da nije došlo do promene u intenzitetu i položaju C=O i C-N vibracija. Međutim, treba imati u vidu da je dostupan jako mali broj studija koji na molekulskom nivou objašnjavaju mehanizam delovanja surfaktanata, kao i da ovakve studije ne postoje za saharozne estre. Imajući to u vidu, od velikog istraživačkog značaja može biti proučavanje ovih penetracionih mehanizama, sa ciljem dobijanja podataka koji mogu pomoći u daljem rasvetljavanju procesa povećanja penetracije lekovitih supstanci sa različitim fizičko-hemijskim karakteristikama, kako iz konvencionalnih tako i iz naprednih nosača.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se razviju biokompatibilne, nejonske mikroemulzije na bazi saharoznih estara, kao potencijalni nosači za dermalnu i/ili transdermalnu isporuku aceklofenaka, kao i da se poređenjem fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, i (dermato)farmakokinetičkih karakteristika formuliranih mikroemulzija sa nejonskim mikroemulzijama na bazi etoksilovanih nejonskih surfaktanata ustanovi doprinos saharoznih estara navedenim aspektima kvaliteta, te efikasnosti i bezbednosti mikroemulzionih nosača za dermalnu/transdermalnu isporuku lekova iz grupe NSAIL. Navedeni ciljevi su realizovani u okviru četiri faze istraživanja, čiji su pojedinačni ciljevi opisani u nastavku poglavlja.

2.1. Cilj prve faze eksperimentalnog rada

Cilj prve faze ove doktorske disertacije bio je da se ispita termodinamičko i fazno ponašanje saharoznih estara. Dodatno, cilj ove faze bio je i da se proceni uticaj saharoznih estara na fluidnost intercelularnog lipidnog matriksa SC, na fundamentalnom nivou, uz poseban osvrt na uticaj lipofilnog dela surfaktanta na ispitivane fizičko-hemijske parametre, kako bi se utvrdio potencijal saharoznih estara različite dužine ugljovodoničnog lanca da povećaju penetraciju lipofilnih supstanci kroz SC.

2.2. Cilj druge faze eksperimentalnog rada

U drugoj fazi eksperimentalnog rada razmatran je potencijal saharoznih estara da formiraju mikroemulzije, tj. izvršena je procena faznog ponašanja pseudo-ternarnih sistema izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda primenom metode titracije vodom, koristeći sledeće saharozne estre: saharoza laurat, miristat, palmitat i stearat. Ova faza imala je za cilj i procenu primenjivosti *in silico* matematičkih modela u predviđanju faznog ponašanja, za sve ispitivane sisteme, primenom eksperimentalnog dizajna smeše. Dodatno, cilj ove faze bio je i da se prouči promena u nanostrukтури formulacija i tipu mikroemulzija sa povećanjem udela visokoprečišćene vode, primenom direktnih i indirektnih fizičko-hemijskih tehnika.

2.3. Cilj treće faze eksperimentalnog rada

Primarni cilj treće faze ove doktorske disertacije bio je da se izaberu optimalne formulacije mikroemulzija sa saharoznim estrima određivanjem solubilizacionog kapaciteta za lekovitu supstancu iz grupe NSAIL (aceklofenak). Treća faza eksperimentalnog rada obuhvatila je fizičko-hemijsku i biofarmaceutsku karakterizaciju optimalnih formulacija zasnovanih na saharoznim estrima dobijenih u prethodnoj fazi istraživanja. U cilju poređenja, formulisane su mikroemulzije sa konvencionalno korišćenim nejonskim surfaktantom – polisorbatom 80, istog kvantitativnog sastava, koristeći etoksilovani surfaktant umesto saharoznih estara. Takođe, cilj ove faze bila je i procena površinske aktivnosti aceklofenaka, kao i procena interakcija između saharoznih estara i aceklofenaka u cilju određivanja lokalizacije aceklofenaka unutar formulisanih mikroemulzija.

2.4. Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada

Konačno, četvrta faza obuhvatila je komparativnu *in vitro* (test iritacije na horioalantoinskoj membrani inkubiranih kokošijih jaja) i *in vivo* (primenom neinvazivnih tehnika bioinženjeringa kože na humanim dobrovoljcima) procenu iritacionog potencijala mikroemulzija sa i bez aceklofenaka na bazi saharoznih estara različite dužine ugljovodoničnog lanca, odnosno na bazi polisorbata 80. Takođe, cilj poslednje faze eksperimentalnog rada predstavljao je i *in vivo* procenu penetracije aceklofenaka u SC (primenom metode sa trakama na humanim dobrovoljcima), kao i farmakokinetike aceklofenaka i njegovog metabolita – diklofenaka (na pacovima soja *Wistar*), iz biokompatibilnih mikroemulzija na bazi saharoznih estara i polisorbata.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Kao što je napred istaknuto osnovni cilj ove doktorske disertacije predstavljao je razvoj biokompatibilnih mikroemulzija koje su zasnovane na saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca (Tabela 3.1). Za izradu mikroemulzija su kao surfaktanti korišćeni: **saharozni estri** različite dužine ugljovodoničnog lanca (saharoza laurat D-1216 (SL), saharoza miristat C-1416 (SM), saharoza palmitat D-1616 (SP), i saharoza stearat D-1816 (SS), Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Tokio, Japan) i **etoksilovani surfaktant** polisorbat 80 (Tween[®] 80, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemačka). Izopropilmiristat (IPM; Comcen, Beograd, Srbija) je korišćen kao uljana faza, dok su izopropanol (IPA; Brenntag, Austrija) i dietilenglikolmonoetil etar (Transcutol P, Saint-Priest Cedex Gattefossé, Francuska) korišćeni kao kosurfaktanti u formulaciji mikroemulzija. Visokoprečišćena voda (V; GenPure apparatus, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Nemačka) je korišćena kao vodena faza u izradi mikroemulzija. Lekovita supstanca iz grupe NSAIL je aceklofenak (Jinan Jiaquan Chemical Co. Ltd., Jinan, Kina).

Tabela 3.1. Pregled karakteristika saharoznih estara korišćenih za izradu mikroemulzija.

Saharozni estar	Saharoza laurat	Saharoza miristat	Saharoza palmitat	Saharoza stearat
Tip	D-1216	C-1416	D-1616	D-1816
Agregatno stanje	Čvrsto	Čvrsto	Čvrsto	Čvrsto
Vrsta ugljovodoničnog lanca	Lauril	Miristil	Palmitil	Stearil
Procenat masne kiseline	95	95	80	70
Procenat monoestara	80	80	80	75
Procenat di-, tri- i poliestara	20	20	20	25
HLB vrednost	16	16	16	16

Holesterol (Chol), stearinska kiselina (SA), kao i stearinska kiselina sa deuterisanim acil lancem (SA-d₃₅), su nabavljeni od kompanije Sigma Chemicals (Steinheim, Nemačka), a ceramid AS C18:18 (CerAS) od kompanije Evonik Industries (Essen, Nemačka). Hloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka) i metanol (Merck, Darmstadt, Nemačka) su korišćeni za pravljenje početnih rastvora izabranih lipida SC. Na početku, napravljeni su rastvori koncentracije ~ 1mM SA u hloroformu, Chol takođe

u hloroformu, a CerAS u smeši hloroform/metanol (7:3 *vol/vol*). Nakon toga, napravljeni rastvori su pomešani volumetrijski u molarnom odnosu CerAS:SA:Chol = 1:1:0,7 (ova smeša je u daljem tekstu označena kao *SC lipidi*) tako da se dobije rastvor finalne koncentracije ~ 1mM. Takođe, napravljeni su rastvori iste koncentracije ~ 1mM SL i SM u hloroformu. Potom je napravljena serija smeša saharoznih estara i SC lipida u različitim molarnim odnosima koji su korišćeni za dalja istraživanja. Milli-Q Millipore voda, koja je dobijena korišćenjem Millipore sistema, ima specifičnu otpornost 18,2 MΩcm.

3.2. Metode

3.2.1. Prva faza eksperimentalnog rada

Prva faza eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije je obuhvatila ispitivanje termodinamičkog i faznog ponašanja saharoznih estara na međufazi voda/vazduh. Takođe, u okviru ove faze je ispitan i potencijal saharoznih estara da povećaju penetraciju lipofilnih supstanci kroz SC, i izvršena je procena uticaja dužine ugljovodoničnog lanca saharoznih estara na fizičko-hemijske karakteristike monosloja lipida SC na međusloju voda/vazduh. Za analizu monosloja površinski aktivne supstance na međufazi voda/vazduh, korišćene su različite tehnike čiji su uslovi i princip rada opisani u nastavku ovog poglavlja.

3.2.1.1. Langmuir-ov monosloj i fazni prelazi

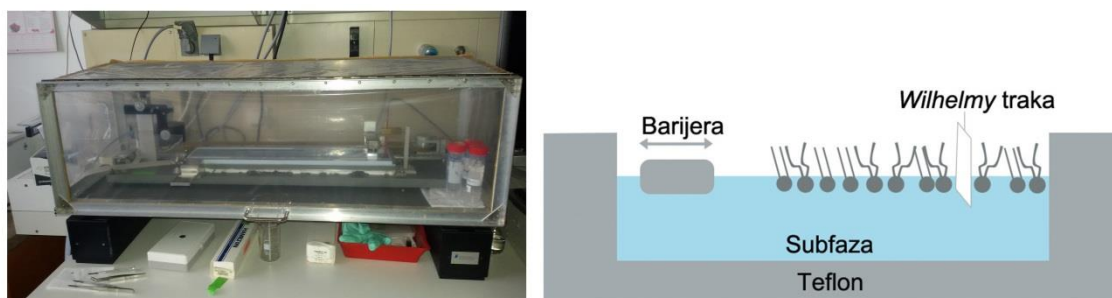
Termodinamičko i fazno ponašanje supstanci je ispitano konstruisanjem izotermi površinski pritisak-površina po molekulu (π -A) i/ili površinski pritisak-vreme (π -t), korišćenjem *Langmuir*-ovog uređaja (R&K, Potsdam, Nemačka) povezanog sa kompjuterom i *Wilhelmy* trakom na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (**Slika 3.1**). 10 minuta nakon rasprostiranja određene zapremine uzorka koncentracije ~ 1 mM na subfazi (kako bi se omogućila evaporacija rastvarača), monosloj na granici voda/vazduh je komprimovan pomeranjem pokretne barije konstantnom brzinom $5 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Formiranje monosloja na površini dovodi do smanjenja površinskog napona, dok kompresija filma dovodi do smanjenja rastojanja između molekula, ali i do promene orijentacije hidrofobnog dela molekula (fazni prelaz iz gasovitog (G) u tečno-kondenzovano (LC) stanje kroz tečno-prošireno stanje (LE)). Merenje povećanja

površinskog pritiska, usled kompresije monosloja na međufazi voda/vazduh, koje je opisano jednačinom 3.1:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Jednačina 3.1

gde je γ_0 površinski napon vode, a γ površinski napon u prisustvu monosloja, se vrši uz pomoć *Wilhelmy* trake povezane sa potenciometrom.



Slika 3.1. Fotografija Langmuir-ovog uređaja uz šematski prikaz principa rada.

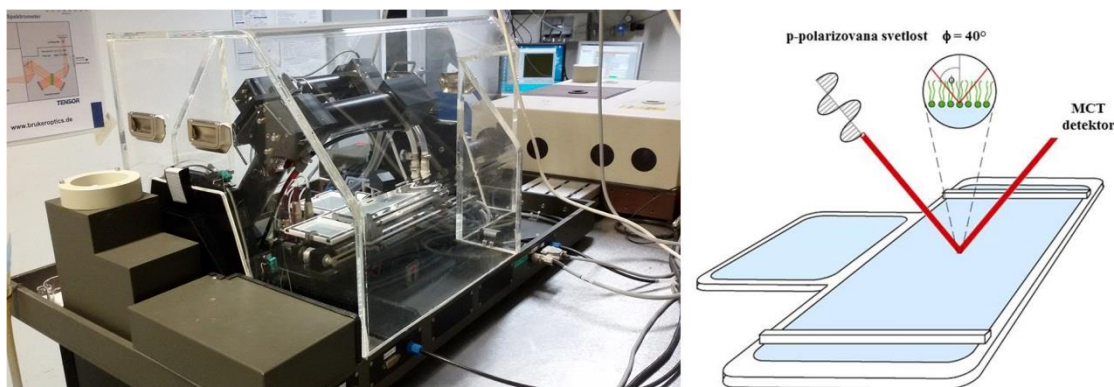
U ovom delu doktorske disertacije su sprovedena dva tipa eksperimenata. Prvi deo eksperimenata (penetracioni eksperiment) je uključio rasprostiranje SC lipida na tri različite subfaze: visokoprečišćenu vodu, 0,001 mM rastvor SL u visokoprečišćenoj vodi, i 0,001 mM rastvor SM u visokoprečišćenoj vodi na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Ovaj deo eksperimenta takođe obuhvata i konstruisanje π -t izoterme u cilju praćenja adsorpcije saharoznih estara na slobodnu površinu voda/vazduh.

Drugi deo eksperimenata obuhvata proučavanje ponašanja rastvora koji su dobijeni mešanjem SC lipida i SL kao i SC lipida i SM u različitim molarnim odnosima (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 mol% saharoznog estera). Precizna zapremina rastvora naneta je na površinu subfaze (visokoprečišćena voda) korišćenjem 100 μL Hamilton mikrošprica, a nakon evaporacije, monosloj je komprimovan brzinom $5 \text{ \AA}^2 \text{ molekul}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.2.1.2. Infracrvena refleksiono-apsorpciona spektroskopija (IRRAS)

IRRA spektri su dobijeni na uređaju Vertex 70 FT-IR spectrometer (Bruker, Ettlingen, Nemačka). Ovaj sistem se sastoji od: *Langmuir*-ovog uređaja (R&K, Potsdam, Nemačka) koji je postavljen unutar zatvorenog sistema (eksterna voda/vazduh refleksiona jedinica XA – 511, Bruker) kroz koji je obezbeđen protok suvog vazduha

kako bi se stabilizovala relativna vlažnost vazduha u optičkom delu sistema (**Slika 3.2**). *Langmuir*-ov uređaj se sastoji od dva dela: referentni deo koji sadrži subfazu bez monosloja i deo za uzorak koji ima dve pokretne barijere, koje obezbeđuju kompresiju monosloja istovremeno sa dve strane. Monosloj je dobijen na isti način kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.1.1. 1 h nakon nanošenja uzorka na međufazu voda/vazduh započeta je kompresija monosloja do željenog pritiska na kome se vrši snimanje IRRA spektara. IR zrak nastaje u FT-IR spektrofotometru, i usmerava se ka površini tečnosti korišćenjem seta ogledala. IR zrak je polarizovan primenom KRS-5 polarizatora (s i p polarizovana svetlost), i usmeren je pod uglom od 40 i 60° u odnosu na film surfaktanta, na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Nakon refleksije sa površine filma, zrak se usmerava ka MCT detektoru (živa-kadmijum-telurid detektor, engl. *Mercury Cadmium Telluride*, MCT) koji se hladi tečnim azotom. FT-IR spektri su dobijeni sa rezolucijom 8 cm^{-1} u oblasti talasnih dužina od $800\text{ do }4000\text{ cm}^{-1}$, koristeći 200 skeniranja za s-polarizovanu i 400 za p-polarizovanu svetlost. Konačno, IRRA spektar se dobija korišćenjem jednačine $-\log(R/R_0)$, gde je R refleksija uzorka, tj. subfaze sa monoslojem supstance, a R_0 refleksija subfaze bez *Langmuir*-ovog filma. Za određivanje položaja i intenziteta CH_2 vibracionih traka korišćena je nelinearna Lorentz funkcija u programu Origin 8.5[®].



Slika 3.2. Fotografija IRRAS uređaja uz šematski prikaz principa rada.

3.2.1.3. Brewster-ova ugaona mikroskopija (BAM)

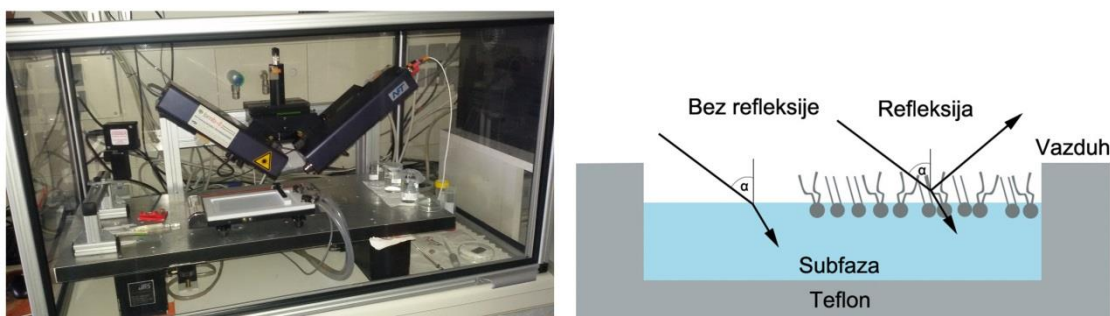
U cilju proučavanja morfologije filma na međufazi voda/vazduh u mikrometarskoj skali, primenjena je *Brewster*-ova ugaona mikroskopija (BAM2plus NanoFilm Technologie, Göttingen, Nemačka). Mikroskop i *Langmuir*-ov uređaj (NIMA

Technology) su postavljeni na antivibracioni sto. Sistem za formiranje mikrografija sastoji se od Nd:YAG lasera (532 nm; 50 mW), polarizatora, analizatora, i CCD kamere. Ukoliko se p-polarizovana svetlost usmeri ka površini pod uglom φ_B , refleksija neće biti detektovana ako je ispunjen *Brewster-ov zakon*:

$$\tan\varphi_B = n_1 / n_0$$

Jednačina 3.2

gde je n_0 indeks refrakcije optički ređeg medijuma (npr. vazduh), a n_1 indeks refrakcije optički gušćeg medijuma (npr. visokoprečišćena voda). U slučaju međufaze voda/vazduh, ovaj ugao iznosi $53,1^\circ$. Stoga će prisustvo *Langmuir-ovog* monosloja na međufazi voda/vazduh dovesti do promene optičkog ponašanja, a samim tim svetlost će biti reflektovana sa površine filma. Nakon prolaska kroz analizator ova svetlost se detektuje primenom CCD kamere. BAM mikrografije ($355 \times 470 \mu\text{m}^2$) su snimljene tokom komprimovanja monosloja sa jednom pokretnom barijerom. Bočna rezolucija BAM mikrografija je $2 \mu\text{m}$.



Slika 3.3. Fotografija BAM uređaja uz šematski prikaz principa rada.

3.2.2. Druga faza eksperimentalnog rada

Druga faza eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije je obuhvatila procenu faznog ponašanja pseudo-ternarnih sistema izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda primenom metode titracije vodom, kao i procenu efikasnosti D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše u predviđanju granica mikroemulzione oblasti. Koristeći tehnike opisane u nastavku ovog poglavlja, sprovedeno je ispitivanje promena u nanostrukтури formulacija i tipu mikroemulzija sa povećanjem udela visokoprečišćene vode duž odabrane linije razblaženja.

3.2.2.1. Konstruisanje pseudo-ternarnih faznih dijagrama

Pseudo-ternarni fazni dijagrami su konstruisani sa ciljem identifikacije mikroemulzione oblasti, tj. sa ciljem određivanja udela komponenata u sistemu uljana faza/surfaktant-kosurfaktant/vodena faza pri kojima se formiraju transparentne, izotropne, termodinamički stabilne mikroemulzije. Sa ciljem procene uticaja dužine ugljovodoničnog lanca saharoznih estara na fazno ponašanje sistema, odnosno veličinu mikroemulzione oblasti, u ispitivanju su korišćena četiri saharozna estra sa različitim dužinom hidrofobnog ugljovodoničnog lanca, sa identičnom strukturom hidrofilne glave (**Tabela 3.1**). Fazno ponašanje sistema izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda je ispitano metodom titracije vodom. Najpre je potrebna količina odabranog saharoznog estra rastvorena u izopropanolu na magnetnoj mešalici, na sobnoj temperaturi, pri masenom odnosu saharozni estar-izopropanol (tj. surfaktant-kosurfaktant) 1:1, i taj odnos je zadržan tokom celog ispitivanja. Nakon toga, smeša surfaktant-kosurfaktant je pomešana sa uljanom fazom (izopropilmiristat), pri čemu je maseni odnos izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol variran tokom ispitivanja od 9/1 do 1/9. U tako pripremljene smeše uljane faze i surfaktanta-kosurfaktanta, postepeno je dodavano po 10 μ l visokoprečišćene vode, sve do pojave zamućenja sistema, što je definisano kao maksimalni kapacitet za solubilizaciju vodene faze. Nakon svakog dodatka vodene faze, sistem je ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta, kako bi se postigla ravnoteža u sistemu. Nakon toga uzorci su podvrgnuti intenzivnom mešanju na mešalici (Vortex mixer ZX Classic, Vicor), a homogeni, jednofazni sistemi niskog viskoziteta, za koje je vizuelno i primenom optičkih metoda pokazano da su transparentni i optički izotropni, su klasifikovani kao mikroemulzije. Granice mikroemulzionih oblasti su definisane na osnovu masenih udela vode, nakon kojih je došlo do zamućenja prethodno transparentnog, izotropnog sistema.

3.2.2.2. Primena D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše za predviđanje granica mikroemulzione oblasti

S obzirom da konstruisanje faznih dijagrama tehnikom titracije vodom zahteva izvođenje i ponavljanje velikog broja eksperimentalnih tačaka unutar pseudo-ternarnog faznog dijagrama, jedan od ciljeva ove doktorske disertacije predstavlja procena efikasnosti D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše kao alternativne tehnike za

predviđanje granica mikroemulziona oblasti. Stoga, D-optimalni eksperimentalni dizajn smeše je korišćen kao *in silico* tehnika sa ciljem relativno brze procene granica mikroemulziona oblasti, čime se izbegava izvođenje velikog broja eksperimenata, kao u metodi titracije vodom. Ova vrste eksperimentalnog dizajna je izabrana s obzirom da se koncentracije tri nezavisno promenljive (faktori) mogu varirati istovremeno, dok njihov zbir ostaje isti (njihov procentni zbir uvek iznosi 100%), što je neophodno za konstruisanje pseudo-ternarnih faznih dijagrama. Shodno tome, program Design Expert[®] (verzija 7.0.0, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, SAD) je korišćen za generisanje D-optimalnog eksperimentalnog dizajna smeše s ciljem određivanja granica mikroemulziona oblasti.

Kao nezavisno promenljive odabrani su udeli smeše saharozni estar-izopropanol (surfaktant-kosurfaktant) u masenom odnosu 1:1 (faktor A), izopropilmiristata (uljana faza, faktor B) i visokoprečišćene vode (vodena faza, faktor C). Neophodno je odrediti gornji i donji nivo za svaku nezavisnu promenljivu, kako bi se odredio prostor u kome se variraju izabrane komponente, pri čemu je:

$$L_i \leq X_i \leq H_i \quad \text{Jednačina 3.3}$$

gde su L_i i H_i donji, odnosno gornji nivo faktora X_i .

U ovoj doktorskoj disertaciji, udeli navedenih nezavisno promenljivih (A, B i C) odabrani su na osnovu rezultata preliminarnih eksperimenata i literaturnih podataka, tako da ovi faktori budu u granicama:

$$10\% \leq A \text{ (saharozni estar-izopropanol)} \leq 90\%$$

$$5\% \leq B \text{ (izopropilmiristat)} \leq 45\%$$

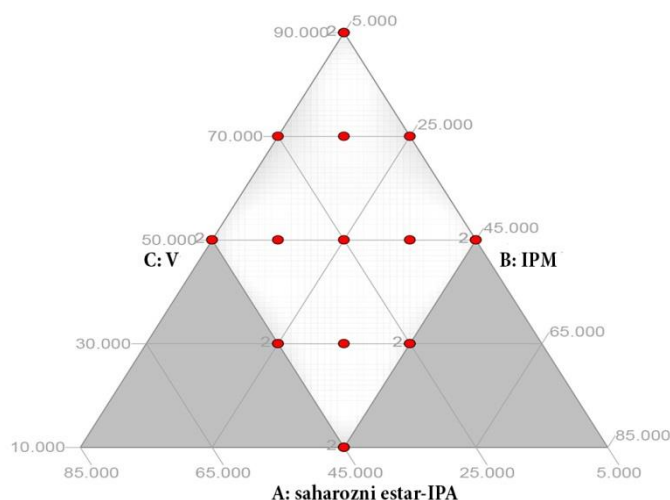
$$5\% \leq C \text{ (visokoprečišćena voda)} \leq 45\%. \quad \text{Jednačina 3.4}$$

Zbir odabranih faktora A, B, i C pri svakom udelu izabranih komponenata iznosi:

$$A + B + C = 100\%. \quad \text{Jednačina 3.5}$$

Kako je poznato da su mikroemulzije optički transparentni sistemi, sa visokom transparentijom u vidljivoj oblasti spektra (500 – 760 nm), vrednost transparentije izražene u procentima T (%) je korišćena kao pokazatelj mikroemulziona oblasti, pa je stoga i transparentija sistema odabrana kao zavisno promenljiva. Vrednost

transparencije iznad 0,99 ukazuje na odsustvo razdvajanja faza, odnosno stabilan i transparentan mikroemulzioni sistem. Transparencija uzoraka je merena na Evolution 300 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na talasnoj dužini od 700 nm, korišćenjem visokoprečišćene vode kao slepe probe. Nakon definisanja promenljivih i odabira odgovarajućih tačaka (**Slika 3.4**) koje će biti korišćene u razvoju modela dobijena je šema od 19 eksperimenata, koji su izvođeni na randomizovan način, kako bi se smanjio uticaj eksperimentalne greške na dobijene rezultate analize.



Slika 3.4. Pseudo-ternarni dijagram sa postavljenim gornjim i donjim granicama za udele komponentata A, B i C, sa odabranim tačkama koje su korišćene za razvoj modela.

Da bi se pojednostavio proračun, komponente A, B i C su prevedene u pseudokomponente [76]. Stoga, koeficijenti u matematičkom modelu, koji daju kvantitativnu zavisnost između udela komponentata mikroemulzionih formulacija i T (%), su izračunati nakon prevođenja udela komponentata (%) u L-pseudo skalu (donja vrednost svake komponente postaje nula, dok gornja vrednost postaje jedan) prema jednačini:

$$\text{Pseudo} = \frac{(\text{Realna vrednost} - L_i)}{(1 - \sum L_i)} \quad \text{Jednačina 3.6}$$

gde je L_i postavljena donja granica, a $\sum L_i$ zbir svih donjih granica za realne udele komponentata. U tom smislu, realna vrednost komponente je predstavljena jednačinom:

$$\text{Realna vrednost} = \frac{A_i}{\sum A_i}$$

Jednačina 3.7

gde je A_i procentni udeo komponente (% *m/m*), a $\sum A_i$ suma udela svih komponenata. Model koji najbolje opisuje zavisnost između udela komponenata u mikroemulzionim formulacijama i T (%) izabran je na osnovu najviših vrednosti koeficijenta korelacije (engl. *multiple correlation coefficients*, R^2) i prilagođenog koeficijenta korelacije (engl. *adjusted multiple correlation coefficients – adjusted R^2*) i najnižih vrednosti predviđene rezidualne sume kvadrata (engl. *predicted residual error sum of squares – PRESS*). R^2 pokazuje koji deo varijacije u vrednosti zavisno promenljive se može objasniti varijacijama vrednosti nezavisno promenljive, dok *adjusted R^2* predstavlja koeficijent korelacije prilagođen prema broju članova u matematičkom modelu. PRESS predstavlja pokazatelj koliko dobro se svaka pojedinačna tačka u eksperimentalnom prostoru uklapa u dobijeni matematički model. Ovaj parametar se izračunava tako što se za dobijanje matematičkog modela koriste sve tačke osim jedne. Tako dobijeni model se koristi za predviđanje vrednosti zavisno promenljive u tački koja nije korišćena za njegovo dobijanje i nakon toga se izračunava razlika između stvarnih (eksperimentalnih) i predviđenih vrednosti zavisno promenljive za datu tačku. Isti postupak se ponavlja za sve tačke, pri čemu PRESS predstavlja zbir kvadrata razlike između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za sve pojedinačne tačke [199]. Statistička značajnost samog modela, kao i uticaja svakog pojedinačnog faktora (udeli komponenata u formulaciji) i faktorskih interakcija, je procenjena primenom jednofaktorske analize varijansi (ANOVA), pri čemu se kao statistički značajan efekat smatra efekat sa *p* vrednošću manjom od 0,05, dok su članovi modela čiji uticaj nije statistički značajan ($p > 0,05$) eliminisani iz odabranog modela. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je Design Expert[®] (verzija 7.0.0, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, SAD).

3.2.2.3. Polarizaciona mikroskopija

Polarizaciona mikroskopija je korišćena za procenu optičke izotropnosti sistema koji nastaju kontinuiranim dodatkom vodene faze tokom konstruisanja pseudo-ternarnih dijagrama, kao i tokom ispitivanja izotropije odabranih formulacija mikroemulzija. Mikroemulzije se, kao optički izotropni sistemi, karakterišu odsustvom dvostrukog prelamanja svetlosti, odnosno njihovim posmatranjem na polarizacionom mikroskopu uočava se tamno polje, s obzirom da ne dolazi do prelamanja zraka linearno

polarizovane svetlosti. Ispitivanja su vršena korišćenjem polarizacionog mikroskopa Motic digital microscope DMB3-223ASC, opremljenog digitalnom kamerom i softverom Motic Images Plus v.2.0 (Motic GmbH, Nemačka).

3.2.2.4. Ispitivanje rastvorljivosti saharoznih estara u vodenoj i uljanoj fazi mikroemulzija

U nastavku ovog dela doktorske disertacije je sprovedena studija rastvorljivosti saharoznih estara u uljanoj (izopropilmiristat) i vodenoj fazi (visokoprečišćena voda) mikroemulzija sa ciljem boljeg razumevanja razlika u faznom ponašanju mikroemulzionih sistema formulisanih sa saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca. U tu svrhu, studija rastvorljivosti je izvršena „*shake flask*“ metodom, korišćenjem mešalice IKA[®] KS 260 basic (IKA[®] Werke GmbH & Company KG Staufen, Nemačka). Višak saharoznog estera (SL, SM ili SP) je dodat u 5 ml IPM ili visokoprečišćene vode, nakon čega je dobijena smeša mešana na mešalici brzinom od 300 o/min u toku 48 h. Nakon tog vremena, uzorci su centrifugirani (Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Varšava, Poljska) na 3000 o/min u toku 30 minuta. Koncentracija saharoznog estera je određena u supernatantu nakon razblaženja metanolom (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka), korišćenjem Evolution 300 UV-Vis spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na talasnoj dužini od 210 nm. Ispitivanje rastvorljivosti je sprovedeno u triplikatu, na sobnoj temperaturi.

3.2.2.5. Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti mikroemulzija duž odabrane linije razblaženja u pseudo-ternarnom faznom dijagramu može indirektno ukazati na promenu u strukturi mikroemulzija (prelazak iz V/U mikroemulzija preko bikontinuiranih do U/V mikroemulzija kontinuiranim dodatkom vodene faze). Prilikom ispitivanja provodljivosti kod mikroemulzija formulisanih sa nejonskim surfaktantima (što je slučaj sa saharoznim estrima), potrebno je dodati malu količinu elektrolita. Tako je, u ovom eksperimentalnom delu, kao komponenta vodene faze u izradi mikroemulzija umesto visokoprečišćene vode korišćen 0,01 M rastvor NaCl u visokoprečišćenoj vodi. Električna provodljivost mikroemulzija sa rastućim sadržajem vodenog rastvora 0,01 M NaCl duž odabrane linije razblaženja je merena korišćenjem konduktometra CDM230

MeterLab (Radiometer, Danska) direktnim uranjanjem elektrode u ispitivane uzorke na sobnoj temperaturi. Sva merenja su vršena u triplikatu.

3.2.2.6. *Reološka ispitivanja*

Promena u vrednostima prividnog viskoziteta mikroemulzija sa porastom udela vodene faze duž odabrane linije razblaženja može biti indirektan pokazatelj promena u unutrašnjoj strukturi mikroemulzija, te na taj način reološka ispitivanja mogu poslužiti kao efikasna tehnika za indirektnu procenu tipa mikroemulzija. Reološko ponašanje mikroemulzionih sistema, duž odabrane linije razblaženja, ispitano je primenom reometra DV-III ULTRA Programmable Rheometer, opremljenog softverom Rheocalc v.4.3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro, SAD), korišćenjem mernog sistema tipa konus i ploča (engl. *cone and plate*) na temperaturi $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Merenja napona smicanja su vršena pri brzini smicanja od 75 do 750 s^{-1} , i obrnuto. Za procenu promene viskoziteta sistema sa promenom udela vodene faze korišćene su vrednosti prividnog viskoziteta dobijene pri brzini smicanja od 300 s^{-1} .

3.2.2.7. *Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)*

Kako bi se dobile detaljnije informacije, i potvrdili rezultati dobijeni merenjem električne provodljivosti i praćenjem reološkog ponašanja sistema, uzorci mikroemulzija sa rastućim udelom vodene faze duž odabrane linije u pseudo-ternarnom faznom dijagramu su analizirani primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije uz korišćenje uređaja Mettler Toledo DSC 1, opremljenog sa STAR[®] softverom (Mettler Toledo GmbH Analytical, Giessen, Nemačka). Termalna analiza odabranih uzoraka je sprovedena kako bi se dobio detaljan uvid u termalno ponašanje vode u mikroemulzijama, tj. kako bi se napravila razlika između vezane vode i vode koja je slobodna u sistemu. U aluminijski lončić je precizno odmerena masa ispitivanih formulacija (5 do 10 mg), nakon čega je lončić hermetički zatvoren. Prazna aluminijska posuda je korišćena kao referentni uzorak. DSC termogrami su dobijeni hlađenjem ispitivanog i referentnog uzorka sa temperature od 25°C na -60°C , pri brzini hlađenja $5^\circ\text{C}/\text{min}$ i konstantnom protoku azota od $50\text{ ml}/\text{min}$.

3.2.2.8. *Mikroskopija atomskih sila (AFM)*

Za sticanje direktnog uvida u strukturu i određivanje tipa mikroemulzija korišćena je mikroskopija atomskih sila. Ispitivanja su izvršena na mikroskopu NTEGRA Prima

Atomic Force integrisanog sa Image Analysis 2.2.0 softverskim paketom (NT-MDT, Moskva, Rusija). S obzirom da nema literaturnih podataka o primeni AFM u kontaktnom modu u svrhu vizuelizacije strukture i određivanja morfologije mikroemulzija, uzorci su pripremani nanošenjem različitih zapremina formulacije na mica pločice (Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, Kalifornija), a zatim sušenjem pod različitim uslovima (u vakuumu, na sobnoj temperaturi i u eksikatoru), kako bi se pronašla optimalna tehnika pripreme uzoraka. Usled tečne konzistencije uzoraka, snimanje je sprovedeno u kontaktnom modu, korišćenjem sledećih parametara: konstanta nominalne sile 5,1 N/m, rezonantna frekvencija 87–230 kHz, pokretačka frekvencija 148 kHz, i frekvencija linije skeniranja 1 Hz. Za sve ispitivane uzorke su napravljene AFM mikrografije topografije i „signala greške“ a zatim su dobijene mikrografije analizirane korišćenjem već pomenutog softverskog paketa Image Analysis 2.2.0.

3.2.3. Treća faza eksperimentalnog rada

U trećem delu eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije je izvršen odabir mikroemulzija sa najvećim solubilizacionim kapacitetom za aceklofenak *shake flask* metodom duž linije razblaženja izabrane u poglavlju 3.2.2. Ovi uzorci su u daljem toku doktorske disertacije podvrgnuti sveobuhvatnoj fizičko-hemijskoj (faza 3 – poglavlje 3.2.3.) i biofarmaceutskoj karakterizaciji, kao i *in vitro* i *in vivo* proceni iritacionog potencijala i proceni (dermato)farmakokinetike aceklofenaka iz izabranih formulacija (faza 4 – poglavlje 3.2.4.). Ova faza je uključila i ispitivanje termodinamičkog i faznog ponašanja aceklofenaka na međusloju voda/vazduh, kao i procenu interakcija između saharoznih estara i aceklofenaka na međufazi voda/vazduh, ali i u odabranim formulacijama mikroemulzija.

3.2.3.1. Ispitivanje rastvorljivosti aceklofenaka u komponentama mikroemulzija

Rastvorljivost aceklofenaka u uljanoj i vodenoj fazi mikroemulzija, kao i u smeši surfaktant/kosurfaktant (maseni odnos 1:1) je ispitana *shake flask* metodom na mešalici IKA® KS 260 basic (IKA® Werke GmbH & Company KG Staufen, Nemačka). Ispitivanje je sprovedeno dodatkom lekovite supstance u višku u erlenmajer u kome se nalazi 5 ml komponente mikroemulzije (uljana faza, vodena faza i smeša surfaktant-kosurfaktant), nakon čega su uzorci mešani tokom 48 h, pri brzini 300 o/min. Uzorci su

zatim podvrgnuti centrifugiranju (Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Varšava, Poljska) na 3000 o/min tokom 30 min, kako bi se razdvojila (istaložila) nerastvorena lekovita supstanca. Dobijeni supernatant je zatim profiltriran kroz 0,22 μm membranski filter i koncentracija rastvorenog aceklofenaka je određena spektrofotometrijski na Evolution 300 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na talasnoj dužini od 274 nm. Sva ispitivanja su vršena u triplikatu, na sobnoj temperaturi.

3.2.3.2. Odabir formulacija za fizičko-hemijsku karakterizaciju i ispitivanje solubilizacionog kapaciteta za aceklofenak

Kako se, u cilju bolje fiziološke prihvatljivosti, pri formulaciji mikroemulzija teži da se udeli surfaktanta i kosurfaktanta svedu na minimum, za dalja ispitivanja izabrana je serija formulacija duž odabrane linije razblaženja u pseudo-ternarnom faznom dijagramu gde je moguće povećati udeo vode kako bi se postigao prelazak iz V/U u U/V mikroemulzije, preko bikontinuiranih mikroemulzija, bez pojave zamućenja sistema.

3.2.3.2.1. Ispitivanje solubilizacionog kapaciteta za aceklofenak duž odabrane linije razblaženja u pseudo-ternarnom faznom dijagramu

U cilju odabira optimalne formulacije mikroemulzija izvršena je procena solubilizacionog kapaciteta mikroemulzija duž odabrane linije razblaženja (saharozni estar-izopropanol/izopropilmiristat 9/1). U prethodno pripremljene uzorke mikroemulzija sa različitim udelom visoko-prečišćene vode (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, i 75%), dodat je aceklofenak u koncentraciji od 2% *m/m* uz mešanje na magnetnoj mešalici (IKA RCT basic, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim preneti u staklene bočice koje su hermetički zatvorene. Nakon 48 h je izvršen vizuelni pregled prisustva vidljive precipitacije kristala aceklofenaka ili pojave zamućenja sistema. Optimalna formulacija je izabrana tako da sadrži maksimalan sadržaj visokoprečišćene vode, odnosno minimalni sadržaj surfaktanta i kosurfaktanta, a da nakon dodatka aceklofenaka u ispitivanoj koncentraciji ne dolazi do pojave taloga niti zamućenja.

3.2.3.2.2. Izrada optimalnih mikroemulzija sa i bez aceklofenaka

Za dalji tok istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji odabrani su uzorci mikroemulzija sa surfaktant-kosurfaktant⁶/uljana faza odnosom 9/1, za koje je u prethodnoj fazi pokazan najviši solubilizacioni kapacitet za aceklofenak. Navedeni uzorci mikroemulzija su izrađeni niskoenergetskim postupkom na sobnoj temperaturi, tako što je prvo pripremljena smeša surfaktant-kosurfaktant (odnos 1:1) mešanjem na magnetnoj mešalici (IKA RCT basic, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka), a zatim je izvršeno dodavanje visokoprečišćene vode u dobijenu homogenu smešu u koncentraciji od 35% *m/m*. U tako dobijene placebo mikroemulzije izvršeno je dodavanje aceklofenaka u koncentraciji od 2% *m/m*, što je u skladu sa literaturnim podacima o terapijskoj koncentraciji ove lekovite supstance u preparatima za primenu na koži.

3.2.3.3. Polarizaciona mikroskopija

U cilju procene optičke izotropije sistema i detekcije prisustva kristala nerastvorenog ili precipitiranog aceklofenaka izvršena je analiza mikroemulzija sa inkorporiranim aceklofenakom primenom polarizacionog mikroskopa (videti poglavlje 3.2.2.3.).

3.2.3.4. Merenje pH vrednosti

Merenje pH vrednost uzoraka mikroemulzija, sa i bez aceklofenaka, izvršeno je korišćenjem uređaja HI9321 pH meter (Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, Michigan, SAD), direktnim uranjanjem elektrode uređaja u ispitivane uzorke na sobnoj temperaturi. Sva merenja su vršena u triplikatu.

3.2.3.5. Merenje električne provodljivosti

Električna provodljivost uzoraka mikroemulzija, sa i bez aceklofenaka merena je konduktometrijskim postupkom, korišćenjem konduktometra (CDM230 MeterLab, Radiometer, Danska), direktnim uranjanjem elektrode uređaja u ispitivane uzorke. Merenja su vršena u triplikatu na sobnoj temperaturi.

⁶ Odnos surfaktant-kosurfaktant je 1:1.

3.2.3.6. Reološka merenja

Reološko ponašanje odabranih mikroemulzija sa i bez lekovite supstance ispitano je korišćenjem reometra DV-III ULTRA Programmable Rheometer, opremljenog softverom Rheocalc v.4.3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro, SAD), primenom mernog sistema tipa konus i ploča (engl. *cone and plate*) na temperaturi $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Merenje napona smicanja je izvršeno pri brzini smicanja u intervalu od 375 s^{-1} do 1875 s^{-1} . Vrednosti prividnog viskoziteta, koje su očitane sa krivih viskoziteta pri brzini smicanja 375 s^{-1} , su korišćene za karakterizaciju uzoraka.

3.2.3.7. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Ispitivanje termalnog ponašanja odabranih uzoraka mikroemulzija sprovedeno je korišćenjem uređaja Mettler Toledo DSC 1 (videti poglavlje 3.2.2.7.).

U ovoj fazi eksperimentalnog rada izvršena je dvostruka analiza odabranih uzoraka mikroemulzija. U cilju određivanja fizičkog stanja aceklofenaka, uzorci su podvrgnuti zagrevanju u temperaturnom intervalu od 25°C do 200°C , pri brzini zagrevanja $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Ispitivanje je izvršeno preciznim odmeravanjem uzorka (5–10 mg) u aluminijumskoj posudi zapremine $40 \mu\text{l}$, nakon čega je posuda hermetički zatvorena. Takođe, DSC analiza je korišćena i u cilju sticanja uvida u unutrašnju strukturu mikroemulzija, hlađenjem uzoraka pri uslovima objašnjenim u poglavlju 3.2.2.7. Uređaj je kalibrisan korišćenjem indijuma kao referentnog standarda.

3.2.3.8. Termogravimetrijska analiza (TGA)

U ovom eksperimentalnom delu je, kao dopuna DSC analizi, korišćena termogravimetrijska analiza (TGA), sa ciljem sticanja uvida u distribuciju vode u mikroemulzionim sistemima, a na osnovu praćenja promene mase uzoraka podvrgnutih zagrevanju. Ispitivanja su vršena na uređaju Netzsch STA 409PG (Netzsch, Selb, Nemačka), pri čemu su uzorci zagrevani od 25°C do 130°C , brzinom od $5^\circ\text{C}/\text{min}$, pri konstantnom protoku helijuma od $40 \text{ ml}/\text{min}$.

3.2.3.9. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija)

U cilju procene prisustva intermolekulskih interakcija između aceklofenaka i ostalih komponenata mikroemulzionog sistema korišćena je FT-IR spektroskopija. FT-IR

spektri uzoraka snimljeni su pomoću BOMEM Hartmann & Braun MB-Series FT-IR spektrofotometra (ABB Bomem Inc., Kvebek, Kanada), u opsegu talasnih dužina od 4000 do 400 cm^{-1} i rezolucijom 4 cm^{-1} , pri čemu je vršeno 10 skeniranja za svaki spektar. Spektar čistog aceklofenaka je snimljen korišćenjem metode KBr diska, dok su spektri tečnih uzoraka (formulacije mikroemulzija sa i bez aceklofenaka i polazne komponente mikroemulzija) snimljeni u istom intervalu talasnih dužina nakon nanošenja 10 μL uzorka na KRS-5 pločicu.

3.2.3.10. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Tehnika AFM je korišćena u cilju karakterizacije morfologije mikroemulzionih sistema sa i bez aceklofenaka, i procene uticaja solubilizovanog aceklofenaka na nanostrukturu uzoraka. S obzirom da je u prethodnoj fazi istraživanja (3.2.2.8) pokazano da način sušenja uzorka nema značajan uticaj na kvalitet dobijenih mikrografija, uzorci su pripremljeni nanošenjem 10 μL uzorka na mica pločice (Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, Kalifornija), nakon čega su uzorci sušeni u eksikatoru 48 h. Uslovi snimanja uzoraka su isti kao što je prethodno opisano (videti poglavlje 3.2.2.8).

3.2.3.11. Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje lokalizacije aceklofenaka u odabranim mikroemulzijama

3.2.3.11.1. Ispitivanje faznog ponašanja aceklofenaka i interakcije sa saharoznim estrima na međufazi voda/vazduh

Ovaj deo doktorske disertacije je obuhvatio proučavanje međupovršinskih osobina i faznog ponašanja aceklofenaka konstruisanjem π -A i π -t izoterma, korišćenjem *Langmuir*-ovog uređaja na način koji je prethodno opisan u poglavlju 3.2.1.1. Ispitivanje je izvršeno korišćenjem različitih koncentracija aceklofenaka u fosfatnom puferu pH 7,4 (0,10; 0,25; 0,50; 1 mM rastvor aceklofenaka). Kako bi se izbegao uticaj jona na monosloj na međufazi voda/vazduh, tj. na vrednost površinskog pritiska, korišćen je fosfatni pufer pH 7,4 (10 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl), dok je za podešavanje pH vrednosti na 7,4 korišćen 6 M rastvor NaOH. Sve supstance su nabavljene od kompanije Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Nemačka). Milli-Q Millipore voda je dobijena korišćenjem Millipore sistema.

Drugi deo ovih eksperimenata je uključio procenu interakcije saharoznih estara različite dužine ugljovodoničnog lanca sa aceklofenakom, kao i procenu stabilnosti tako dobijenog međupovršinskog filma. Ovaj deo eksperimenata se sastoji od nanošenja i rasprostiranja rastvora saharoznih estara u hloroformu (koncentracije ~ 1 mM) na subfaze koje čine različite koncentracije aceklofenaka u fosfatnom puferu pH 7,4 (0,5 i 1 mM rastvor aceklofenaka) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Takođe, u ovom eksperimentalnom delu su konstruisane π -A i π -t izoterme u cilju praćenja adsorpcije aceklofenaka na međupovršinu voda/vazduh na kojoj se nalaze molekuli saharoznih estara. Nakon toga, u cilju procene stabilnosti tako dobijenog mešanog međupovršinskog filma, tokom kompresije monosloja saharoznih estara na različitim subfazama (fosfatni pufer, 0,5 mM rastvor aceklofenaka u fosfatnom puferu, i 1 mM rastvor aceklofenaka u fosfatnom puferu), barijera je zaustavljena pri tačno određenim vrednostima površinskog pritiska i izvršena je procena stabilnosti konstruisanjem π -t izoterme u toku 60 minuta.

3.2.3.11.2. Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) – ispitivanje interakcije aceklofenaka sa saharoznim estrima na međufazi mikroemulzija

EPR tehnika je nedestruktivna spektroskopska tehnika za detekciju i identifikaciju paramagnetnih vrsta (vrsta sa nesparenim elektronima), i predstavlja koristan metod za procenu dinamike mikroemulzija, s obzirom da daje direktan uvid u pokretljivost (tj. mobilnost) spin probe, jer je bazirana na unutrašnjem magnetnom momentu elektrona koji raste sa njegovim spinom [70]. Uzorak je postavljen u specijalno dizajniranu ravnu ćeliju (WG-813-Q Wilmad, Buena, NJ). EPR spektri su snimljeni na konstantnoj temperaturi od 25°C , koristeći Bruker EMX EPR spektrometar sa X-zracima, u sledećim uslovima: centralno polje 0,349 T, širina dometa 0,01 T, prijemnik $5,64 \times 10^{-3}$, modulacija frekvencije 100 kHz, vremenska konstanta 5,12 ms, vreme prevođenja 5 ms, i frekvencija 9,78 GHz. Prikupljanje, kao i analiza podataka, su izvršeni primenom Bruker WinEPR programa.

Na početku su napravljene rastvori 5-doksilsteearinske kiseline i 12-doksilsteearinske kiseline (5-DSA i 12-DSA) u etanolu koncentracije 7,8 mM. Nakon toga, 15 μL rastvora je postavljeno u tubu nakon čega je izvršena evaporacija etanola primenom

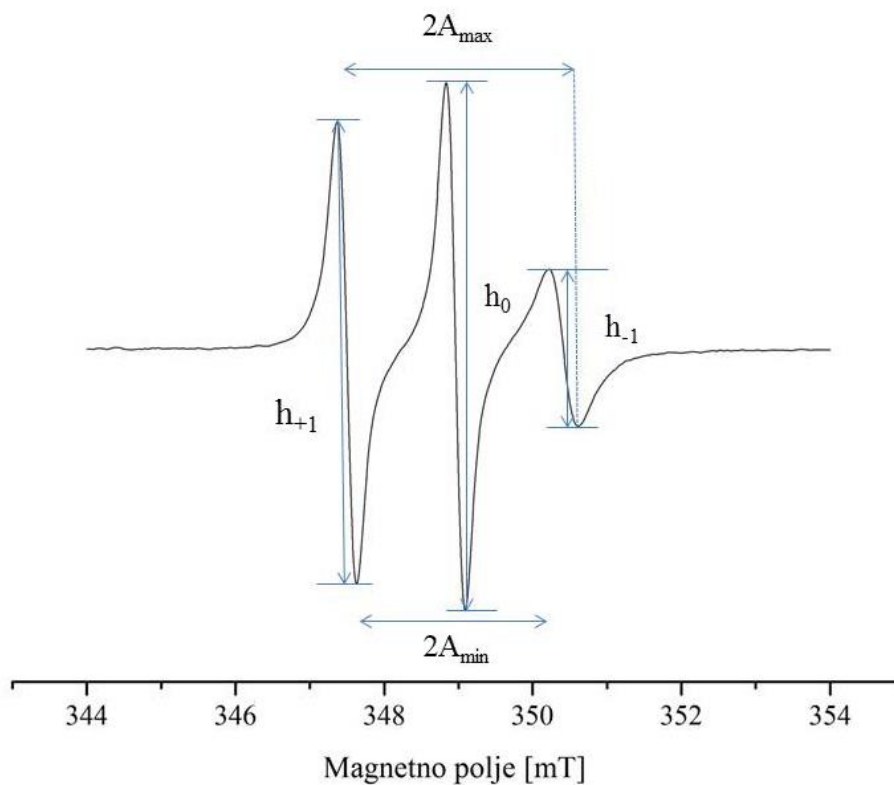
komprimovanog vazduha. Nakon evaporacije, u svaku tubu je dodato 1 g uzorka mikroemulzije. Nakon intenzivnog mešanja uzoraka, finalna koncentracija 5-DSA ili 12-DSA u svakom uzorku je bila ~ 0,12 mM. Eksperimentalni rezultati su analizirani i izraženi kao rotaciono vreme korelacije (τ_R) i parametar uređenosti (S).

Probe sa nesprenim elektronom (engl. *spin probe*) su organski molekuli koji poseduju nespren elektron, te samim tim i sposobnost da se vežu za drugi molekul ili biološku membranu koristeći elektron-paramagnetnu rezonanciju. 5- i 12-DSA su supstance koje imaju amfifilne osobine s obzirom da imaju polarnu glavu (-COOH) i hidrofobni rep (C18), i koje se koriste kao probe sa nesprenim elektronom u ovakvom tipu eksperimenata. Kada su solubilizovani u mikroemulzijama, zahvaljujući amfifilnoj prirodi ovi molekuli se lokalizuju na međupovršini, interagujući sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta. Interesantno, na osnovu informacija o mobilnosti doksil-paramagnetnog prstena, ove dve probe mogu pružiti značajne podatke o mobilnosti različitih delova međupovršinskog filma u mikroemulzionom sistemu, s obzirom na različitu lokalizaciju nitroksidnog prstena na alifatičnom lancu molekula. U slučaju 5-DSA, nitroksidni prsten je lokalizovan bliže polarnoj glavi molekula, te samim tim i bliže polarnoj glavi molekula surfaktanta i kosurfaktanta u međupovršinskom filmu mikroemulzija, dok je u slučaju 12-DSA, nitroksidni prsten na dvanaestom ugljenikovom atomu, te nam ukazuje na mobilnost slojeva međupovršinskog filma koji je udaljeniji od hidrofilnog dela molekula.

Za računanje **rotacionog vremena korelacije** (τ_R) probe na osnovu EPR spektra (**Slika 3.5**) koristi se jednačina 3.8 [200]:

$$\tau_R = (6 \times 10^{-10}) \left[\left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{\frac{1}{2}} + \left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{\frac{1}{2}} - 2 \right] \Delta H_0(S) \quad \text{Jednačina 3.8}$$

gde su h_0 , h_{-1} i h_{+1} amplitude na EPR spektru, a ΔH_0 je širina centralne linije, što je i prikazano na **Slici 3.5**. Ova jednačina je primenljiva u regionu brzih promena ($10^{-11} < \tau_R < 3 \times 10^{-9}$ s). U slučaju regiona sporih promena ($\tau_R > 3 \times 10^{-9}$ s), τ_R se računa korišćenjem kompjuterskih simulacija. Promene u vrednosti τ_R ukazuju na ograničenu pokretljivost probe usled promena u mikrokruženju.



Slika 3.5. Šematski prikaz EPR spektra spin probe sa nitroksidnim radikalom.

Parametar uređenosti (S) je mera orijentacije probe u supramolekularskom okruženju i može da ima vrednost od 0 do 1. U slučaju kada je vrednost $S = 1$, proba se nalazi u potpuno uređenom stanju, dok nasuprot tome, vrednost $S = 0$ ukazuje da je proba u potpuno randomizovanom stanju. Parametar S se računa na osnovu Jednačine 3.9 [201]:

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] (\alpha_0 / \alpha'_0) \quad \text{Jednačina 3.9}$$

gde je A_{\parallel} polovina rastojanja od spoljašnjeg maksimuma finog cepanja $2A_{\max}$, a A_{\perp} se računa na osnovu Jednačine 3.10:

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1,4(1 - S^{\text{app}})$$

$$S^{\text{app}} = (A_{\max} - A_{\min}) / [A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})] \quad \text{Jednačina 3.10}$$

gde je A_{\min} polovina rastojanja unutrašnjeg minimuma finog cepanja. A_{xx} , A_{yy} i A_{zz} su pojedinačne kristalne vrednosti probe koje iznose 0,63, 0,58, i 3,36 mT, dok odnos α_0 / α'_0 predstavlja korekciju polarlosti.

3.2.4. Četvrta faza eksperimentalnog rada

3.2.4.1. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aceklofenaka primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija zasnovanih na saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca (SL i SM), ili na polisorbatu 80, izvršeno je korišćenjem *Franz*-ovih difuzionih ćelija. Precizno odmerena masa formulacije (400 – 420 mg) postavljena je u donorsku komoru *Franz*-ove ćelije (površina otvora 0,785 cm²) na sintetsku membranu od celuloza-acetata, dijametra pora 0,2 µm (Sartorius, Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemačka), pazeći da ne dođe do uklapanja vazduha, koji može uticati na difuziju lekovite supstance kroz membranu u akceptorsku komoru. Kao akceptorski medijum je korišćen fosfatni pufer pH 7,4 (8 – 9 ml), koji je tokom ispitivanja kontinuirano mešan na magnetnoj mešalici, brzinom od 300 o/min. Temperatura vodenog kupatila u kome se nalaze *Franz*-ove difuzione ćelije je podešena na 37°C, dok je temperatura membrane koja je postavljena između donorske komore i akceptorskog medijuma 32°C. U definisanim vremenskim intervalima (nakon 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 i 6 h) je uzorkovano 500 µl uzorka, koji je zatim filtriran kroz membranski filter dijametra pora 0,45 µm (MF-Millipore[®], Millipore Corporation, Bedford, SAD), nakon čega je izvršena nadoknada istom zapreminom svežeg, prethodno zagrejanog medijuma.

Koncentracija oslobođenog aceklofenaka u akceptorskom medijumu je izmerena metodom visokoeffikasne tečne hromatografije na uređaju Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Germering, Nemačka), injektovanjem 20 µl uzorka. Kao kolona je korišćena Luna C18 kolona (100 A, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), dok je smeša acetonitril/metanol/0,5% m/v amonijum-acetat (27/18/55 v/v), pH vrednosti 5,9 korišćena kao mobilna faza. Protok mobilne faze je podešen na 1 ml/min, temperatura kolone na 25°C, dok je aceklofenak detektovan pomoću UV detektora na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije (274 nm).

Eksperimentalni rezultati su prikazani kao količina aceklofenaka koja je difundovala kroz sintetsku membranu u akceptorski medijum, izražena kao procenat u odnosu na ukupnu količinu aceklofenaka u donorskom delu na početku ispitivanja. Sva ispitivanja

su vršena u triplikatu, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Dobijeni profili oslobađanja aceklofenaka su poređeni primenom statističke analize, kao i primenom model-zavisnog pristupa u kome su dobijeni profili uklapani u modele koji opisuju kinetiku oslobađanja lekovite supstance: model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda, *Higuchi* i *Korsmeyer–Peppas* model. Model koji najbolje opisuje kinetiku oslobađanja aceklofenaka iz formulacija mikroemulzija izabran je na osnovu najviših vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) između eksperimentalnih vrednosti i vrednosti predviđenih navedenim matematičkim modelima. U cilju statističke obrade podataka, korišćen je program IBM SPSS® Statistics 19 software (IBM, NY, SAD). Za statističku analizu korišćena je ANOVA, praćena Tukey post hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ ukazuje na statističku značajnost dobijenih rezultata.

3.2.4.2. In vitro procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija – test iritacije na horioalantoinskoj membrani inkubiranih kokošijih jaja (engl. Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane, HET-CAM test)

HET-CAM test je preporučen kao zamena za *in vivo* testove na životinjama od strane Komiteta za koordinaciju između agencija za validaciju alternativnih metoda (engl. *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM*), u cilju ispitivanja okularne iritacije supstanci merenjem njihovog potencijala da izazovu toksičnost na ljusci kokošijeg jajeta. S obzirom na specifičnost sluzokože oka koja uslovljava stroge zahteve za izradu preparata za oči (npr. zahtev za toničnost, sterilnost), ovaj test je prihvaćen u literaturi za procenu bezbednosti i iritacionog potencijala formulacija namenjenih za primenu na koži i mukozne membrane.

U cilju preliminarne procene iritacionog potencijala mikroemulzija sa i bez aceklofenaka korišćena su prirodno oplodena jaja kokošije vrste *New Hampshire*, sa živim embrionom i dobro razvijenim vaskularnim sistemom pod strogo kontrolisanim uslovima u toku 8 dana: temperatura 37°C i relativna vlažnost vazduha 55%. Tokom ovog perioda, jaja su okretana na svakih 12 h, izuzev tokom poslednjih 24 h, nakon čega su jaja secirana u komori sa laminarnim protokom vazduha tako da se dobije kružni isečak na konveksnoj strani prečnika 1,5 cm, nakon čega je uklonjen amnion.

Nakon toga (ne duže od 30 minuta nakon otvaranja), definisana zapremina mikroemulzija sa i bez aceklofenaka primenjena je na horioalantoinisku membranu a zatim izložena monohromatskoj svetlosti helijum-neonskog lasera talasne dužine 632,8 nm (crvena svetlost). U cilju procene stepena iritacije, ispitivani mikroemulzioni sistemi poređeni su sa fiziološkim rastvorom (negativna kontrola) i 1% rastvorom natrijum-laurilsulfata (pozitivna kontrola). Nakon 5 min, određen je stepen iritacije praćenjem hemoragije, vaskularne lize i koagulacije.

3.2.4.3. In vivo procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija

In vivo procena iritacionog potencijala mikroemulzija bez lekovite supstance sprovedena je u toku 24-časovne studije pod okluzijom, na deset zdravih ispitanika ženskog pola, bez kožnih oboljenja i bez istorije alergijskih reakcija. Protokol navedenog ispitivanja odobren je od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 91/3). Pre izvođenja studije ispitanici su detaljno upoznati su protokolom studije, nakon čega su potpisali informisani pristanak. *In vivo* procena bezbednosti mikroemulzionih formulacija sprovedena je merenjem vrednosti tri parametra: transepidermalnog gubitka vode (TEGV), stepena hidratisanosti SC (SCH) i eritema indeksa (EI), pre i nakon nanošenja ispitivanih formulacija. Pre merenja, ispitanici su proveli najmanje 30 minuta u prostoriji u kojoj je vršeno ispitivanje kako bi se prilagodili kontrolisanim atmosferskim uslovima (temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha $35 \pm 5\%$). Nakon aklimatizacije, na volarnoj strani podlaktice, na tačno označenim mestima, izvršena su bazalna merenja SCH primenom uređaja Cutometer[®] MPA 580 (Courage Khazaka, Köln, Nemačka), EI primenom uređaja Mexameter[®] MX18 (Courage Khazaka, Köln, Nemačka) i TEGV pomoću uređaja Tewameter[®] TM210 (Courage Khazaka, Köln, Nemačka). Dva mesta su ostavljena netretirana – netretirana kontrola pod okluzijom (NKO) i netretirana kontrola bez okluzije (NKBO). Nakon inicijalnih merenja, na označena mesta je naneto po 10 μL formulacija, a zatim su mesta prekrivena sa komorama 8 mm Finn Chambers[®] (Smart Practice, Phoenix, Arizona, SAD). Nakon 24-h okluzije, komore su uklonjene i svi parametri su ponovo izmereni 60 min nakon njihovog uklanjanja.

Parametri su prikazani kao procenat promene drugog dana u odnosu na bazalne vrednosti prvog dana. U cilju statističke obrade podataka, korišćen je program IBM SPSS® Statistics 19 software. Za statističku analizu parametara SCH, EI i TEGV korišćen je Mann-Whitney U-test za procenu promene vrednosti merenih drugog dana u odnosu na bazalne vrednosti merene prvog dana. Za procenu promena vrednosti ispitivanih parametara između uzoraka mikroemulzija, kao i između NKO i NKBO, korišćena je ANOVA praćena Tukey ili Games-Howell post hoc testom, u zavisnosti od dobijene p vrednosti Levene-ovog testa homogenosti varijansi. Vrednost $p < 0,05$ ukazuje na statističku značajnost dobijenih rezultata.

3.2.4.4. In vivo ispitivanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka – metoda sa trakama (engl. tape stripping method)

Američka agencija za hranu i lekove (FDA) je 1998. godine objavila nacrt vodiča sa predloženim protokolom ispitivanja za metodu sa trakama [202]. Naime, ovaj vodič dokumentuje upotrebu metode sa trakama, koja je, pored kliničkih studija, predložena kao dermatofarmakokinetički metod za procenu biološke raspoloživosti/biološke ekvivalentnosti farmaceutskih preparata namenjenih za primenu na koži. Međutim, ovaj vodič je povučen maja 2002. godine usled visokih varijabilnosti rezultata ispitivanja tretinoin gela od strane dve nezavisne laboratorije, ali su istraživačke grupe pozvane na dalji rad u cilju optimizacije ove metode kako bi se ona u budućnosti mogla koristiti za procenu biološke raspoloživosti/biološke ekvivalentnosti, a ne samo u istraživačke svrhe, za procenu dermalne raspoloživosti.

In vivo ispitivanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz izrađenih mikroemulzija sprovedeno je u skladu sa eksperimentalnim protokolom, odobrenim od strane Komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 91/2). U ispitivanju su učestvovala tri ispitanika ženskog pola, starosti 23 – 26 godina, bez istorije kožnih oboljenja i alergijskih reakcija. Ispitanici su najpre detaljno upoznati sa protokolom ispitivanja, nakon čega su potpisali informisani pristanak za učešće u ispitivanju. Pre početka ispitivanja ispitanici su proveli najmanje 30 min u prostoriji za ispitivanje u cilju prilagođavanja atmosferskim uslovima prostorije (temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha $35 \pm 5\%$). Nakon aklimatizacije, na volarnoj strani podlaktice obeležena su mesta za nanošenje ispitivanih formulacija, kako bi se osiguralo

da se uklanjanje slojeva SC tokom ispitivanja vrši uvek na mestima na kojima su i postavljene ispitivane formulacije. 1 h nakon nanošenja uzoraka na obeleženim mestima, višak uzorka je uklonjen, a zatim je sprovedeno sukcesivno uklanjanje slojeva SC primenom adhezivnih traka, površine 3,8 cm² (D-squame[®], CuDerm, Dallas, SAD), nakon primene pritiska od 140 g/cm² u trajanju od 10 s. U cilju sticanja uvida u uticaj primenjenog postupka na funkcionalni integritet kože, vršeno je merenje TEGV, nakon uklanjanja 4., 8. i 12. trake. Za dobijanje penetracionih profila lekovite supstance, korišćen je prethodno opisan protokol [203].

Nakon postupka ekstrakcije etanolom (70% v/v) na ultrazvučnom kupatilu (Sonorex RK102H, Bandelin, Berlin, Nemačka), uzorci su podvrgnuti centrifugiranju (Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Varšava, Poljska) i filtraciji kroz membranski filter dijametra pora 0,45 μm, a sadržaj aceklofenaka u dobijenim ekstraktima je određen primenom ultra visokoeffikasne tečne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS, Thermo Scientific liquid chromatography system: Accela 600 pump, Accela Autosampler; Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole mass spectrometer; Thermo Fisher Scientific, San Jose, Kalifornija, SAD).

U cilju statističke obrade podataka, korišćen je program IBM SPSS[®] Statistics 19 software. Za poređenje ukupne količine aceklofenaka koja je penetrirala u SC iz različitih formulacija korišćena je ANOVA praćena Tukey post hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ ukazuje na statističku značajnost dobijenih rezultata.

3.2.4.5. In vivo ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka iz izrađenih formulacija na pacovima Wistar soja

Ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka iz odabranih mikroemulzionih formulacija nakon primene na koži pacova sprovedeno je u skladu sa eksperimentalnim protokolom odobrenim od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije – Uprava za veterinu (rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama br. 712/2). Eksperimenti su izvedeni na zdravim mužjacima pacova *Wistar* soja, telesne mase 200 – 300 g (farma Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Srbija). Pacovi su odgajani u standardnim kavezima od pleksiglasa, na sobnoj temperaturi i relativnoj vlažnosti

vazduha 40-70%, i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 06:00 h do 18:00 h, intenzitet svetla 120 lx). Životinje su imale pristup hrani i vodi *ad libitum*.

U zavisnosti od primenjenog tretmana, eksperimentalne životinje su podeljene u 5 grupa:

Grupa 1: Na kožu pacova primenjeno je 200 μ l formulacije mikroemulzija sa aceklofenakom, u kojoj je kao surfaktant korišćen saharoza laurat,

Grupa 2: Na kožu pacova primenjeno je 200 μ l formulacije mikroemulzija sa aceklofenakom, u kojoj je kao surfaktant korišćen saharoza miristat,

Grupa 3: Na kožu pacova primenjeno je 200 μ l formulacije mikroemulzija sa aceklofenakom, u kojoj je kao surfaktant korišćen polisorbat 80,

Grupa 4: Intravenski (i.v.) je primenjen rastvor aceklofenaka u smeši 25% etanola (96% v/v) i 75% fosfatnog pufera pH = 7,4,

Grupa 5: Supkutano (s.c.) je primenjen rastvor aceklofenaka u smeši 25% etanola (96% v/v) i 75% fosfatnog pufera pH = 7,4.

Dan pre primene formulacije, eksperimentalne životinje kod kojih je vršena primena formulacija na kožu (grupe 1-3) su podvrgnute anesteziji primenom intraperitonealne injekcije ketamina (10% Ketamidol, Richter Pharma Ag, Wels, Austrija), nakon čega je izvršeno uklanjanje dlaka sa određenog regiona na leđima životinje, koji je zatim ispiran prečišćenom vodom. Neposredno pre nanošenja formulacije na prethodno pripremljeni region na leđima pacova, fiksiran je kontejner površine 2,01 cm² u koji je naneta unapred definisana zapremina formulacije (200 μ l). Nakon nanošenja formulacije, otvor kontejnera je prekriven pomoću silikonskog parafilm (Parafilm[®], SAD), kako bi se sprečilo isparavanje i curenje formulacije. U grupi 4, rastvor aceklofenaka je primenjen i.v. u količini od 15 mg/kg u repnu venu primenom infuzione pumpe (Stoelting Co., Wood Dale, SAD), dok je u grupi 5 ekvivalentna količina aceklofenaka primenjena u supkutani region životinje.

U unapred definisanim vremenskim intervalima određenim preliminarnim eksperimentom (20 min, 40 min, 60 min, 3 h, 6 h, i 24 h nakon primene tretmana), iz repne vene tretiranih životinja uzorkovana je krv (200 μ l) u heparinizovane tube. Odmah nakon uzimanja uzoraka izdvojena je plazma (100 μ l) centrifugiranjem pri

brzini od 3000 o/min u trajanju od 15 min (Eppendorf MiniSpin1 plus, Westbury, NY, SAD). Nakon toga izvršena je ekstrakcija aceklofenaka iz plazme primenom modifikovane eksperimentalne procedure opisane od strane Mutalik i saradnika [204]. Korišćeni postupak ekstrakcije podrazumeva dodatak 25 μ l metanola i 200 μ l acetonitrila celokupnoj zapremini izdvojene plazme (100 μ l), mešanje na vorteks mešalici tokom 1 min, nakon čega se vrši dodatak smeše metanol:visokoprečišćena voda u odnosu 80:20 (v/v) do ukupne zapremine od 1 ml. Dobijeni rastvor je zatim ponovo podvrgnut mešanju na vorteks mešalici u trajanju od 1 min i centrifugiranju pri brzini 10000 o/min tokom 10 min. Rastvori za pripremu kalibracione krive su pripremljeni dodatkom 5 μ l rastvora radnog standarda (koncentracija aceklofenaka i diklofenaka od 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 i 70 μ g/ml u metanolu) u 95 μ l plazme nakon čega je rastvor podvrgnut prethodno opisanom postupku kao u slučaju ispitivanih uzoraka. Nakon primenjenog postupka razdvojen je supernatant, a koncentracija aceklofenaka i diklofenaka je određena primenom LC–MS/MS metode.

Primenom PK Functions modula (Usansky, Desai and Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, Kalifornija, <http://www.boomer.org/pkin/soft.html>) implementiranog u Microsoft Excel[®] programski paket izračunati su farmakokinetički parametri aceklofenaka: maksimalna koncentracija aceklofenaka i njegovog metabolita diklofenaka u plazmi (c_{\max} i c^*_{\max}), vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije aceklofenaka i diklofenaka u plazmi (t_{\max} i t^*_{\max}) i ukupna površina ispod krive koncentracije aceklofenaka i diklofenaka u plazmi od početnog vremena do vremena poslednje izmerene koncentracije (PIK_{0-24} i PIK^*_{0-24}).

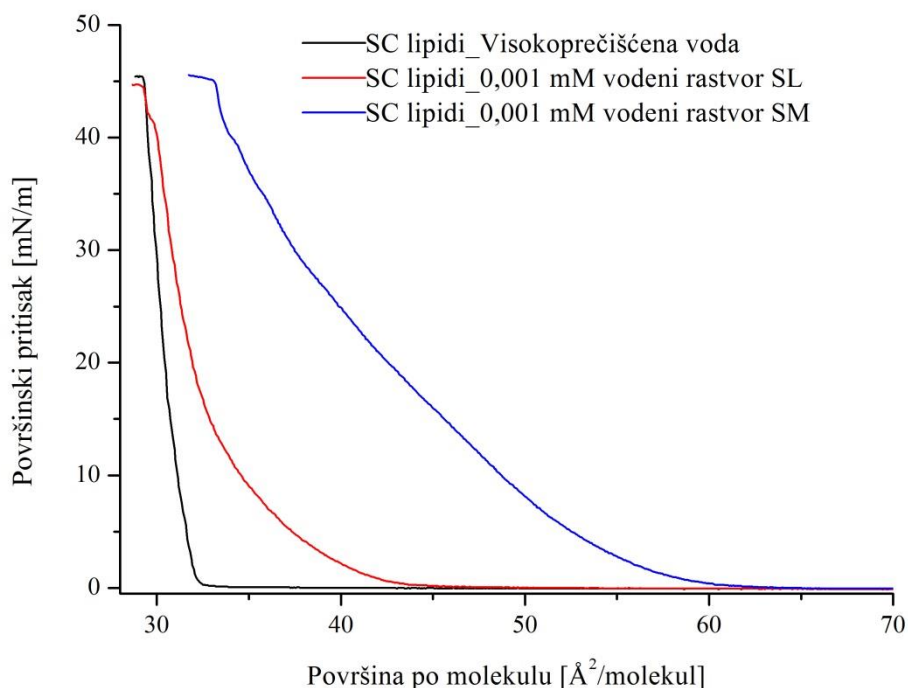
U cilju statističke obrade podataka, korišćen je program IBM SPSS[®] Statistics 19 software. Za poređenje farmakokinetičkih parametara aceklofenaka nakon primene različitih mikroemulzionih formulacija na koži pacova (c_{\max} i PIK_{0-24}), korišćen je statistički test ANOVA praćen Tukey post hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ ukazuje na statističku značajnost dobijenih rezultata.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze istraživanja

4.1.1. π -A izoterme i kompresibilnost monosloja na međupovršini voda/vazduh

U ovoj studiji je smeša CerAS:SA:Chol u molarnom odnosu 1:1:0,7 (*SC lipidi*) korišćena kao kombinacija lipida koja u *in vitro* uslovima imitira intercelularne lipide SC. Penetracioni eksperiment u okviru ovog eksperimentalnog dela doktorske disertacije je uključio nanošenje i rasprostiranje SC lipida na tri različite subfaze. Na **Slici 4.1** su prikazane π -A izoterme dobijene nakon nanošenja SC lipida na subfaze: visokoprečišćenu vodu, 0,001 mM vodeni rastvor SL i 0,001 mM vodeni rastvor SM.



Slika 4.1. π -A izoterme SC lipida na međupovršini voda/vazduh na različitim subfazama na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kao što se na **Slici 4.1** može videti, izoterma SC lipida na visokoprečišćenju vodi kao subfazi (crna linija na grafiku) ima oblik i nagib koji su karakteristični za kondenzovane filmove bez postojanja faznih prelaza, što je u skladu sa ranijim istraživanjima o faznom ponašanju biološki sličnih SC lipida [205]. Na grafiku se može uočiti da tokom kompresije monosloja SC lipida na međupovršini voda/vazduh, pritisak

počinje da raste kada je vrednost $A \sim 32,5 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$, nakon čega sledi nagli porast pritiska, i konačno, kolaps filma pri vrednosti $A \sim 29,3 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$ i $\pi \sim 45,3 \text{ mN/m}$. Dobijene vrednosti površine po molekulu u trenutku kolapsa ukazuju na izuzetno gusto pakovanje SC lipida na međupovršini voda/vazduh (tj. ukazuju na LC stanje filma) [206]. Nasuprot tome, kompresijom SC lipida na 0,001 mM vodenom rastvoru C12- ili C14- saharoznih estara (plava i crvena linija na **Slici 4.1**), dobijene su π -A izoterme koje se značajno razlikuju u poređenju sa izotermom koja je konstruisana korišćenjem visokoprečišćene vode kao subfaze. Kako bi se razumeli dobijeni rezultati, treba poznavati ponašanje razblaženih vodenih rastvora surfaktanta: kada je koncentracija surfaktanta ispod CMC, monomeri surfaktanta (u ovom slučaju SL i SM) mogu da penetriraju u monosloj na međufazi voda/vazduh i da posledično povećaju fluidnost lipida SC [168]. Pomeranje izoterma ka višim vrednostima površine po molekulu, pri svim vrednostima površinskog pritiska (**Slika 4.1**), ukazuje da saharozni estri difunduju u monosloj SC lipida *ab initio*. Pomeranje π -A izoterme SC lipida ka višim molekularnim površinama, kada se kao subfaza koriste vodeni rastvori saharoznih estara (**Tabele 4.1** i **4.2**), i bliske vrednosti pritiska pri kome se dešava kolaps filma na međufazi voda/vazduh, jasno ukazuju da je još jedna komponenta inkorporirana u monosloj SC lipida. Uzimajući u obzir mali poprečni presek hidrofilnih glava lipida SC, jasno je da će orijentacija lanaca imati veliki uticaj na pakovanje molekula u monosloju na granici faza voda/vazduh. Stoga, očigledno povećanje površine po molekulu može biti, bar delimično, posledica promene orijentacije lipofilnog dela molekula nakon penetracije saharoznih estara [207].

S obzirom da struktura lipofilnog dela surfaktanta ima veliki uticaj na penetraciju lekovite supstance [208], treba istaći da se korišćeni saharozni estri, koji su rastvoreni u subfazi, razlikuju samo u dužini ugljovodoničnog lanca. Imajući ovo u vidu, može se zaključiti da su razlike u nagibu π -A izoterma, koje su uočavaju na **Slici 4.1**, kao i razlike u dobijenim vrednostima površine po molekulu pri kojoj počinje porast površinskog pritiska (tzv. *lift-off* površina), posledica različite dužine ugljovodoničnog lanca surfaktanta rastvorenog u subfazi, s obzirom da SL i SM imaju isti hidrofilni deo molekula (molekul saharoze). Tokom kompresije filma, prosečna površina po molekulu je kontinuirano veća nakon rasprostiranja lipida SC na subfaze koje u svom sastavu sadrže saharozne estre u odnosu na monosloj dobijen nanošenjem SC lipida na

visokoprečišćenu vodu (na 20 mN/m prosečna površina po molekulu je bila 30,5; 32,1 i 42,5 Å²/molekulu za monosloj na visokoprečišćenoj vodi, 0,001 mM rastvoru SL i 0,001 mM rastvoru SM u vodi, respektivno). Očigledno, molekuli SL su difundovali u monosloj SC lipida izazivajući tzv. ekspanzioni efekat. Iako je ova pojava nedvosmisleno prisutna i u slučaju kada je u subfazi prisutan saharozni estar sa dužim ugljovodoničnim lancem (SM), očigledno je da ovaj molekul ima veću površinsku aktivnost, usled većeg uticaja na prosečnu površinu po molekulu. Međutim, na osnovu dobijenih vrednosti minimalne površine po molekulu, jasno je da tokom kompresije dolazi do gubitka (tj. desorpcije) molekula saharoznih estara sa međupovršine voda/vazduh. I pored toga, značajan broj molekula saharoznog estara ostaje zarobljen na međupovršini usled privlačnih van der Valsovih veza između SC lipida i molekula saharoznih estara [209], a ovaj efekat je izraženiji u slučaju surfaktanta sa dužim ugljovodoničnim lancem. Ovaj rezultat je očekivan, imajući u vidu da sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca dolazi do povećanja hidrofobnih efekata molekula [210].

Kako bi se bolje razumeli dobijeni rezultati, paralelno sa praćenjem penetracije saharoznih estara u SC lipidni monosloj, praćena je vremenski zavisna adsorpcija saharoznih estara iz subfaze na čistu međupovršinu voda/vazduh. Shodno tome, na **Slici 4.2** su prikazane π -t adsorpcione izoterme, izražene kao povećanje površinskog pritiska u funkciji vremena. S obzirom na amfifilne osobine saharoznih estara (**Tabela 3.1**), očekuje se da fizičko-hemijske osobine međupovršine voda/vazduh zavise od prisustva surfaktanta (SL ili SM) u subfazi, s obzirom da je formiranje Gibsovog monosloja termodinamički favorizovan proces. U tom slučaju, adsorpcija surfaktanta na međufazu se dešava ukoliko energija razmene sa površinom prevaziđe povećanje slobodne energije usled uklanjanja molekula iz rastvora [211].

Kao što je i očekivano, na **Slici 4.2** se može zapaziti da saharozni estri, kao amfifilni molekuli, imaju tendenciju da se adsorbuju, zauzimaju određeni prostor, i orijentišu na međupovršini. Treba imati u vidu da se ravnotežni površinski pritisak (π_{∞}) rastvora surfaktanta ne postiže momentalno [212]. Takođe, važno je istaći da pri ovim uslovima difuzija i reorijentacija molekula imaju važnu ulogu u toku adsorpcije na međupovršinu [213], te je iz tih razloga ovaj eksperiment izveden korišćenjem razblaženih vodenih rastvora saharoznih estara čija je koncentracija niža od njihove CMC [214, 215].

Tabela 4.1. Karakteristični parametri Langmuir-ovog monosloja smeša SC lipida sa saharoza lauratom na različitim subfazama na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Monosloj	Subfaza	Minimalna površina po molekulu ($\text{\AA}^2/\text{molekul}$)	Pritisak kolapsa (mN/m)	Lift-off površina ($\text{\AA}^2/\text{molekul}$)
Saharoza laurat : SC lipidi = 0 : 100	Visokoprečišćena voda	29,3	45,3	32,5
Saharoza laurat : SC lipidi = 25 : 75	Visokoprečišćena voda	24,2	46,1	32,3
Saharoza laurat : SC lipidi = 50 : 50	Visokoprečišćena voda	17,1	43,3	39,1
Saharoza laurat : SC lipidi = 75 : 25	Visokoprečišćena voda	13,9	18,7	52,3
Saharoza laurat : SC lipidi = 100 : 0	Visokoprečišćena voda	17,9	10,9	63,9
SC lipidi (Ceramid AS C18:18 : Stearinska kiselina : Holesterol = 1 : 1 : 0,7)	0,001 mM vodeni rastvor saharoza laurata	29,3	44,6	44,5

Tabela 4.2. Karakteristični parametri Langmuir-ovog monosloja smeša SC lipida sa saharoza miristatom na različitim subfazama na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Monosloj	Subfaza	Minimalna površina po molekulu ($\text{\AA}^2/\text{molekul}$)	Pritisak kolapsa (mN/m)	Lift-off površina ($\text{\AA}^2/\text{molekul}$)
Saharoza miristat : SC lipidi = 0 : 100	Visokoprečišćena voda	29,3	45,3	32,5
Saharoza miristat : SC lipidi = 25 : 75	Visokoprečišćena voda	26,7	46,2	42,5
Saharoza miristat : SC lipidi = 50 : 50	Visokoprečišćena voda	19,4	46,2	58,1
Saharoza miristat : SC lipidi = 75 : 25	Visokoprečišćena voda	18,2	30,6	75,2
Saharoza miristat : SC lipidi = 100 : 0	Visokoprečišćena voda	26,1	26,5	84,1
SC lipidi (Ceramid AS C18:18 : Stearinska kiselina : Holesterol = 1 : 1 : 0,7)	0,001 mM vodeni rastvor saharoza miristata	33,1	45,1	62,1

Naime, molekuli surfaktanta prvo difunduju ka površini, i tek nakon toga se adsorbuju, zauzimajući pravilnu orijentaciju [212]. U slučaju kada je difuzija ograničavajući proces, za uspostavljanje korelacije između površinskog pritiska i vremena može se koristiti izmenjen oblik jedničine Ward i Tordai [212]:

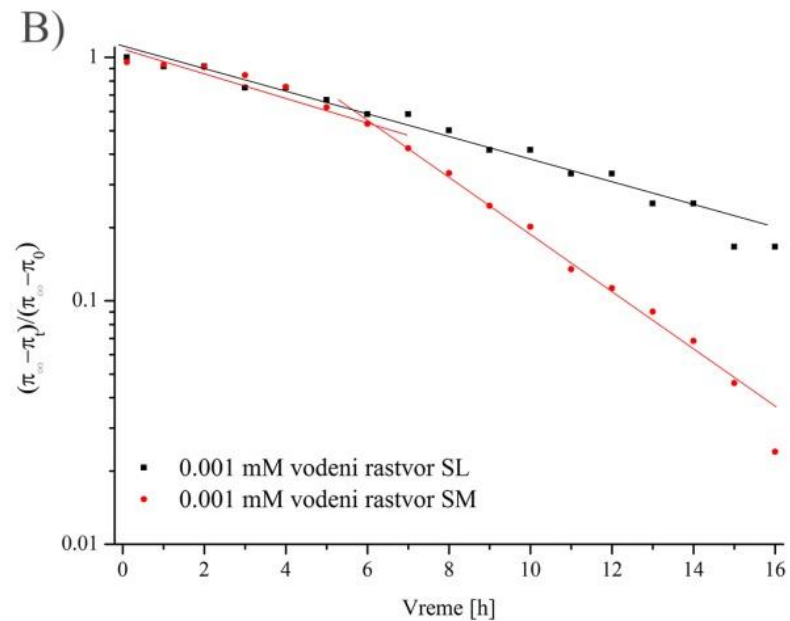
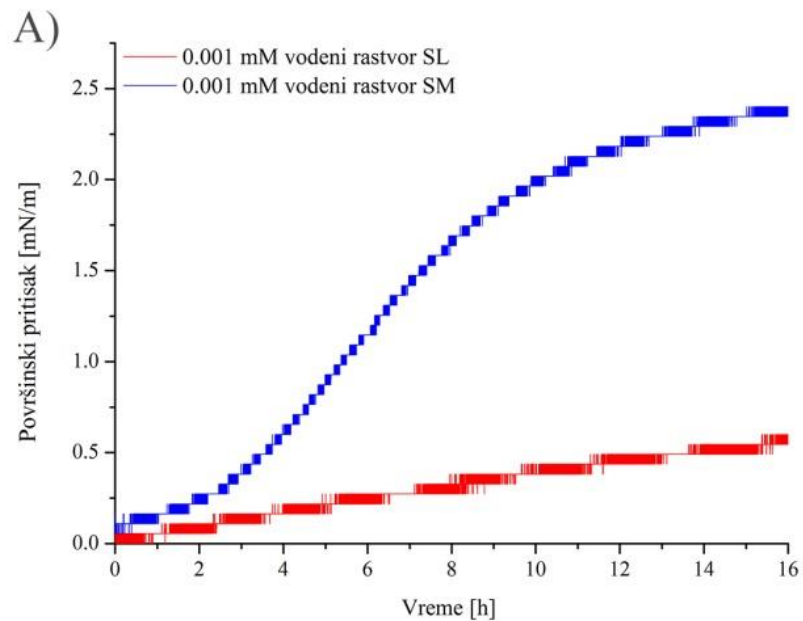
$$\pi = 2C_0KT \left(D_{\text{diff}}t/3.14 \right)^{1/2} \quad \text{Jednačina 4.1}$$

gde je C_0 koncentracija u vodenoj fazi, K je Bolzmanova konstanta, T apsolutna temperatura, D_{diff} je difuzioni koeficijent, a t je adsorpciono vreme. Ukoliko je difuzija faktor koji kontroliše adsorpciju, grafik zavisnosti površinskog pritiska u funkciji $t^{1/2}$ je linearan i nagib ovog grafika odgovara stepenu difuzije K_{diff} [216]. Interesantno, površinska aktivnost SL i SM molekula se razlikuje. U slučaju eksperimenta sa SL, dobijena vrednost K_{diff} je 0,97, dok u slučaju SM 0,95, pokazujući veći stepen linearnosti u slučaju saharoznog estra sa kraćim ugljovodoničnim nizom. Međutim, posmatrajući grafik prikazan na **Slici 4.2**, može se uočiti da u slučaju SM, proces adsorpcije nije uslovljen samo difuzijom, ukazujući da intermolekulske interakcije i sile kohezije između adsorbiranih molekula imaju važnu ulogu u adsorpcionoj kinetici saharoznog estra sa dužim ugljovodoničnim nizom [212].

Shodno tome, kako bi se detaljno proučila oba procesa, adsorpcija i reorijentacija, može se koristiti model predložen od strane Graham i Phillips [217]. U skladu sa ovim pristupom kinetika adsorpcije može da se opiše Jednačinom 4.2:

$$\ln[(\pi_{\infty} - \pi_t)/(\pi_{\infty} - \pi_0)] = -Kt \quad \text{Jednačina 4.2}$$

gde su π_{∞} , π_t , i π_0 vrednosti površinskog pritiska u stanju ravnoteže, u bilo koje vreme t i u vremenu $t = 0$. Kao što se može videti na **Slici 4.2B**, u slučaju SM ovaj grafik ima dva nagiba koji odgovaraju konstantama K_1 i K_2 . Početni nagib predstavlja konstantu adsorpcije (K_1), dok drugi nagib odgovara konstanti reorijentacije (K_2) između nepromenljivog broja adsorbiranih molekula na međupovršini voda/vazduh [218]. Shodno tome, za razliku od C12- saharoznog estra, u slučaju SM povećanje površinskog pritiska je praćeno platoom, ukazujući na dinamičku ravnotežu i zasićenje međupovršine voda/vazduh.

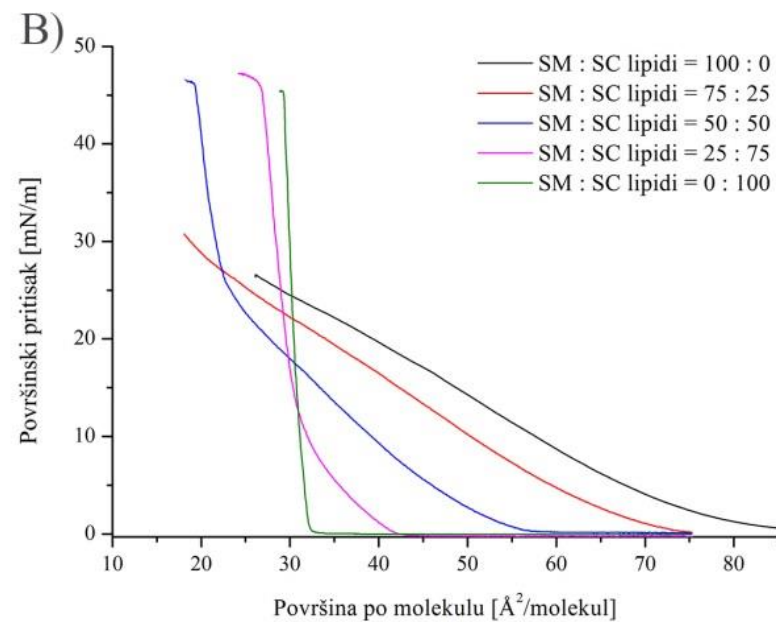
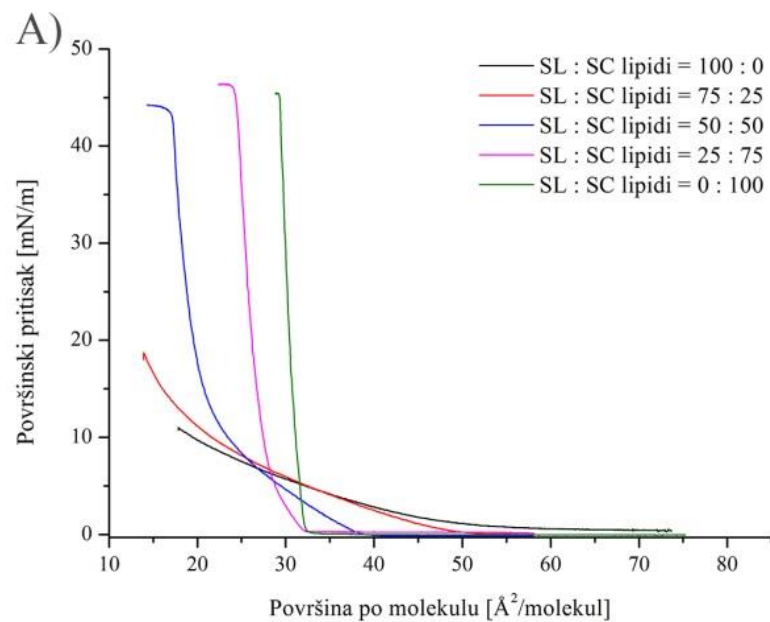


Slika 4.2. A) Vremenski zavisno povećanje površinskog pritiska usled adsorpcije saharoza laurata i saharoza miristata iz 0,001 mM vodenog rastvora surfaktanta u subfazi na temperaturi $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; B) kinetika adsorpcije u skladu sa jednačinom $\ln[(\pi_{\infty} - \pi_t) / (\pi_{\infty} - \pi_0)] = -Kt$ iz 0,001 mM vodenog rastvora surfaktanta u subfazi na temperaturi $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Svi ovi rezultati (**Slike 4.1** i **4.2**) dovode do sledećih zaključaka: i) adsorpcioni procesi su brži ukoliko su SC lipidi prisutni na međupovršini; ii) saharozni estri mogu da ostanu u monosloju iznad pojedinačnih ravnotežnih pritisaka. Kako bi se dokazale interakcije na međufazi voda/vazduh između saharoznih estara i SC lipida, dalji tok eksperimenta je uključio mešanje ovih komponenata u različitim molarnim udelima i sledstvenu analizu mešanja i termodinamičkih osobina tako dobijenih mešanih monoslojeva.

4.1.2. Termodinamičko i fazno ponašanje smeša SC lipida i saharoznih estara

Na **Slici 4.3** su prikazane π -A izoterme čistih saharoznih estara, kao i njihovih smeša sa lipidima SC u različitim molarnim odnosima. Za razumevanje dobijenih izoterma smeša saharozni estar:SC lipidi, od značaja je izvršiti analizu kompresionih π -A izoterma saharoznih estara dobijenih na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Iako su oba saharozna estra rastvorljiva u vodi, nakon rasprostiranja oni ostaju delimično zarobljeni na međupovršini voda/vazduh. Tokom kompresije, *lift-off* tačka za monosloj SL je $\sim 63.9 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$ (**Tabela 4.1**), dok je za SM ova vrednost $\sim 84.1 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$ (**Tabela 4.2**). U oba slučaja nagib ovih izoterma (**Slika 4.3A** i **B**) je veoma mali, ukazujući: i) na LE stanje monosloja saharoznih estara, ii) delimično rastvaranje saharoznih estara u subfazi tokom kompresije, iii) da saharozni estri ne mogu da dostignu LC stanje, tj. stanje visoke uređenosti na međusloju voda/vazduh [209]. Međutim, ako se uporede izoterme dobijene kompresijom SL (**Slika 4.3A**) i SM (**Slika 4.3B**), može se zaključiti da sa povećanjem broja CH_2 jedinica za datu vrednost površinskog pritiska, izoterma se pomera ka većim prosečnim površinama po molekulu. Pored toga, veće vrednosti površine po molekulu u slučaju SM ukazuju i na sporiju desorpciju i rastvaranje SM u visokoprečišćenoj vodi koja je korišćena kao subfaza, te da ovi molekuli u većem stepenu ostaju zarobljeni na međupovršini voda/vazduh.



Slika 4.3. Izoterme površinski pritisak-površina po molekulu na međupovršini voda/vazduh smeša SC lipida sa A) saharoza lauratom, i B) saharoza miristatom, pri različitim molarnim odnosima (sadržaj saharoznih estara 0%, 25%, 50%, 75% i 100%) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

U višekomponentnom monosloju dvodimenzionalno mešanje komponenata predstavlja veliki problem. U ovoj studiji CerAS, SA i Chol su korišćeni kao lipidi koji imitiraju biološke intercelularne lipide SC. Upravo zbog mešanja u monosloju, ove komponente su izabrane tako da imaju istu dužinu ugljovodoničnog lanca (C18), a molarni odnos je izabran tako da se izbegne stvaranje kristala, i shodno tome, razdvajanje Chol. Sa ciljem analiziranja elastičnosti monosloja, iz eksperimentalno dobijenih π -A izoterme izračunat je modul kompresibilnosti (C_s^{-1}) pomoću jednačine:

$$C_s^{-1} = -A (d\pi/dA)_T \quad \text{Jednačina 4.3}$$

gde je A prosečna površina po molekulu, a π je površinski pritisak na konstantnoj temperaturi T [205, 206].

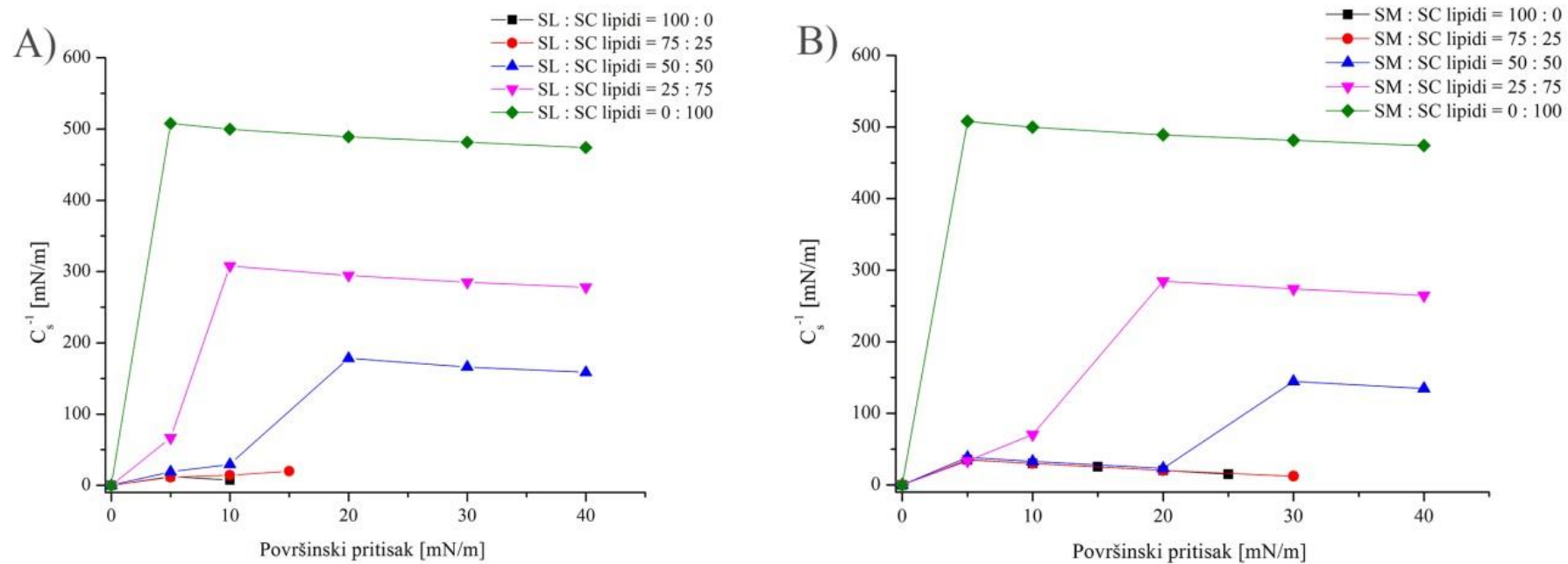
Na **Slici 4.4** je predstavljen grafik zavisnosti C_s^{-1} u funkciji π za izoterme koje su prikazane na **Slici 4.3**. Niska vrednost C_s^{-1} ukazuje da monosloj ima veću elastičnost, tj. manji međupovršinski rigiditet [205]. Kada je monosloj na granici voda/vazduh u LC stanju, vrednost nagiba π -A izoterme, i posledično vrednosti C_s^{-1} izračunate na osnovu Jednačine 4.3, su visoke, te je stoga monosloj manje kompresibilan. Kao što je već rečeno, u slučaju oba korišćena saharozna estera, alifatični lanci su konformaciono neuređeni, te je LE stanje monosloja indikovano veoma niskim vrednostima modula kompresibilnosti ($C_s^{-1} < 50$ mN/m) [206]. Takođe, razlika u nagibu između C12- i C14-saharoznih estara ukazuje na različitu stabilnost monosloja na međupovršini (različita desorpciona kinetika). Suprotno, u slučaju lipida SC, izoterma ima strm nagib (**Slika 4.3**), dok su dobijene vrednosti C_s^{-1} veće od 450 mN/m za sve vrednosti površinskog pritiska (**Slika 4.4**), dajući potvrdu da je ovaj monosloj u LC stanju. Interesantno, dodatak saharoznih estara lipidima SC, značajno utiče i na *lift-off* tačku i na nagib π -A izoterme, te posledično i na kompresibilnost tako formiranog monosloja na međufazi voda/vazduh. U **Tabelama 4.1** i **4.2** se uočava porast vrednosti prosečne površine po molekulu od 32,5 do 52,3 i 75,2 Å²/molekul u slučaju smeša 75:25 SL:SC lipidi i SM:SC lipidi, respektivno. Oblik π -A izoterme pri nižem molarnom udelu saharoznih estara (do 50%) podseća na izotermu dobijenu za SC lipide, s tim što je izoterma pomešana ka nižim vrednostima površine po molekulu. Oblik ovih izoterme je karakterističan za kondenzovani monosloj, naročito pri višim vrednostima površinskog

pritiska. Pri većem udelu saharoznih estara, izoterme su slične izotermama dobijenim kompresijom monosloja čistih saharoznih estara.

Ukoliko se pogledaju prosečne vrednosti površine po molekulu, jasno je da jedan deo saharoznih estara ostaje u monosloju SC, čak i pri visokim vrednostima površinskog pritiska, što može da ukaže na kondenzujući efekat SC lipida na saharozne estre. Naime, u slučaju da dođe do potpune desorpcije saharoznih estara, očekivalo bi se smanjenje površine za 25% u slučaju smeše saharozni estar:SC lipidi = 25:75, tj. za 50% u slučaju smeše saharozni estar:SC lipidi = 50:50. Umesto toga, za vrednost površinskog pritiska 40 mN/m za smešu saharozni estar:SC lipidi = 25:75 dobijene vrednosti površine su za 18% (SL) i 38% (SM) veće u poređenju sa očekivanim, tj. za smešu saharozni estar:SC lipidi = 50:50 vrednosti su veće za 11% (SL) i 26% (SM). Ovo se može razumeti na sledeći način: i) što je više saharoznih estara prisutno u monosloju, to će više molekula biti desorbovano sa međupovršine, ii) SM u većem stepenu ostaje u monosloju sa SC lipidima, usled privlačnih veza između molekula u poređenju sa saharoznim estrom sa kraćim ugljovodoničnim lancem.

Kao veoma interesantna se izdvaja π -A izoterma koja se dobija kompresijom monosloja smeše SM:SC lipidi = 50:50. Ova izoterma ima plato na oko 20 mN/m što može ukazivati na fazni prelaz prvog reda iz LE u LC stanje ili na ubrzanu desorpciju velikog broja SM molekula. U slučaju C14-saharoznog estara, *lift-off* tačka se kontinuirano povećava sa povećanjem količine SM u smešama sa SC lipidima. U slučaju SL, ovaj trend je prisutan, ali je manje izražen. Kada se saharozni estri pomešaju sa lipidima SC, vrednost C_s^{-1} monotono opada sa povećanjem udela saharoznog estara. Dodatak saharoznih estara u količini od 25 mol% dovodi do smanjivanja C_s^{-1} na polovinu početne vrednosti, što direktno ukazuje na značajan fluidizirajući efekat saharoznih estara na lipide SC. Sa druge strane, monosloj koji sadrži 75 mol% saharoznog estara, ima vrednost kompresibilnosti sličnu čistim saharoznim estrima.

U nastavku, interakcije između saharoznih estara i lipida SC su proučavane procenom prosečne vrednosti površine po molekulu (engl. *mean molecular area*, MMA) i viška Gibsove energije (engl. *excess Gibbs energy*, ΔG_{ex}). Na **Slici 4.5** je prikazana zavisnost MMA pri datim vrednostima površinskog pritiska od udela SL i SM u smeši sa lipidima SC.



Slika 4.4. Modul kompresibilnosti (C_s^{-1}) za smeše SC lipida sa A) saharoza lauratom, i B) saharoza miristatom, pri različitim molarним odnosima (sadržaj saharoznih estara 0%, 25%, 50%, 75% i 100%) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ovakva zavisnost je već proučavana u sličnim istraživanjima, i može pružiti značajne podatke o mešanju saharoznih estara sa lipidima SC u monosloju na međufazi voda/vazduh [205, 219]. Treba naglasiti da su u ovoj doktorskoj disertaciji lipidi SC posmatrani kao jedna komponenta (tj. pseudokomponenta) kako bi se bolje razumela interakcija saharoznih estara sa intercelularnim lipidima SC. Simboli prikazani na **Slici 4.5** predstavljaju eksperimentalno dobijene MMA vrednosti, a isprekidana linija predstavlja izračunate vrednosti u skladu sa pravilom aditivnosti prikazanim u jednačini:

$$A_{12} = A_1X_1 + (1 - X_1)A_2 \quad \textbf{Jednačina 4.4}$$

gde je A_{12} prosečna površina po molekulu, X_1 je molarni udeo komponente 1, a A_1 i A_2 su MMA vrednosti monosloja čiste komponente 1 (SL ili SM) ili komponente 2 (SC lipidi) na datoj vrednosti površinskog pritiska. Međutim, navedeno pravilo aditivnosti omogućava procenu interakcija između komponenata u monosloju samo ispod pritiska kolapsa komponente sa najnižom vrednošću pritiska kolapsa [210]. Ova zavisnost je linearna ukoliko se komponente idealno mešaju ili ukoliko su potpuno fazno-razdvojene, dok bilo koje odstupanje od isprekidane linije ukazuje na interakciju, tj. jače privlačne ili odbojne sile između molekula smeše u odnosu na monosloj čistih komponenata [219].

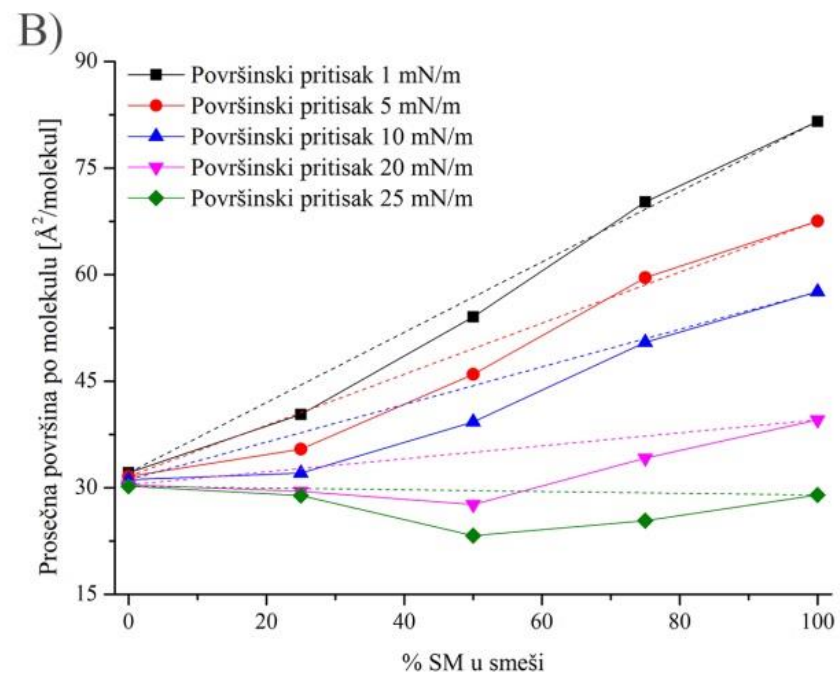
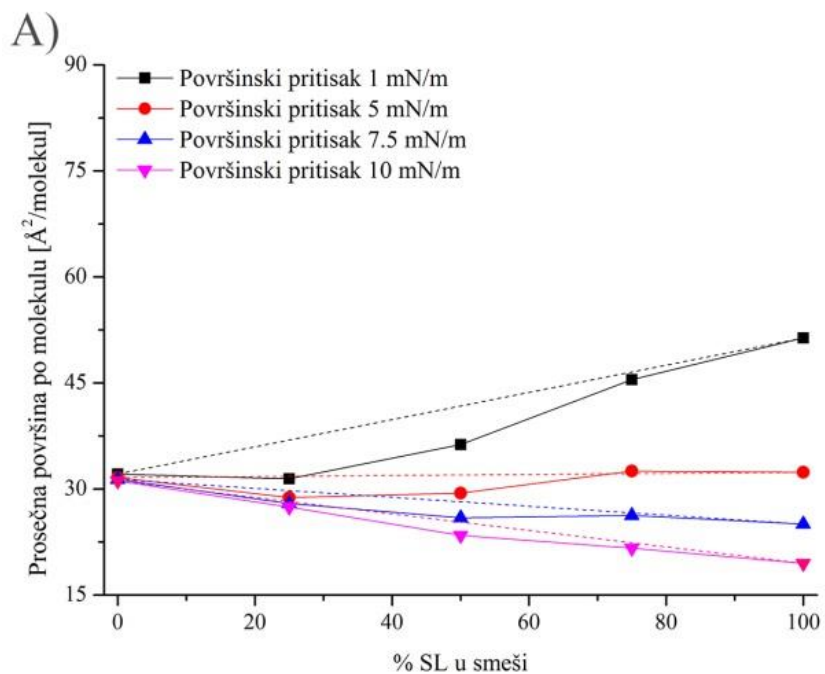
Kao što se vidi na **Slici 4.5**, ne postoji linearna zavisnost između vrednosti MMA i udela saharoznih estara u smeši sa lipidima SC, što ukazuje da se komponente ne mešaju idealno, ali nisu ni potpuno razdvojene. Stoga, može se izvesti zaključak da se saharozni estri i SC lipidi delimično mešaju i formiraju neidealni monosloj na međufazi voda/vazduh. U slučaju SL, negativna devijacija postoji za smeše sa udelom SL < 75%, verovatno usled privlačnih sila, uprkos značajnim razlikama u dužini ugljovodoničnog lanca izabranih model lipida SC i C12-saharoznog estera. Za niže odnose u smeši sa SM, molekuli zauzimaju niže površine u odnosu na idealnu smešu, verovatno usled dominantnih privlačnih sila. U odnosu na idealnu (isprekidanu) liniju, pri visokom udelu saharoznih estara (75% SL ili SM) podaci ukazuju da je prisutna mala pozitivna devijacija, što ukazuje na slabljenje privlačnih ili jačanje odbojnih sila između komponenata u pseudo-dvofaznoj smeši [219]. Interesantno, u smeši sa SM, eksperimentalne MMA vrednosti više odstupaju od idealnih izračunatih na osnovu

Jednačine 4.4, u poređenju sa vrednostima dobijenim za smeše SC lipidi-SL. Ovo ukazuje da je duži lanac SM odgovoran za jače van der Valsove interakcije kao i da je veća količina SM ostala u monosloju na međufazi voda/vazduh [210].

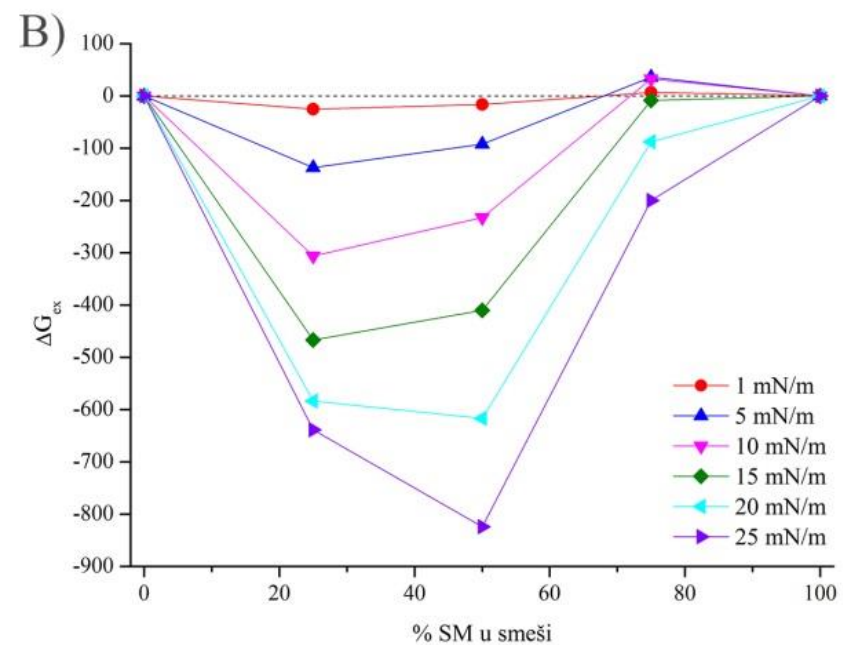
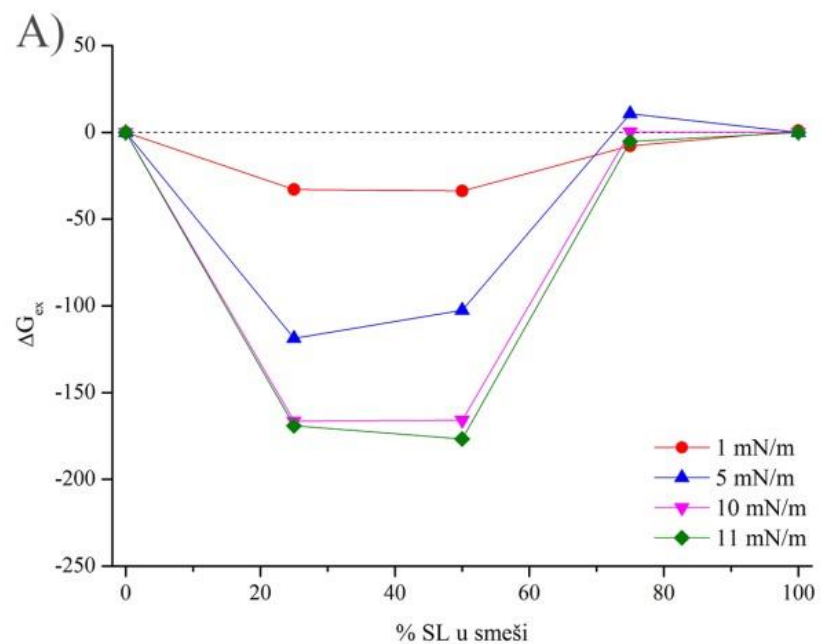
Analiza vrednosti ΔG_{ex} u funkciji sastava monosloja, omogućava kvantitativnu procenu mešanja u monosloju, i shodno tome, uvid u jačinu interakcija između komponenata. Grafik zavisnosti ΔG_{ex} u funkciji molarnog udela saharoznih estara u smeši SC lipidi-saharozni estri prikazan je na **Slici 4.6**. ΔG_{ex} se računa na osnovu Jednačine 4.5:

$$\Delta G_{ex} = N \int_0^\pi [A_{12} - (A_1 X_1 + A_2 X_2)] d\pi \quad \text{Jednačina 4.5}$$

gde je N Avogadrov broj. Vrednost ΔG_{ex} je 0 ukoliko su komponente potpuno razdvojene ili se idealno mešaju, dok su smeše sa negativnom vrednošću izračunatog parametra termodinamički stabilne [205]. Interesantno, kao što se vidi na **Slici 4.6**, dva karakteristična regiona ukazuju na interakciju između saharoznih estara i SC lipida – prvi region pri molarnom udelu saharoznog estara $\leq 50\%$, gde je vrednost ΔG_{ex} negativna, i drugi region, pri višem odnosu saharoznih estara (75 mol%), u kome je vrednost ΔG_{ex} pozitivna. U prvom regionu, saharozni estri privlačnim silama interaguju sa lipidima SC na međufazi voda/vazduh, ukazujući na termodinamički stabilan monosloj. U slučaju većeg sadržaja saharoznih estara, odbojne sile rastu te stoga dolazi do razdvajanja faza. Pozitivne vrednosti ΔG_{ex} ukazuju na manju stabilnost filma, dok negativne vrednosti ukazuju na prisustvo privlačnih veza između komponenata smeša. Ovi rezultati ukazuju da mešanje SC lipida sa saharoznim estrima u odnosu $\leq 50\%$ dovodi do povećanja stabilnosti monosloja na granici faza voda/vazduh. Interesantno, pri niskim vrednostima površinskog pritiska, vrednosti ΔG_{ex} su približne između smeša SC lipidi-SL i SC lipidi-SM. Međutim pri vrednosti površinskog pritiska od 10 mN/m, vrednosti su skoro dva puta negativnije za smeše SC lipida sa saharoznim estrom koji ima duži ugljovodonični lanac (SM). Ovaj podatak ponovo potvrđuje prethodne navode da su van der Valsove privlačne sile između hidrofobnih delova lipida SC i SM jače u odnosu na interakcije SC lipida i SL, usled dužeg lanca SM, što dovodi do formiranja monosloja veće stabilnosti.



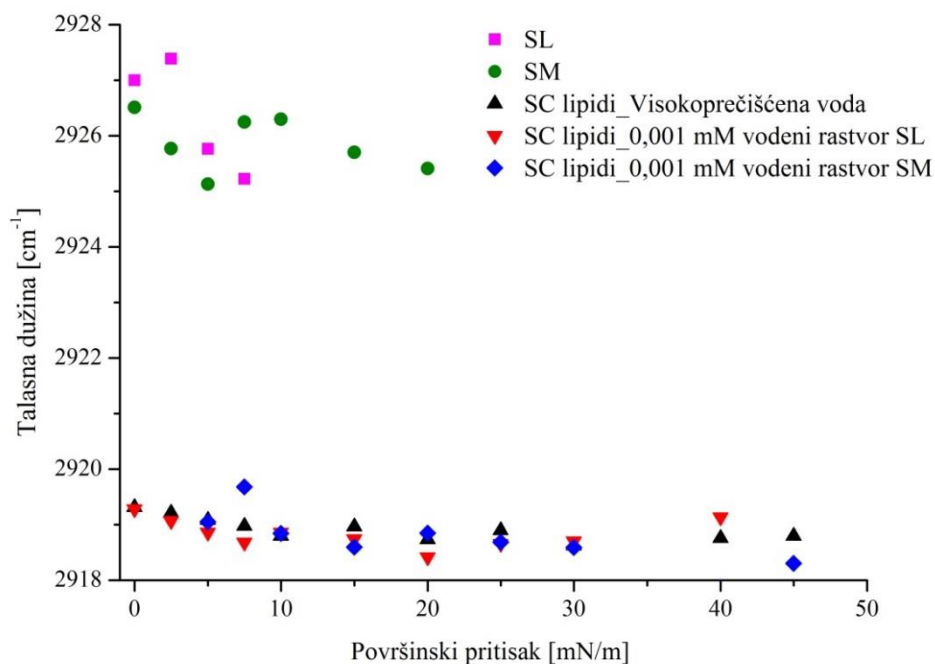
Slika 4.5. Prosečna površina po molekulu za smeše lipida SC sa A) saharoza lauratom; i B) saharoza miristatom, na različitim vrednostima površinskog pritiska.



Slika 4.6. Višak Gibsove energije mešanja (ΔG_{ex}) za smeše lipida SC sa A) saharoza lauratom; i B) saharoza miristatom, na različitim vrednostima površinskog pritiska.

4.1.3. IRRAS

Fazno stanje lipida (G/LE/LC) sa sigurnošću može da se potvrdi procenom pozicije metilenskih vibracija, s obzirom da je pokazano da su frekvencije metilenskih grupa (CH_2) izuzetno osetljive na promene u konformaciji ugljovodoničnih lanaca (*trans-gauche* izomerizacija) [220]. Shodno tome, fluidizacija intercelularnih lipida SC izazvana prisustvom penetracionih inhensera može biti manifestovana pomeranjem frekvencija CH_2 vibracija ka većim talasnim dužinama [189]. Na **Slici 4.7** prikazane su vrednosti talasnih dužina CH_2 asimetričnih vibracija (ν_{asCH_2}) u funkciji površinskog pritiska, za seriju IRRA spektara dobijenih rasprostiranjem SC lipida na različitim subfazama (visokoprečišćena voda, 0,001 mM vodeni rastvor SL, i 0,001 mM vodeni rastvor SM). Naime, sa porastom uređenja acil lanaca na međufazi voda/vazduh CH_2 frekvencije opadaju sa $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ na vrednost talasne dužine $\sim 2918 \text{ cm}^{-1}$, dajući na taj način objektivni pokazatelj konformacionog uređenja i gustine pakovanja hidrofobnih regiona, kao i informacije o LE/LC faznom prelazu u monosloju [207]. Imajući to u vidu, može se zaključiti da su IRRA spektri potvrdili LC stanje SC lipida na visokoprečišćenoj vodi kao subfazi. Kao što se vidi na **Slici 4.7** asimetrične vibracije CH_2 grupa su u rang 2918-2919 cm^{-1} pri svim vrednostima površinskog pritiska, tj. kompresija monosloja nije značajno promenila vrednosti talasne dužine, potvrđujući prvobitne zaključke dobijene analizom π -A izoterma: lipidi SC su u LC stanju čak i pri niskim vrednostima površinskog pritiska. Neočekivano, nakon rasprostiranja lipida SC na 0,001 mM vodenom rastvoru SL ili SM (plavi i crveni simboli na **Slici 4.7**) pokazano je da su vrednosti talasnih dužina ν_{asCH_2} veoma slične vrednostima koje su dobijene kada je visokoprečišćena voda korišćena kao subfaza (crni simboli na **Slici 4.7**). Međutim, iako IRRA spektri ukazuju na gusto pakovan *Langmuir*-ov monosloj na međupovršini voda/vazduh, na osnovu π -A izoterma prikazanih na **Slici 4.1** nema sumnje da su saharozni estri adsorbovani na međupovršinu voda/vazduh. S obzirom da adsorbovani saharozni estri nisu doveli do promene orijentacije acil lanaca SC, ova pojava ukazuje da je određen udeo saharoznih estara (koji kada se rasprostiru sami na međufazu formiraju monosloj u LE stanju sa talasnim dužinama $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$) prešao u LC stanje kada je inkorporiran u monosloj lipida SC [205].

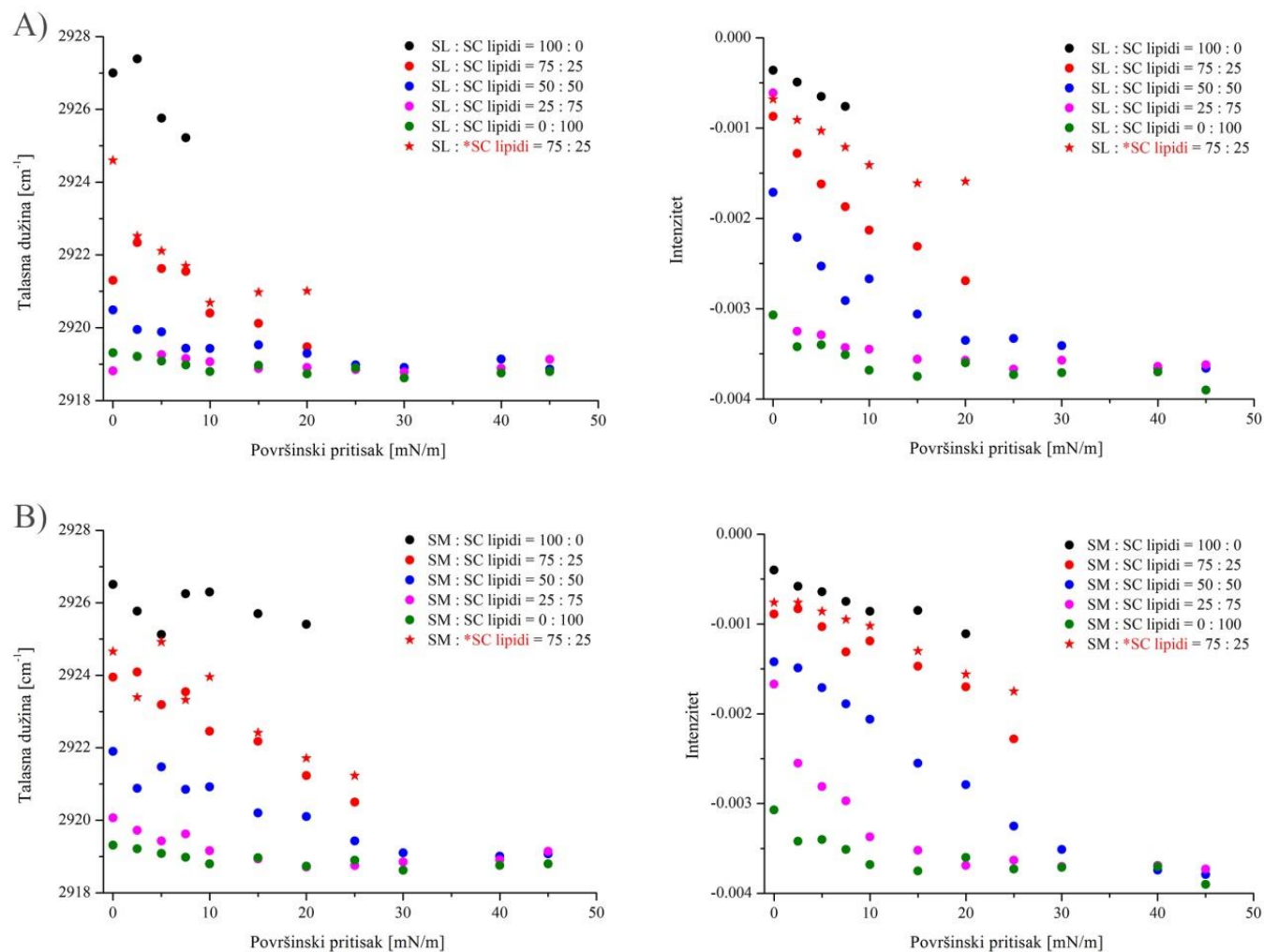


Slika 4.7. Asimetrične CH_2 frekvence saharoznih estara dobijene korišćenjem visokoprečišćene vode kao subfaze i lipida stratum corneum-a na različitim subfazama na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ C$.

Drugi deo ove faze eksperimentalnog rada uključuje snimanje IRRA spektara smeša saharoznih estara sa lipidima SC u različitom molarnom odnosu. Kao što se vidi na **Slici 4.8**, $\nu_{as}CH_2$ zavise od udela saharoznih estara u smeši sa lipidima SC. Ako se posmatraju samo saharozni estri na visokoprečišćenoj vodi kao subfazi, potvrđene su pretpostavke da su oba proučavana surfaktanta (SL i SM) u LE stanju sa talasnim dužinama $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ pri svim vrednostima površinskog pritiska. Kada se nanese smeša saharoznih estara sa lipidima SC, očigledno je da saharozni estri imaju uticaj na uređenu strukturu lanaca lipida SC pri niskim vrednostima površinskog pritiska (tzv. *disordered effect*). Dakle, kada su prisutni zajedno na međufazi voda/vazduh, značajan porast vrednosti od $\sim 2919 \text{ cm}^{-1}$ (LC stanje monosloja lipida SC) do $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ (LE stanje saharoznih estara) potvrđuje da se uređenje acil lanaca smanjuje sa porastom udela saharoznih estara u smeši sa lipidima SC. Ukoliko uporedimo smeše SL i SM sa lipidima SC pri istom udelu saharoznih estara, očigledno je da SM ima veći uticaj na

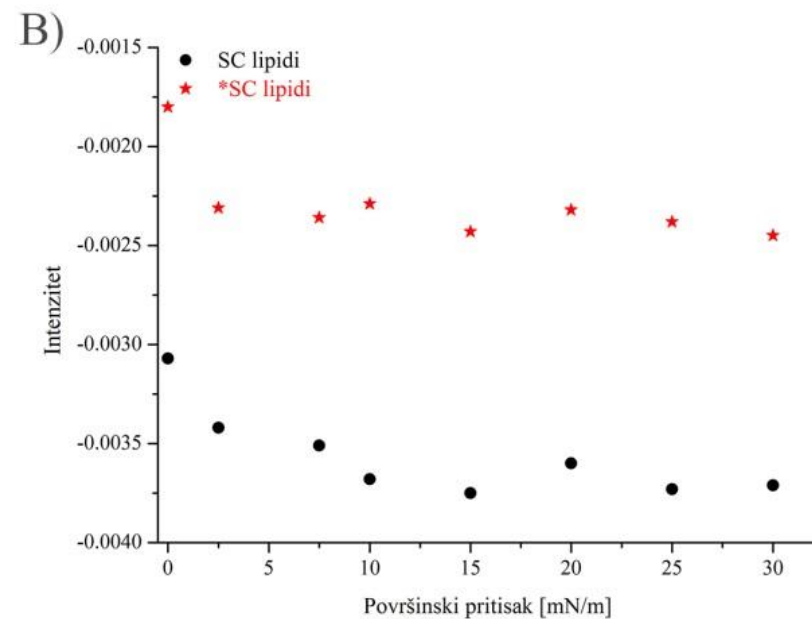
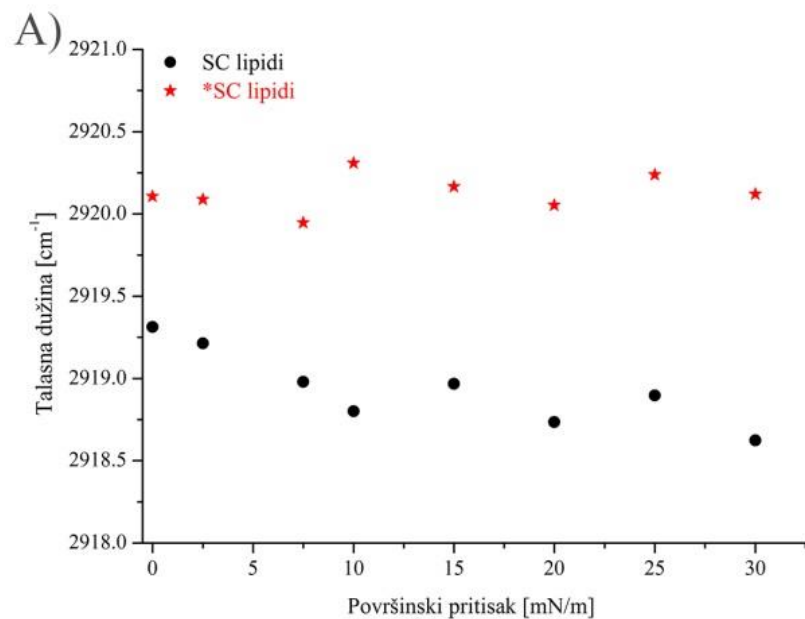
vrednost talasnih dužina $\nu_{as}CH_2$, ukazujući na intenzivniji fluidizirajući efekat C14-saharoznog estera pri svim molarnim udelima u smeši sa SC lipidima. Dodatno, IRRA spektri potvrđuju i naše zaključke izvedene iz rezultata π -A izoterme – tokom kompresije, veća količina SM ostaje u mešanom monosloju na međufazi voda/vazduh u odnosu na monosloj sa SL, što se može pripisati jačim silama između molekula SM i SC lipida u odnosu na sile prisutne u monosloju SL-SC lipidi. Sa kompresijom i povećanjem površinskog pritiska, vrednost talasne dužine se smanjuje, ukazujući na povećanje uređenosti lipidnih lanaca u monosloju. Uzimajući sve ovo u obzir, može se zaključiti da prisustvo saharoznih estara ima fluidizirajući efekat na acil lance lipida SC (tj. povećanje broja *gauche* konformera), kao i da je ovaj efekat više izražen u slučaju saharoznog estera sa dužim ugljovodoničnim lancem. Ovaj zaključak je u skladu sa već komentarisanim vrednostima MMA (**Slika 4.5**) i ΔG_{ex} (**Slika 4.6**), što sve ukazuje na intenzivniji uticaj SM na intermolekulske veze u monosloju. Međutim, ne treba zaboraviti da slabiji uticaj SL može biti (bar delom) posledica desorpcije molekula sa međupovršine voda/vazduh tokom kompresije monosloja. Takođe, ukoliko posmatramo intenzitet ovih vibracija (**Slika 4.8**), razlike u intenzitetu mogu biti posledica razlika u pakovanju na međufazi [221]. Na kraju, iako se može zaključiti da saharozni estri fluidizuju lipide SC (konformaciona promena iz *all-trans* u *gauche* izomere), treba imati u vidu da položaj i intenzitet vibracija CH_2 grupa predstavlja srednju vrednost i uređenih i neuređenih frakcija koje su prisutne u monosloju. Shodno tome, moguće je da je monosloj u heterogenoj formi, sa pojedinim delovima koji su visoko uređeni i pojedinim delovima koji su u fluidnom stanju, što je uslovljeno prisustvom saharoznih estara [205].

U monosloju koji je sastavljen od intercelularnih lipida SC, metilenske vibracije u većem stepenu potiču od CerAS i SA u odnosu na Chol. Imajući u vidu strukturu holesterola, kao i njegov planarni prsten, molekuli Chol zauzimaju otprilike istu površinu pri svim vrednostima površinskog pritiska [222].



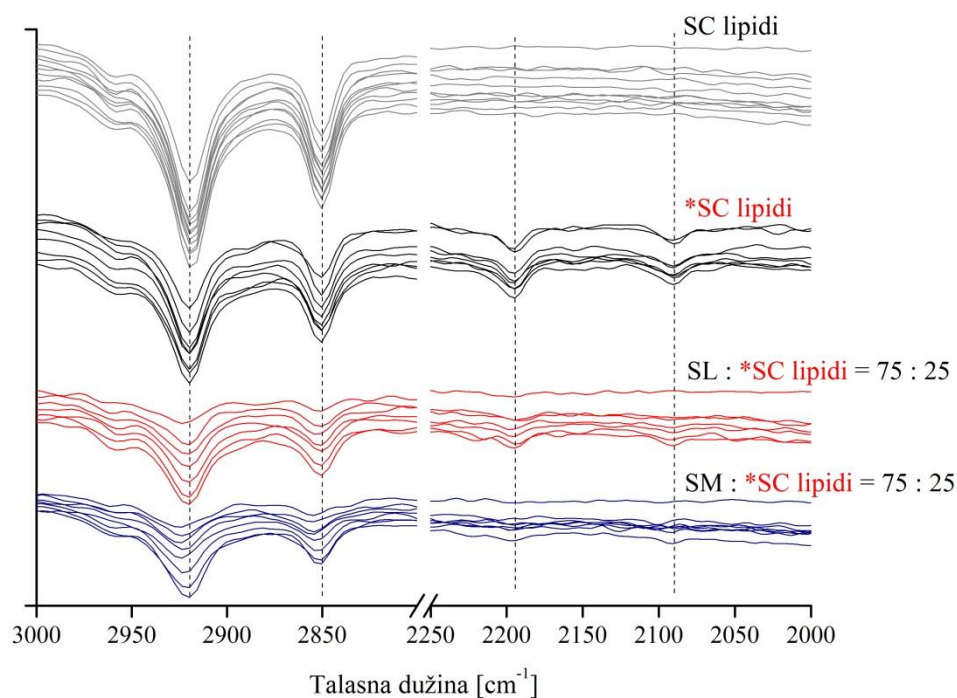
*Slika 4.8. Talasna dužina i intenzitet asimetričnih CH₂ vibracija za smeše lipida stratum corneum-a sa A) saharoza lauratom, i B) saharoza miristatom, pri različitim molarnim odnosima (sadržaj saharoznih estara 0%, 25%, 50%, 75% i 100%) na temperaturi 20 ± 0,1°C. *SC lipidi – korišćena je deuterisana stearinska kiselina (SA-d₃₅).*

Shodno tome, interakcije saharoznih estara sa pojedinačnim komponentama lipida SC mogu biti detaljnije proučene korišćenjem deuterisanih komponenata (**Slika 4.9**). Iz tog razloga, SA je zamenjena sa deuterisanom SA (SA-d₃₅). Na taj način, informacije o ponašanju CerAS, kao i o ponašanju SA, mogu biti proučavane odvojeno (Chol ima zanemarljiv doprinos metilenskim vibracijama), s obzirom da deuterisani izotopi pomeraju metilenske vibracije SA u region 2050 – 2250 cm⁻¹. Stoga, u smeši koja sadrži protonovani CerAS i deuterisanu SA, CH₂ vibracije koje potiču od CerAS neće biti pod uticajem CD₂ vibracija masne kiseline [223]. CH₂ i CD₂ regioni IRRA spektara za monosloj CerAS/Chol/SA i CerAS/Chol/SA-d₃₅ na različitim vrednostima površinskog pritiska su prikazani na **Slici 4.10**. Kao što je očekivano, talasne dužine na kojima se nalaze CH₂ frekvence u monosloju CerAS/Chol/SA-d₃₅ su više u poređenju sa talasnim dužinama dobijenim za monosloj CerAS/Chol/SA. Ovi rezultati potvrđuju prethodno istraživanje u kome je pokazano da su masne kiseline više uređene u odnosu na molekule ceramida u monosloju intercelularnih lipida SC [205]. Takođe, ovi rezultati nam daju potvrdu da su ceramidi u najvećem stepenu odgovorni za fleksibilnost SC, te da je upravo ova fleksibilnost neophodna kako bi se održala normalna funkcija kožne barijere u različitim uslovima i pri delovanju spoljašnjih faktora [205].



*Slika 4.9. A) Talasna dužina, i B) intenzitet $\nu_{as}CH_2$ frekvencija smeša Stratum corneum lipida (Ceramid AS C18:18 : Stearinska kiselina : Holesterol) i *Stratum corneum lipida (Ceramid AS C18:18 : Deuterisana stearinska kiselina : Holesterol) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.*

U nastavku ovog dela, kada se na **Slici 4.10** uporede $\nu_{as}CH_2$ frekvence dobijene snimanjem IRRA spektara za monosloj 25% CerAS/Chol/SA + 75% SM i 25% CerAS/Chol/SA-d₃₅ + 75% SM, očigledno je da se ove frekvencije preklapaju. Ovo ukazuje da su acil lanci CerAS i SM slične orijentacije, što potvrđuje da su molekuli u istoj fazi na međupovršini voda/vazduh. Međutim, ukoliko se posmatraju IRRA spektri dobijeni za monosloj 25% CerAS/Chol/SA + 75% SL i 25% CerAS/Chol/SA-d₃₅ + 75% SL, talasne dužine su nešto više u slučaju korišćenja deuterisane SA pri svim vrednostima površinskog pritiska, što ukazuje da je SL u drugoj fazi (tj. faze su razdvojene) i shodno tome, tokom kompresije molekul saharoznog estera biva lakše desorbovan sa površine. Sve ovo se, bar delom, može pripisati razlici u dužini lipofilnog dela molekula saharoznih estera, te stoga i većoj razlici u dužini lanaca između SL i CerAS u poređenju sa C14-saharoznim estrima [205].



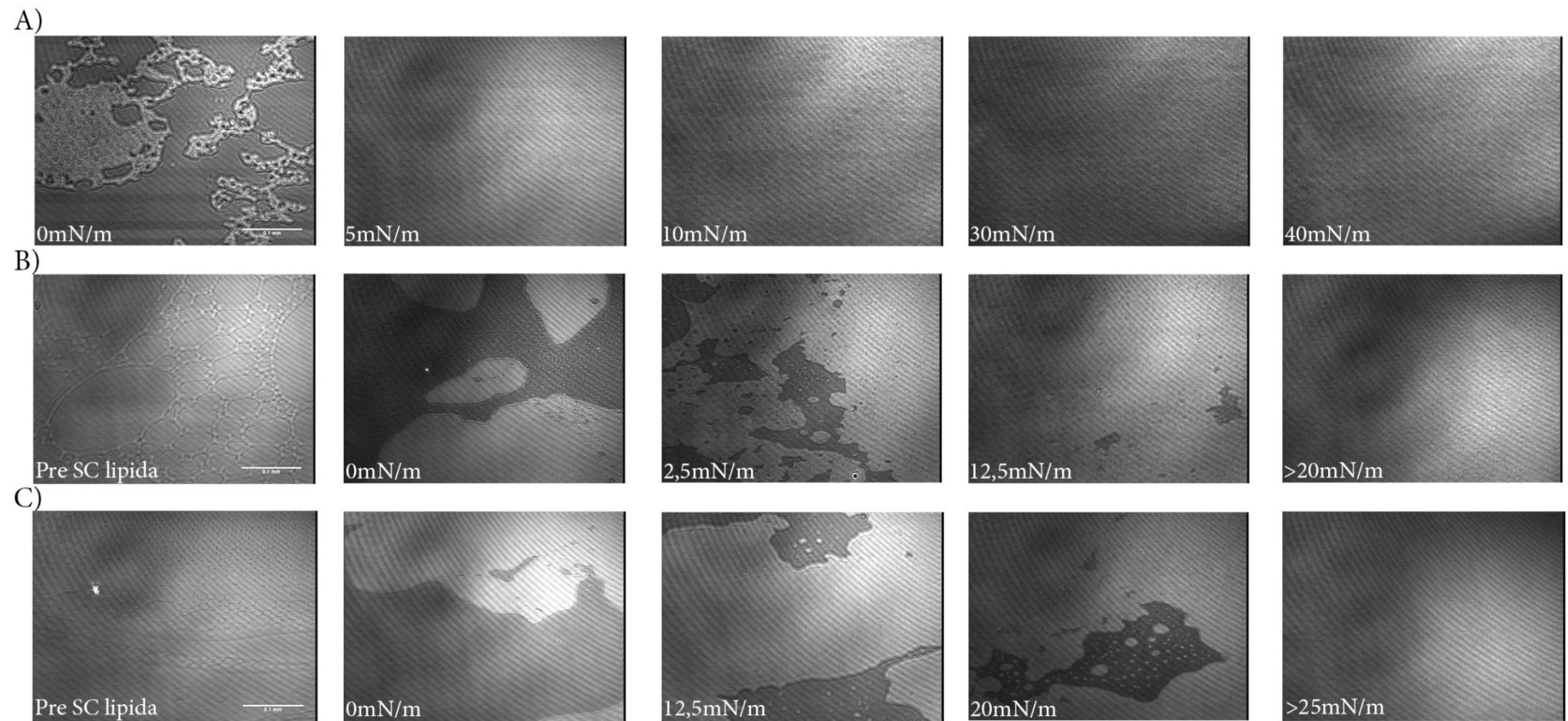
Slika 4.10. IRRA spektri *Stratum corneum* lipida (Ceramid AS C18:18 : Stearinska kiselina : Holesterol), **Stratum corneum* lipida (Ceramid AS C18:18 : Deuterisana stearinska kiselina : Holesterol), i smeša **Stratum corneum* lipida sa saharoznim estrima pri molskom udelu saharoznih estera od 75% na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4.1.4. BAM

Konačno, u završnom delu ovog segmenta doktorske disertacije korišćena je BAM, kao tehnika koja može da pruži sveobuhvatnu sliku o morfologiji monosloja na granici voda/vazduh tokom kompresije, i da, na taj način, potvrdi zaključke koji su proizašli iz π -A izoterma i IRRA spektara [214]. Na **Slikama 4.11-4.13** su prikazane BAM mikrografije dobijene kompresijom monosloja na međufazi voda/vazduh, pri različitim pritiscima kompresije. Razlike u refleksiji p-polarizovane svetlosti ukazuju na postojanje domena različite strukture (tj. postojanje površina različite osvetljenosti) što daje vrlo korisne informacije o strukturi monosloja.

Na **Slici 4.11** prikazane su BAM mikrografije SC lipida dobijene tokom kompresije pri različitim površinskim pritiscima na subfazama: visokoprečišćena voda, 0,001 mM vodeni rastvor SL i 0,001 mM vodeni rastvor SM. Kada je prosečna površina po molekulu veća od *lift-off* površine, monosloj SC lipida na visokoprečišćenoj vodi (**Slika 4.11A**) izgleda nehomogeno usled istovremenog prisustva čvrstog (S) i G stanja. Međutim, kao što se vidi na **Slici 4.11A**, tokom kompresije dolazi do formiranja uniformnog kondenzovanog monosloja pri svim vrednostima površinskog pritiska (LC stanje sa visokim Cs^{-1} vrednostima). Nedvosmisleno, u ovom slučaju pri vrednosti površinskog pritiska ~ 5 mN/m celo polje je prekriveno kondenzovanim filmom SC lipida, što je pokazano jednoličnom refleksijom, ukazujući da su molekuli u monosloju uniformno orijentisani [206]. Međutim, ako se posmatraju **Slike 4.11B** i **C**, uočava se značajna razlika kada su SC lipidi na subfazi koju čine 0,001 mM vodeni rastvori saharoznih estara u odnosu na visokoprečišćenu vodu kao subfazu. Na **Slikama 4.11B** i **C** se jasno vidi da je, pre nanošenja SC lipida na rastvor surfaktanata, međupovršina delimično pokrivena saharoznim estrima koji formiraju monosloj male gustine, tj. monosloj čiji su molekuli u G i LE stanju. Nakon nanošenja SC lipida, i pre *lift-off* površine π -A izoterma, na BAM slikama se može uočiti prisustvo karakterističnih „ostrva“ (**Slike 4.11B** i **C**), što se zapaža kao postojanje svetlih domena okruženih tamnim zonama gde je samo mala količina svetlosti reflektovana. Tokom kompresije monosloja, tamne zone postepeno nestaju, s obzirom da se domeni spajaju dajući uniformnu sliku monosloja u LC stanju [205, 224]. Iako se kod sva tri monosloja pri visokim vrednostima površinskog pritiska (> 20 mN/m) na BAM slikama uočava LC faza, mikrografije dobijene pri nižim površinskim pritiscima ukazuju na istovremeno

prisustvo G/LE i LC faza kada se SC lipidi nalaze na subfazi koju čine 0,001 mM vodeni rastvor saharoza estera. Stoga, iako BAM slike SC lipida na visokoprečišćenoj vodi potvrđuju prisustvo monosloja u LC stanju pri svim pritiscima kompresije, monosloj SC lipida na vodenom rastvoru saharoznih estera pokazuje prisustvo fluidnijih faza pre nego što se konačno izgubi kontrast između domena (> 20 mN/m). Na osnovu BAM mikrofografija monosloja na 0,001 mM vodenom rastvoru SL ili SM može se izvesti zaključak da su prisutne najmanje dve faze pri nižim vrednostima površinskog pritiska: LE faza fazno-razdvojenih saharoznih estera ili mešanog monosloja saharoznog estera/SC lipidi (ukazujući na taj način na tzv. *disordering* efekat saharoznih estera) i LC faza koja potiče od SC lipida, dok se pri višim vrednostima površinskog pritiska može detektovati samo LC faza.



Slika 4.11. BAM slike stratum corneum lipida (SC lipidi) nakon rasprostiranja na različite subfaze na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$: A) visokoprečišćena voda; B) 0,001 mM vodeni rastvor saharoza laurata; C) 0,001 mM vodeni rastvor saharoza miristata, na različitim vrednostima površinskog pritiska na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Scale bar je 0,1 mm.

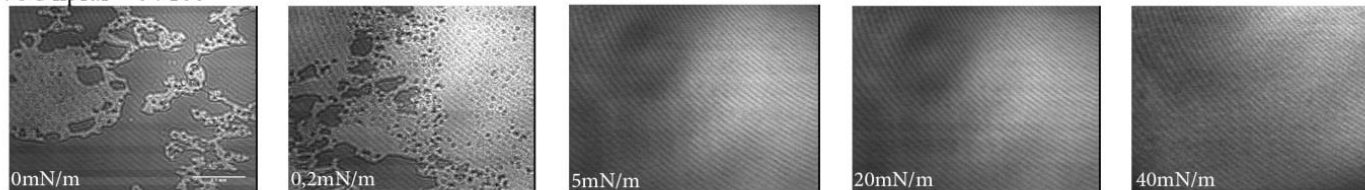
BAM slike dobijene posmatranjem monosloja koji se sastoji iz nekoliko komponenata mogu biti veoma korisne za donošenje zaključka o mešanju komponenata monosloja. Stoga, na **Slikama 4.12 i 4.13** može se jasno uočiti da stanje monosloja zavisi od udela komponenata koje formiraju film na međufazi voda/vazduh. Dodatak SL u odnosu 25 mol% u SC lipide značajno modifikuje morfologiju monosloja i smanjuje uniformnost pri brojnim vrednostima površinskog pritiska. Odmah nakon nanošenja smeše sa 25 mol% SL, na BAM slikama se mogu detektovati kružni domeni (**Slika 4.12**). Kao što se uočava, jasno je da je međufaza nehomogena i da su na međusloju voda/vazduh uočljivi mobilni domeni koji sadrže različite udio surfaktanta. Može se pretpostaviti da ove strukture nastaju usled samoasocijacije surfaktanata pre *lift-off* tačke izoterme. Sa kompresijom, ova dvodimenzionalna mreža kontinuirano nestaje, kako vrednost površinskog pritiska raste. Očigledno je tendencija fuzije (tj. spajanja) veoma jaka tako da već pri niskim vrednostima površinskog pritiska kompresija dovodi do koalescencije u koherentnu fazu. Međutim, i pored toga, treba uočiti da se pri vrednosti površinskog pritiska oko 10 mN/m u monosloju uočavaju defekti u homogenosti (označeni strelicama na **Slici 4.12**). Kao i u slučaju sa SL, tako i u slučaju smeše lipida SC sa 25 mol% SM, može se uočiti struktura slična peni pri niskim vrednostima površinskog pritiska. Kao što je već zabeleženo od strane Diaz i saradnika [225], u prisustvo fluidnih faza (kao što je LE faza), LC domeni formiraju oblik cveta kako bi smanjili tenziju i odbojne sile između domena. Interesantno, kao što se na **Slikama 4.12 i 4.13** može uočiti, sa kompresijom dolazi do koalescencije kondenzovanih domena nepravilnog oblika pri čemu dolazi do smanjenja udela fluidne faze, nezavisno od vrste saharoznog estera prisutnog u mešanom monosloju. Kako se film dalje komprimuje, domeni se spajaju, tako da pri vrednostima površinskog pritiska 10 i 15 mN/m za SL i SM, respektivno, mikrografije izgledaju gotovo homogeno. Međutim treba uočiti da su i dalje prisutni domeni koji imaju različito odbijanje svetlosti koji su manifestovani kao veoma tamne tačke (označene strelicama na **Slikama 4.12 i 4.13**) [224]. Nakon dalje kompresije, tamni delovi nestaju, vodeći ka nastanku potpuno homogenog monosloja. Međutim, na osnovu BAM slika se ne može zaključiti da li je monosloj u LC stanju ili ne. U slučaju smeša sa 50 mol% SL ili SM, i dalje se može zapaziti neuniformnost monosloja, koja se manifestuje kao svetle tačke na BAM slikama (do vrednosti površinskog pritiska oko 7,5 mN/m). Veoma je

interesantno da su ovi svetli domeni jasno razdvojeni i da imaju pravilan kružan oblik i u slučaju SL i SM (**Slike 4.12 i 4.13**), što može ukazivati na interakciju između SC lipida i saharoznih estara, s obzirom da se ovakvim formacijama smanjuju odbojne sile između komponenata. U slučaju obe smeše, ovi domeni iščezavaju pri vrednostima površinskog pritiska preko 10 mN/m. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da kružni domeni sadrže saharozne estre u većem sadržaju, ili da su saharozni estri uronjeni na međupovršini dok ih okružuje tamnija faza. Ovi svetli domeni se mogu uočiti i pri udelu saharoznih estara od 75 mol%, što se vidi na **Slikama 4.12 i 4.13**. Međutim, sa kompresijom, BAM slike ukazuje da ovi domeni nestaju, formirajući uniforman film koji je u LE stanju, bez ikakvih izolovanih domena. Ovako dobijene mikrografije pri višim vrednostima površinskog pritiska veoma podsećaju na BAM slike čistih saharoznih estara koji su u LE stanju pri svim vrednostima površinskog pritiska.

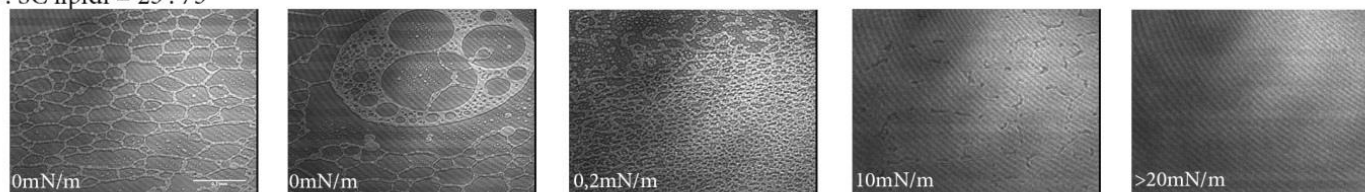
Shodno tome, može se zaključiti da je vizuelizacija monosloja potvrdila *disordering* efekat (efekat fluidizacije, tj. povećanja stepena neuređenosti) saharoznih estara na lipide SC, čak i pri malom udelu saharoznih estara, kao i da je ovaj efekat manje izražen u slučaju saharoznog estera sa kraćim ugljovodoničnim lancem. Takođe, u slučaju smeše sa 75 mol% saharoznih estara, a u skladu sa diskusijom IRRA spektara smeša CerAS/Chol/SA-d₃₅-saharozni estar, može se zaključiti da razlike u odbijanju svetlosti mogu biti posledica činjenice da nisu sve komponente monosloja u istoj fazi.

Stoga, prikazani rezultati dovode do zaključka da saharozni estri deluju kao penetracioni enhenseri, tj. da pored uloge u stabilizaciji sistema, njihov potencijal da povećaju penetraciju supstanci nedvosmisleno stavlja akcenat na prednost ovih surfaktanata u odnosu na slične klase jedinjenja u formulaciji različitih savremenih nosača.

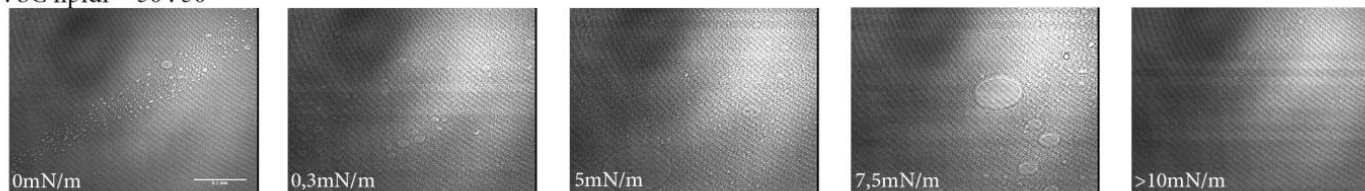
SL : SC lipidi = 0 : 100



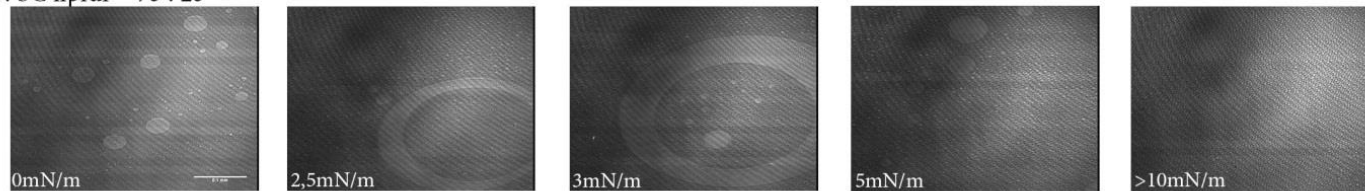
SL : SC lipidi = 25 : 75



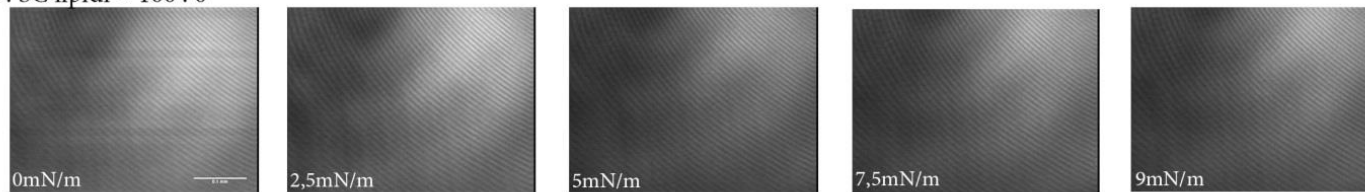
SL : SC lipidi = 50 : 50



SL : SC lipidi = 75 : 25



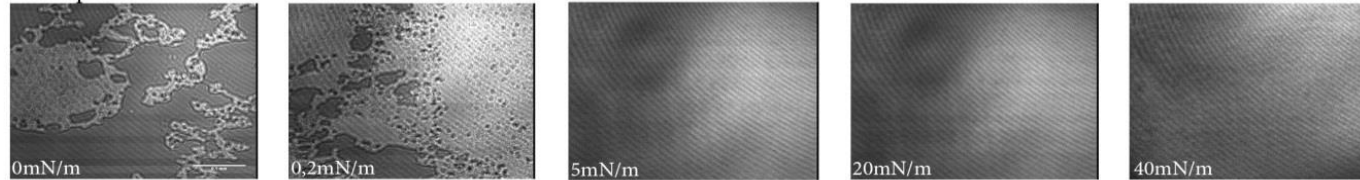
SL : SC lipidi = 100 : 0



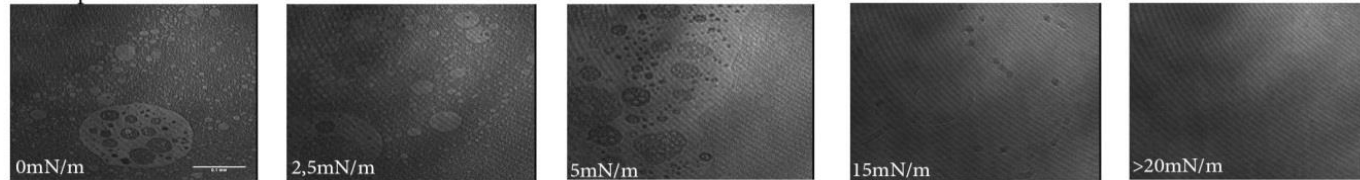
Slika 4.12. BAM slike smeša stratum corneum lipida (SC lipida) sa saharoza lauratom pri različitim molarnim udelima komponenata na različitim vrednostima površinskog pritiska na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Scale bar je 0,1 mm.

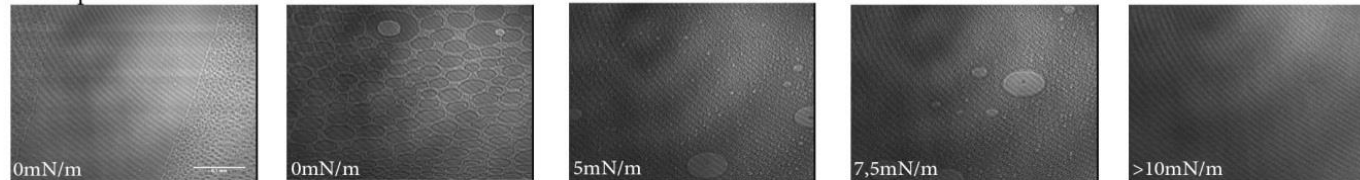
SM : SC lipidi = 0 : 100



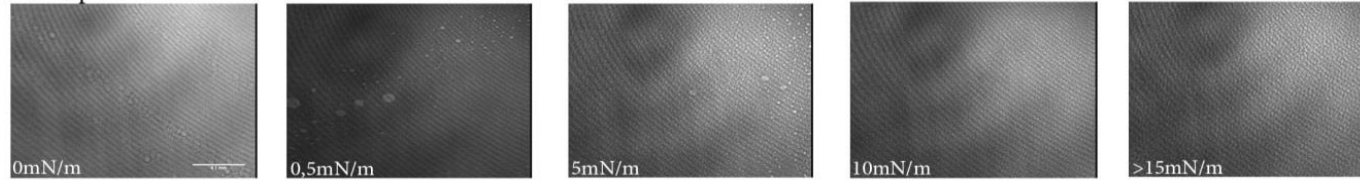
SM : SC lipidi = 25 : 75



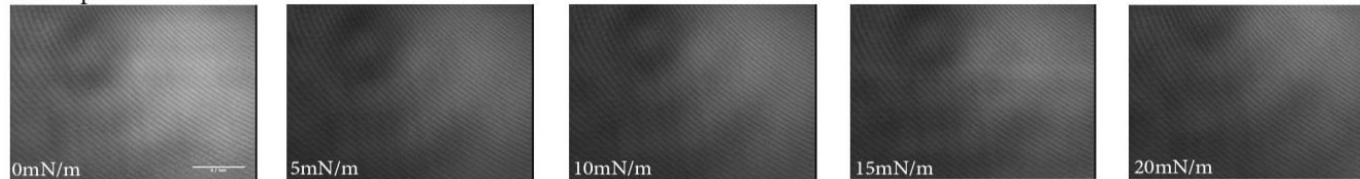
SM : SC lipidi = 50 : 50



SM : SC lipidi = 75 : 25



SM : SC lipidi = 100 : 0



Slika 4.13. BAM slike smeša stratum corneum lipida (SC lipida) sa saharoza miristatom pri različitim molarnim udelima komponenata na različitim vrednostima površinskog pritiska na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Scale bar je 0,1 mm.

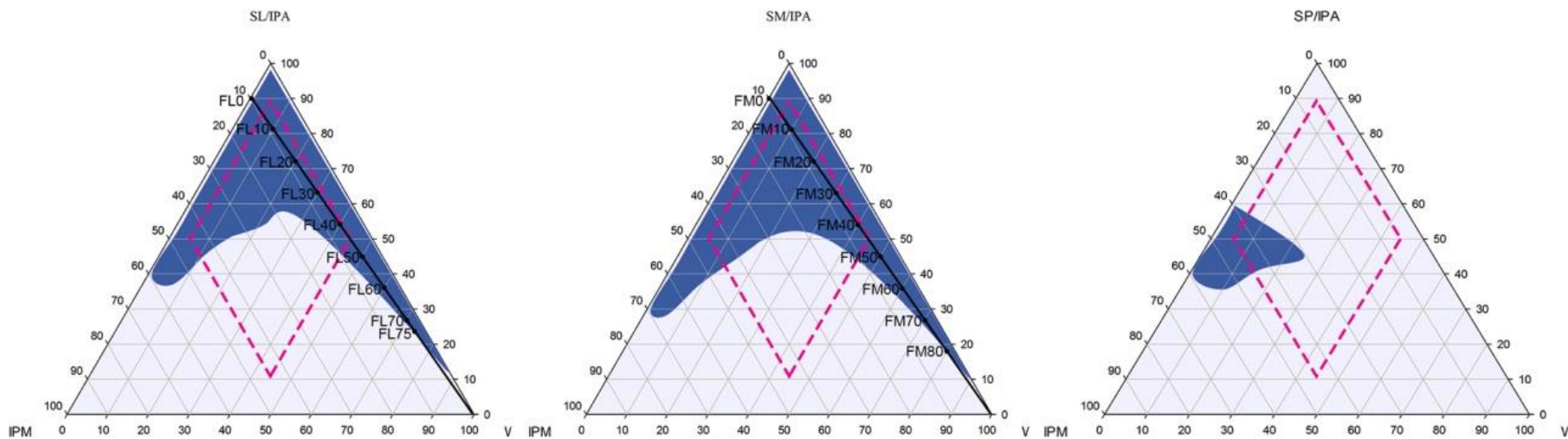
4.2. Rezultati i diskusija druge faze istraživanja

4.2.1. Konstruisanje pseudo-ternarnih faznih dijagrama – uticaj dužine ugljovodoničnog lanca na formiranje mikroemulzija

Pseudo-ternarni fazni dijagrami za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda su prikazani na **Slici 4.14**. Imajući u vidu da saharozni estri ne mogu samostalno da dovedu do smanjenja međupovršinskog napona do vrednosti neophodne za spontano formiranje mikroemulzija [226], u ovoj doktorskoj disertaciji je izopropanol korišćen kao kosurfaktant. Naime, prisustvo izopropanola u međusloju ima izražen uticaj na pakovanje molekula surfaktanta, dovodeći na taj način do povećanja fleksibilnosti (tj. fluidnosti) međupovršine koja dobija optimalnu zakrivljenost, neophodnu za spontano nastajanje mikroemulzija [132, 133].

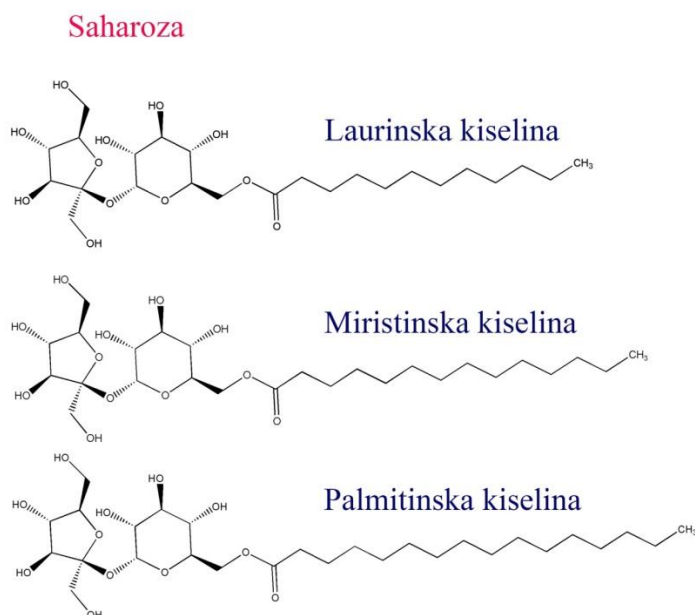
Kako se SS ne meša sa izopropanolom pri odabranim eksperimentalnim uslovima (odnos saharozni estar-izopropanol 1:1, sobna temperatura), te samim tim ne formira mikroemulzije, ovaj saharozni estar je isključen iz daljeg toka istraživanja. Uzimajući u obzir da svi korišćeni saharozni estri (SL, SM i SP) imaju istu HLB vrednost (**Tabela 3.1**), očekuje se da će sva tri saharozna estra imati isti efekat na smanjenje međupovršinskog napona između uljane i vodene faze. Međutim, na **Slici 4.14** se jasno vidi da je između konstruisanih pseudo-ternarnih faznih dijagrama prisutna značajna razlika uprkos istoj HLB vrednosti, što direktno ukazuje da hemijska struktura surfaktanta ima izražen uticaj na fazno ponašanje sistema izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda. Dodatno, kao što se vidi na **Slici 4.15**, svi korišćeni saharozni estri imaju istu hidrofilnu glavu, što dovodi do zaključka da fleksibilnost (tj. krutost) ugljovodoničnog dela molekula ima direktan i snažan uticaj na pakovanje molekula surfaktanta na međufazi voda/ulje.

U slučaju mikroemulzionog sistema zasnovanog na SP kao surfaktantu (**Slika 4.14**), jednofazni i izotropni mikroemulzioni region je prisutan u veoma uskoj oblasti, dok je u slučaju SL i SM, kapacitet za solubilizaciju vode, a samim tim i veličina mikroemulzione oblasti, značajno veći. U sistemima sa SL i SM kao surfaktantima, formirani međupovršinski film je manje osetljiv na dodavanje vode, u poređenju sa sistemom koji sadrži saharozni estar sa dužim ugljovodoničnim lancem – SP.



Slika 4.14. Pseudo-ternarni fazni dijagrami za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda, koristeći kao saharozni estar: saharoza laurat, saharoza miristat i saharoza palmitat, pri odnosu surfaktant-kosurfaktant 1:1. Obeležena linija predstavlja liniju razblaženja pri kojoj je odnos surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1, a obeležene tačke predstavljaju izabrane formulacije duž linija razblaženja (FL 0-75 i FM 0-80). Obeleženi romboidni region predstavlja eksperimentalni region koji je ispitan primenom D-optimalnog dizajna smeše.

Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim zaključcima da se kapacitet surfaktanta za emulgovanje smanjuje sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca [130]. Ukoliko se uzme u obzir razlika u strukturi saharoznih estara u homolognom nizu (**Slika 4.15**), tj. da ovi molekuli imaju istu hidrofilnu glavu a različit lipofilni deo molekula, može se izvesti zaključak da sterne sile između hidrofilnih glavenih grupa nemaju veliki uticaj na veličinu mikroemulzione oblasti [227].



Slika 4.15. Strukturna formula saharoznih estara: saharoza laurat, saharoza miristat i saharoza palmitat sa obeleženom hidrofilnom glavom i lipofilnim repom.

Shodno tome, može se zaključiti da surfaktanti sa dužim ugljovodoničnim nizom u okviru homologne serije molekula (npr. SP) čine međupovršinu rigidnijom, ograničavajući na taj način fleksibilnost međusloja, te da surfaktanti sa kraćim ugljovodoničnim lancem (npr. SL i SM) mogu da vežu veću količinu vode. To dalje može da ukaže da povećanje broja ugljenikovih atoma u lipofilnom delu surfaktanta dovodi do narušavanja pakovanja surfaktanata na međufazi vodena/uljana faza. Dobijeni rezultati su u potpunosti u skladu sa ranijim dokazima da povećanje dužine ugljovodoničnog lanca surfaktanta dovodi do smanjenja ukupne jednofazne površine na pseudo-ternarnom faznom dijagramu [228]. Takođe, dobijene rezultate je neophodno komentarisati i u skladu sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za rastvorljivost saharoznih estara u visokoprečišćenju vodi i izopropilmiristatu, koji su korišćeni kao vodena, odnosno uljana faza ispitivanog pseudo-ternarnog sistema.

Tabela 4.3. Rastvorljivost saharoznih estara u uljanoj i vodenoj fazi mikroemulzija [mg/ml] ± SD.

Saharozni estar	Rastvorljivost u vodenoj fazi [mg/ml]	Rastvorljivost u uljanoj fazi [mg/ml]
Saharoza laurat	383,76 ± 11,66	89,71 ± 4,71
Saharoza miristat	291,19 ± 17,67	86,39 ± 7,59
Saharoza palmitat	34,73 ± 0,35	85,13 ± 4,71

Interesantno, dobijene vrednosti za rastvorljivost sva tri saharozna estra u izopropilmiristatu su vrlo slične. Nasuprot tome, kao što je prikazano u **Tabeli 4.3**, eksperimentalno dobijena vrednost za rastvorljivost SP u visokoprečišćenoj vodi je oko 10 puta niža u odnosu na rastvorljivost preostala dva korišćena saharozna estra. Kao što je i očekivano, sa povećanjem dužine ugljovodoničnog dela molekula dolazi do smanjenja rastvorljivosti saharoznih estara u visokoprečišćenoj vodi. Stoga, vrlo uzak mikroemulzioni region koji je pomeren ka delu faznog dijagrama koji sadrži visok udeo uljane faze, može, bar delom, biti posledica niske rastvorljivosti SP u vodenoj fazi, što očigledno ima veliki uticaj na ukupnu količinu vode koja može biti solubilizovana u sistemu gde je SP korišćen kao surfaktant. Takođe, u istom maniru se može objasniti i pojava da SL i SM daju širu mikroemulzionu oblast: saharozni estri usled kraćeg ugljovodoničnog lanca u odnosu na SP imaju veću rastvorljivost u vodi, što direktno ukazuje da će sistem koji sadrži visokoprečišćenu vodu kao vodenu fazu, i SL ili SM kao surfaktant, imati veći izotropni region u odnosu na surfaktant koji ima nižu rastvorljivost u vodenoj fazi. Svi ovi rezultati nedvosmisleno ističu neophodnost istovremenog razmatranja HLB vrednosti surfaktanta, rastvorljivosti surfaktanta u vodenoj i uljanoj fazi, kao i pažljivo razmatranje strukture hidrofilnog i lipofilnog dela molekula.

Ukoliko se posmatraju samo pseudo-ternarni fazni dijagrami za sistem koji kao surfaktante ima C12- ili C14-saharozni estar (**Slika 4.14**), može se uočiti nešto veća efektivnost, i shodno tome šira mikroemulziona površina, kada se kao surfaktant koristi SM. Iako je ovakav rezultat u prvi mah neočekivan, ova pojava se može lako objasniti ukoliko su u obzir uzme i strukturna formula korišćene uljane faze. Naime, u osnovi

ovog fenomena može biti veći stepen penetracije molekula uljane faze u hidrofobne regione molekula surfaktanta koji formira međupovršinski film na granici vodena/uljana faza. Ranije je pokazano [130, 228] da je strukturna kompatibilnost hidrofobnog dela surfaktanta i ulja veoma važan parametar koji ima direktan uticaj na međusobno mešanje, kao i na penetraciju molekula ulja u film surfaktanta, što se direktno odražava na ukupnu mikroemulzionu oblast. Uprkos nižoj rastvorljivosti koju SM ima u vodi u poređenju sa SL (**Tabela 4.3**), ista dužina ugljovodoničnog lanca SM i izopropilmiristata omogućava da se izopropilmiristat, kao mali molekul, inkorporira u međupovršinski film, što dovodi do povećanja fleksibilnosti i dodatnog smanjenja međupovršinskog napona, te shodno tome doprinosi i većoj mikroemulzionoj površini. Kao što je i očekivano, najveći kapacitet za solubilizaciju vodene faze postignut je pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1. U tom slučaju sistemi imaju nizak viskozitet, izotropni su, i transparentni, sve dok ukupna količina vodene faze ne dostigne udeo 77,78% i 80,62% *m/m* u slučaju SL i SM, respektivno. Stoga, ova linija razblaženja (obeležena na **Slici 4.14**) izabrana je za dalji tok istraživanja kako bi se detaljno proučile promene u strukturi mikroemulzija sa različitim sadržajem vodene faze, koristeći kao surfaktante SL i SM.

4.2.2. Primena D-optimalnog dizajna smeše u cilju predviđanja mikroemulzione oblasti za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda

U novije vreme, u istraživačkoj literaturi zapaža se trend povećanja interesovanja za korišćenje *in silico* tehnika za predviđanje faznog ponašanja mikroemulzionih sistema različitog sastava. U nekoliko istraživačkih studija [73-75], veštačke neuronske mreže (engl. *artificial neural networks*, ANNs) su korišćene kao efikasna *in silico* tehnika za predviđanje granica mikroemulzione oblasti. Međutim, osnovni nedostatak ove metode predstavlja vremenska zahtevnost, s obzirom da razvoj ANN modela zahteva izbor odgovarajućeg tipa mreže, potvrdu arhitekture mreže (tj. broj slojeva i broj neurona u skrivenim slojevima), izbor aktivacione funkcije mreže, trening algoritma i parametara koji su specifični za trening. Još jedan nedostatak kod primene ANN predstavlja neophodnost velikog broja eksperimentalnih podataka kako bi se izvršio trening, test i validacija modela i generisao ANN model sa visokom tačnošću i sposobnošću generalizacije. Pored toga, a imajući u vidu i da ANN ne mogu da daju matematički

model koji pruža kvantitativan odnos između ulaznih i izlaznih parametara, kao i da daje informaciju o statističkom značaju efekata ispitivanih faktora i njihovih interakcija, ANN se često posmatra kao model crne kutije. Sa druge strane, glavni izlaz u D-optimalnom dizajnu smeše predstavlja matematički model koji daje kvantitativan odnos između faktora, uz propratnu statističku analizu dobijenog modela [229]. Uzimajući sve ovo u obzir, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana mogućnost primene D-optimalnog dizajna smeše kao ekonomske *in silico* tehnike, čija moguća primena u predviđanju granica mikroemulzione oblasti obezbeđuje značajnu uštedu vremena. Stoga je D-optimalni dizajn smeše korišćen sa ciljem efikasnog i brzog dobijanja granica mikroemulzione oblasti za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda, koristeći kao saharozni estar: SL, SM i SP. **Tabela 4.4** daje pregled 19 eksperimenata sa vrednostima faktora i odgovarajućim odgovorom T (%).

Kao što je pokazano od strane Furlanetto i saradnika [76], modelovanje T (%) može predstaviti veliki izazov s obzirom na širok opseg mogućih odgovora (tj. T (%) može biti u rangu od 0% do 100%). U principu, kada odgovor varira nekoliko puta u D-optimalnom dizajnu smeše, neophodno je koristiti transformaciju kako bi se dobio optimalan model koji najbolje opisuje zavisnost između faktora i njihove interakcije. U takvom slučaju, kada odgovor ima konačan opseg između 0% i 100%, predlaže se korišćenje *logit* transformacije [76]. Dodatno, u slučaju eksperimentalnih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, pomenuta transformacija je zahtevana kako bi se unapredio model. Kao deo eksperimentalnog dizajna, merena je T (%) za 5 replikata (tačke ponavljanja), i dobijeni rezultati su u sličnom rasponu odgovora, što ukazuje na dobru reproduktivnost pripreme uzoraka i korišćene analitičke tehnike.

U slučaju sistema u kome je SL korišćen kao surfaktant, na osnovu statističkih parametara modifikovan kubni model je pokazao superiornost u odnosu na ostale ($R^2 = 0,9775$, *adjusted* $R^2 = 0,9595$, PRESS = 94,92, predviđanje (engl. *adequate precision*) = 16,493, $p < 0,0001$). Sa druge strane, vrednost $p < 0,0001$ ukazuje da je model koji najbolje opisuje sistem sa SM specijalni kubni model sa vrednostima $R^2 = 0,8996$, *adjusted* $R^2 = 0,8494$, PRESS = 355,81, *adequate precision* = 13,793.

Tabela 4.4. 19 eksperimentalnih tačaka dobijenih primenom D-optimalnog dizajna smeše sa izračunatim eksperimentalnim vrednostima odgovora.

Formulacija	Realne komponente			L-Pseudo komponente			Odgovor		
	A – SE/IPA [% m/m]	B – IPM [% m/m]	C – V [% m/m]	A – SE/IPA	B – IPM	C – V	T(%) /100 (SL)	T(%) /100 (SM)	T(%) /100 (SP)
F1	30	45	25	0,250	0,500	0,250	0,005123	0,005793	0,006401
F2	50	45	5	0,500	0,500	0,000	1	1	1
F3	50	15	35	0,500	0,125	0,375	0,010604	0,999599	1
F4	90	5	5	1,000	0,000	0,000	1	0,991789	0,000424
F5	30	25	45	0,250	0,250	0,500	0,001178	0,009150	0,001788
F6	10	45	45	0,000	0,500	0,500	0,000158	0,000272	0,000171
F7	70	5	25	0,750	0,000	0,250	1	0,995627	0,002454
F8	50	25	25	0,500	0,250	0,250	0,009034	1	1
F9	30	35	35	0,250	0,375	0,375	0,001670	0,002507	0,005453
F10	50	35	15	0,500	0,375	0,125	1	1	1
F11	50	45	5	0,500	0,500	0,000	1	1	1
F12	10	45	45	0,000	0,500	0,500	0,000163	0,000273	0,000180
F13	50	5	45	0,500	0,000	0,500	1	0,996189	0,017210
F14	90	5	5	1,000	0,000	0,000	1	0,991796	0,000571
F15	70	15	15	0,750	0,125	0,125	1	1	0,026441
F16	30	45	25	0,250	0,500	0,250	0,004008	0,006123	0,005213
F17	50	5	45	0,500	0,000	0,500	1	0,996108	0,018240
F18	30	25	45	0,250	0,250	0,500	0,001270	0,000985	0,001700
F19	70	25	5	0,750	0,250	0,000	1	1	0,037024

Konačno u slučaju sistema SP, iako su dobijene vrednosti koeficijenta korelacije i prilagođenog koeficijenta korelacije niske ($R^2 = 0,5785$, *adjusted* $R^2 = 0,4581$), *signal to noise* odnos je 6,812, što ukazuje na odgovarajući signal i adekvatnost modela za previđanja odgovara. U slučaju modifikovanog kvadratnog modela dobijena je p vrednost manja od 0,05, a dodatkom faktora za specijalni kubni model nije postignuto povećanje značajnosti. Stoga, polinomalne jednačine sa uključenim statistički značajnim faktorima u model, koje najbolje opisuju uticaj sastava mikroemulzionog sistema na odgovor T (%), su prikazane na sledeći način:

$$\text{Logit}\left(\frac{T(\%)}{100}\right) = \text{Ln}\left(\frac{T(\%)/100}{1 - T(\%)/100}\right) = 14,06A - 222,58B + 348,90C + 472,32AB - 670,66AC - 286,72BC - 312,61AB(A - B) + 449,38 AC(A - C) + 782,99BC(B - C)$$

Jednačina 4.6

$$\text{Logit}\left(\frac{T(\%)}{100}\right) = \text{Ln}\left(\frac{T(\%)/100}{1 - T(\%)/100}\right) = 3,74A - 58,17B - 45,31C + 162,34AB + 101,54AC + 168,81BC - 376,11ABC$$

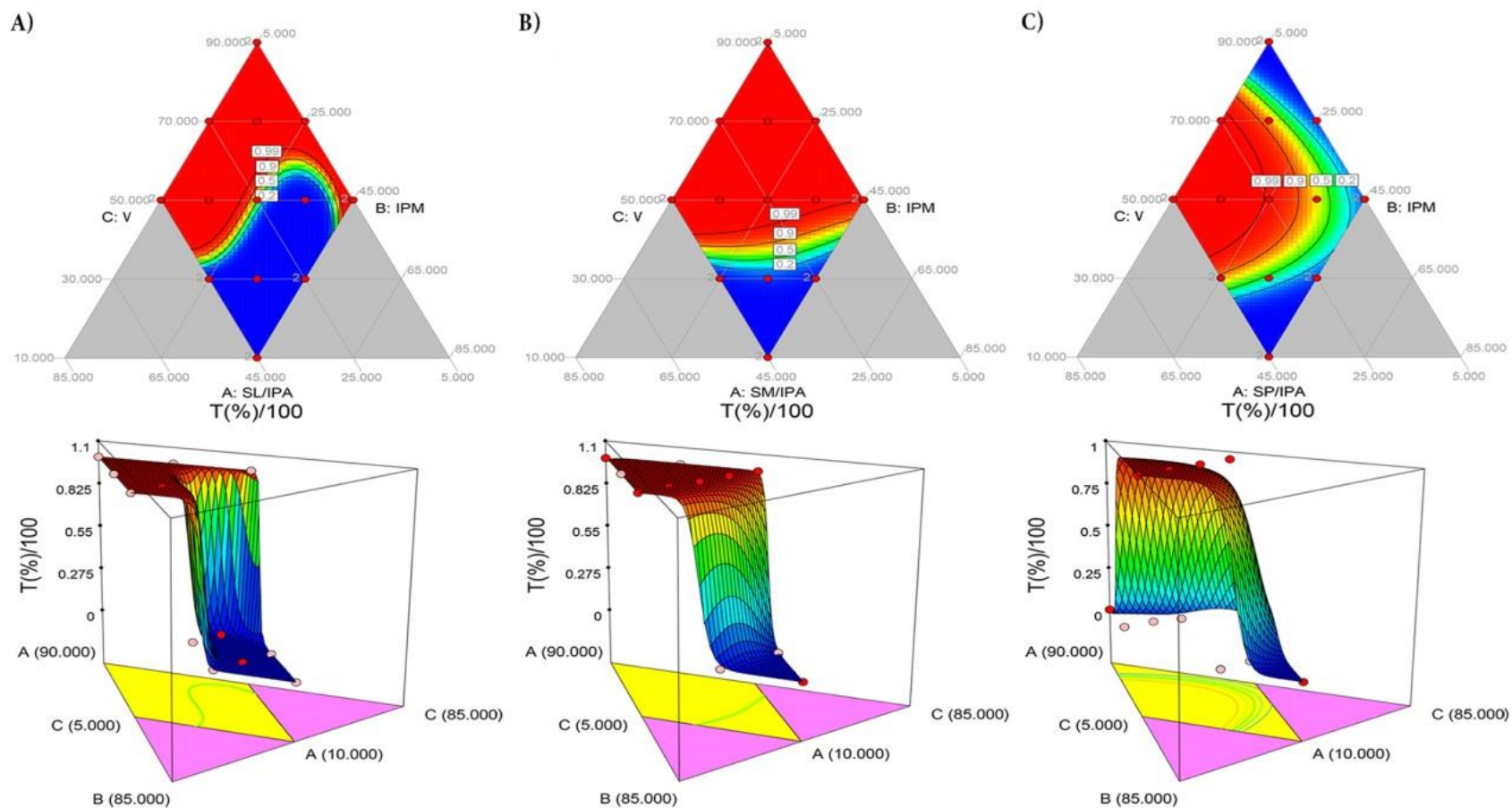
Jednačina 4.7

$$\text{Logit}\left(\frac{T(\%)}{100}\right) = \text{Ln}\left(\frac{T(\%)/100}{1 - T(\%)/100}\right) = -9,11A - 8,57B - 16,41C + 78,22AB + 41,37AC$$

Jednačina 4.8

Pozitivan predznak u jednačinama 4.6 – 4.8 ukazuje na sinergistički efekat faktora na odgovor, dok negativna vrednost ukazuje na obrnutu zavisnost između faktora i odgovora. Takođe, što je vrednost koeficijenta veća, očekivan uticaj na odgovor je intenzivniji i obrnuto [230]. Jednačine 4.6 – 4.8 se mogu koristiti za izračunavanje vrednosti transparentije za ostale formulacije koje se nalaze u prostoru za dizajn eksperimenta (engl. *design space*).

Konačno, kako bi se bolje razumela zavisnost između udela komponenata, položaja i veličine mikroemulzione oblasti, na **Slici 4.16** su prikazani dvodimenzionalni konturni grafici i trodimenzionalni grafici površine za vrednosti odgovora T (%)/100 u zavisnosti od odabranih faktora, koristeći prethodno opisane modele. Dvodimenzionalni grafici su prikazani u obliku pseudo-ternarnih dijagrama u kojima je vrednost T (%)/100 prikazana konturnim linijama za svaki sastav formulacije. Sa druge strane, ukoliko se sve komponente istovremeno menjaju samo trodimenzionalni grafik može dati uvid u efekte nezavisno promenljivih na odgovor zavisno promenljivih [231].



Slika 4.16. Dvodimenzionalni grafici kontura i odgovarajući trodimenzionalni grafici površine koji prikazuju efekat sastava smeše na $T(\%)/100$, za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečiščena voda, koristeći kao saharozni estar: A) saharoza laurat, B) saharoza miristat i C) saharoza palmitat, pri odnosu surfaktant-kosurfaktant 1:1.

Konačno kada se uporede oblasti sa T (%) / 100 većom od 0,99 (obeležene crveno na **Slici 4.16**) i mikroemulzione oblasti dobijene klasičnim eksperimentalnim pristupom metodom titracije vodom (**Slika 4.14**), može se izvesti zaključak da su položaj i veličina izotropnih regiona veoma slični. Shodno tome, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na moguću korist primene D-optimalnog dizajna smeše u cilju brzog i ekonomičnog predviđanja granica mikroemulzione oblasti.

4.2.3. Indirektne metode karakterizacija koloidne strukture izabranih mikroemulzija

Iako su mikroemulzije makroskopski homogene smeše, ovi sistemi su mikroskopski strukturirani, i sve strukturne promene koje se dešavaju u izotropnom regionu se razvijaju kontinuirano sa dodatkom vodene faze [232]. Zapravo, posmatranjem njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, moguće je indirektno proučiti i njihovu unutrašnju strukturu. Električna provodljivost, reološke osobine i termalno ponašanje su fizičko-hemijske osobine koje zavise od strukture sistema, te se stoga mogu koristiti za indirektno određivanje nanostrukture mikroemulzija.

4.2.3.1. Električna provodljivost

Veza između udela vodene faze (Φ_w) i električne provodljivosti (σ) mikroemulzionog sistema je prikazana na **Slikama 4.17** i **4.18**. Očigledno je da σ kontinuirano raste sa porastom Φ_w u sistemu. U slučaju oba korišćena surfaktanta (SL i SM), dobijena zavisnost σ u funkciji Φ_w se može opisati dvostepenom polinomalnom jednačinom sa visokim koeficijentom korelacije:

$$\sigma = 1357,4 \Phi_w^2 + 50,533 \Phi_w - 4,8776 \quad \text{Jednačina 4.9}$$

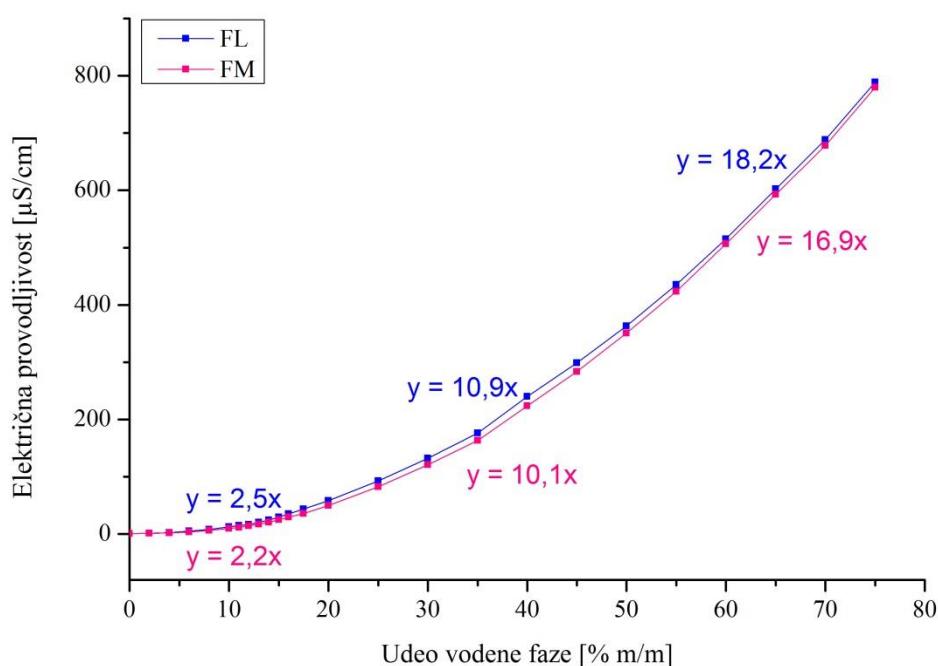
$$R^2 = 0,9997$$

$$\sigma = 1430,5 \Phi_w^2 - 16,676 \Phi_w - 2,3633 \quad \text{Jednačina 4.10}$$

$$R^2 = 0,9998$$

Iako se razlikuju u dužini ugljovodoničnog lanca, u oba sistema, σ raste sa porastom Φ_w , što se može objasniti sličnošću u lokalizaciji SL i SM na međufazi vodena/uljana faza. Kao što se vidi na **Slici 4.17**, prisutna su tri različita nagiba na profilu provodljivosti, koji se mogu pripisati razlikama u unutrašnjoj nanostrukтури sistema. Slično ponašanje i zavisnost σ od Φ_w u mikroemulzionom sistemu je već objašnjeno u

literaturi [165, 233]. Tri teorije su predložene kao objašnjenje pomenutog strukturnog fenomena: i) nagla inverzija, ii) razdvajanje faza, i iii) postepena promena preko bikontinuiranih struktura (poznato kao „perkolaciona teorija“) [234]. S obzirom da su formulacije (i sa SL i SM) duž odabrane linije razblaženja optički izotropne, u slučaju ovih sistema opravdano je koristiti perkolacionu teoriju u cilju objašnjenja prisutnih fenomena.



Slika 4.17. Vrednost električne provodljivosti (σ) u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sistem izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1, sa naznačenim promenama u vrednosti nagiba.

Pre početka detaljnije analize obeleženih segmenata na krivoj zavisnosti σ od Φ_w , treba napomenuti da σ vrednosti niže od $10 \mu\text{S/cm}$ (koje su dobijene za mikroemulzije sa niskim udelom vodene faze) ukazuju na disperziju neinteragujućih vodenih kapi okruženih slojem surfaktanta koji sprečava molekule vode da učestvuju u provodljivosti sistema. Ovi rezultati su u korelaciji sa prethodnim istraživanjima o provodljivosti

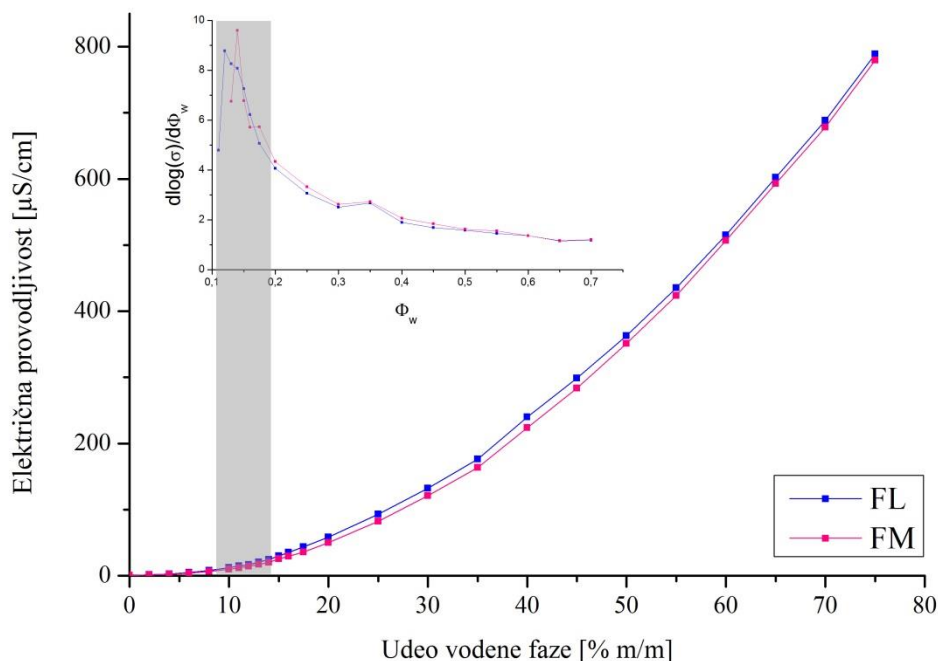
sfernog tipa mikroemulzija [80, 133, 235], ukazujući na prisustvo V/U mikroemulzija u kojima su vodene kapi dispergovane u uljanoj fazi, koja usled nemogućnosti provođenja jona minimalno doprinosi σ sistema. Početni porast σ , kod oba ispitivana sistema, se dešava verovatno usled hidratacije hidrofilne grupe saharoznih estara. Kada Φ_w dostigne kritičnu vrednost pri kojoj počinje linearni rast σ , privlačne sile između vodenih kapi postaju jače, što vodi ka njihovom spajanju (tj. koliziji). Zapravo, pri toj vrednosti Φ_w , površina kapi postaje dovoljno fluidna omogućavajući da tokom kolizije dođe do koalescencije, što dovodi do nastajanja klastera i vodenih kanala koji su i odgovorni za naglo povećanje σ [236, 237]. S obzirom da su to dinamički sistemi, klasteri se neprekidno reorganizuju usled Braunovog kretanja. Ovo ponašanje može biti objašnjeno uz pomoć **perkolacione teorije**, gde interakcija između vodenih kapi i njihovo spajanje imaju ključne uloge [133, 233, 237, 238]. Zapravo, može se primetiti da σ raste postepeno sve do kritične vrednosti Φ_w koja je poznata kao sadržaj vodene faze pri kojoj se dešava perkolacioni prag (Φ_p), nakon čega se uočava strm nagib usled naglog rasta σ , koji je posledica pomeranja vodene faze iz unutrašnje ka spoljašnjoj fazi, i stoga strukturne promene iz V/U u bikontinuirani sistem.

U literaturi je prihvaćeno da je nagli porast σ osnovna karakteristika perkolacionog koncepta, te se stoga, vrednost Φ_p može najpreciznije izračunati na osnovu konstruisanih profila električne provodljivosti [234]. Promene u vrednosti σ u zavisnosti od Φ_w se mogu objasniti sa dva nezavisna zakona:

$$\sigma = A (\Phi_p - \Phi_w)^{-s} (\Phi_w < \Phi_p) \quad \text{Jednačina 4.11}$$

$$\sigma = B (\Phi_w - \Phi_p)^t (\Phi_p < \Phi_w) \quad \text{Jednačina 4.12}$$

sa eksponentima koji su različiti pre i nakon perkolacionog praga [130]. U ovim jednačinama A i B su slobodni parametri, dok su s i t konstante koje su u rangju 0,5–1,2 i 1,2–2,1, respektivno, i koje zavise od dimenzionalnosti perkolacionog sistema (npr. od broja varijabli), i ne zavise od geometrijske strukture niti od interakcija. Ove jednačine se ne mogu primeniti kada je udeo vodene faze oko Φ_p , jer se kontinuirana promena dešava u okviru uskog intervala oko perkolacionog praga, a takođe ne mogu biti ekstrapolirane ni na beskonačno razblaženje [80, 233, 237].



Slika 4.18. Vrednost električne provodljivosti (σ) u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sistem izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1. Obeleženi sivi region označava perkolacioni prag (Φ_p). Umetnuti grafik: Prvi izvod logaritma σ .

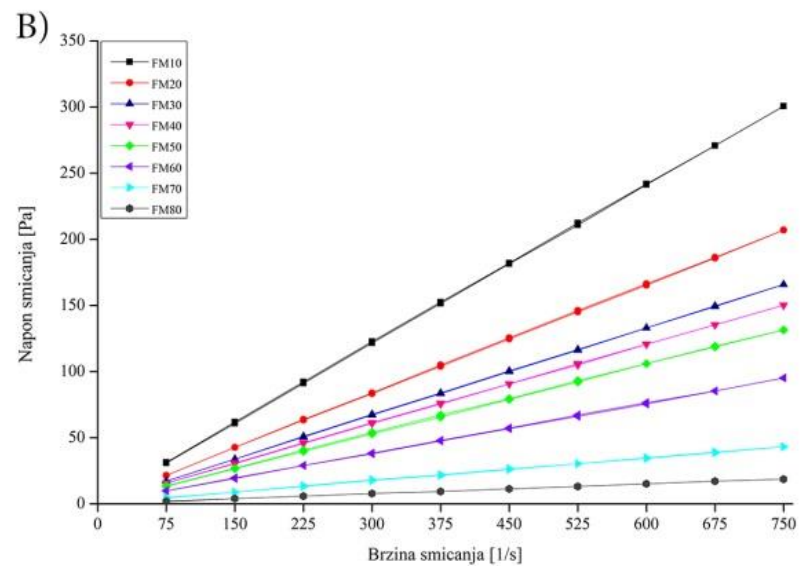
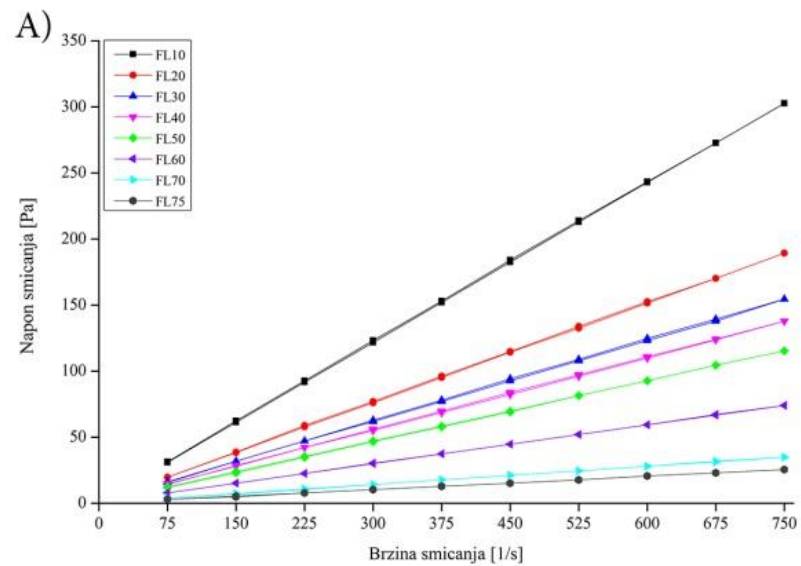
S obzirom da navedeni način određivanja perkolacionog praga ima brojne nedostatke, drugi način da se odredi Φ_p jeste korišćenje prvog izvoda $d\log(\sigma)/d\Phi_w$ u funkciji Φ_w [80, 228, 238]. Stoga, za svaku izmerenu vrednost σ , izračunata je odgovarajuća vrednost $d\log(\sigma)/d\Phi_w$. Ukoliko grafik zavisnosti $d\log(\sigma)/d\Phi_w$ od Φ_w ima izražen oštar pik, to ukazuje da je prisutan perkolacioni fenomen u sistemu, a dobijeni pik predstavlja vrednost Φ_w pri kojoj dolazi do perkolacionog praga [107, 232, 233]. Kao što se vidi na **Slici 4.18**, dobijene Φ_p vrednosti za sistem izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM) su 12 i 14%, respektivno. Kako se Φ_w dalje povećava u mikroemulzionom sistemu, broj klastera iznad perkolacionog praga se povećava, dovodeći do naglog porasta σ . Sledeća promena u nagibu krive σ u funkciji

Φ_w verovatno nastaje usled potpune inverzije bikontinuirane strukture u disperziju uljanih kapi u visokoprečišćenoj vodi (U/V mikroemulzije), kao kontinuiranoj fazi nastalog mikroemulzionog sistema. Veoma visoke vrednosti σ za formulacije sa visokim Φ_w , mogu se pripisati prisustvu jona NaCl u spoljašnjoj vodenoj fazi. U ovom slučaju, hidrofilne glave saharoznih estara su izložene kontinuiranoj (spoljašnjoj) fazi, i potpuno su zasićene molekulima vode, što dovodi do formiranja sistema sa maksimalnim vrednostima σ .

Ukoliko se uporede dobijeni rezultati za sisteme sa SL i SM, može se izvesti zaključak da duži ugljovodonični lanac dovodi do povećanja udela vodene faze pri kojoj dolazi do pojave perkolacionog praga, što može biti posledica jačih privlačnih interkapljičnih interakcija u sistemu sa saharoznim estrom kraćeg ugljovodoničnog lanca (SL). Takvo ponašanje se može objasniti na sledeći način: međupovršinski monosloj se sastoji od molekula kosurfaktanta i surfaktanta, čije su polarne glave u kontaktu sa vodom, a lipofilni repovi sa uljanom fazom. Interakcija između kapi zavisi od interpenetracije međupovršinskih slojeva koji dovode jezgra vodenih kapi u neposredni kontakt [130]. Stoga, može se izvesti konačan zaključak da je razlika u dužini ugljovodoničnih lanaca SL i SM glavni faktor koji je odgovoran za veći stepen preklapanja u slučaju C12-saharoznog estera.

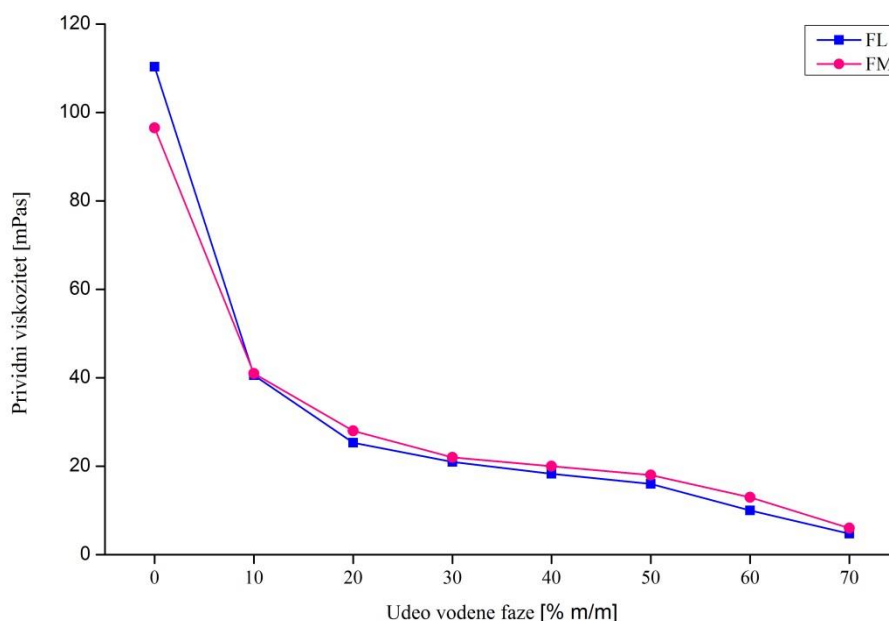
4.2.3.2. Reološka merenja

Zavisnost napona smicanja (τ) i prividnog viskoziteta (η) od brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) je prikazana na **Slici 4.19**. Kao što se vidi na grafiku, svi ispitivani mikroemulzionih sistema su njutnovske tečnosti, bez prisutnog fenomena tiksotropije. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima u kojima se navodi da se ovaj tip tečenja najčešće sreće kod mikroemulzionih sistema [235, 236].



Slika 4.19. Krive proticanja za sistem A) izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i B) izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), za formulacije sa različitim udelom vode pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1.

Na **Slici 4.20** je prikazana promena η za sisteme izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM) u zavisnosti od Φ_w . Na grafiku se uočava da je vrednost η svih izabranih formulacija u opsegu od 3 do 110 mPas. Dodatno, na **Slici 4.20** se može zapaziti da se vrednost η menja sa promenom Φ_w , što je u skladu sa dobijenim rezultatima električne provodljivosti (**Slike 4.17 i 4.18**).



Slika 4.20. Vrednost prividnog viskoziteta u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sistem izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1.

Na osnovu dobijenih rezultata zavisnosti η od Φ_w , može se zaključiti da duž izabrane linije razblaženja dolazi do strukturnih promena usled inverzije faza u mikroemulzionom sistemu. Prisustvo tri različita nagiba na grafiku, u potpunosti odgovara dobijenim profilima električne provodljivosti u funkciji Φ_w , te stoga i ukazuje na tri strukturno različita mikroemulziona regiona. Kao što je već rečeno, iako su svi uzorci makroskopski homogeni, dodatak vode dovodi do promena na nivou

nanostrukture ovih sistema [232]. Međutim, treba naglasiti da je dobijen profil viskoziteta različit u odnosu na profile zvonastog oblika (engl. *bell-shaped type*) koji se često sreću u literaturi [239]. U svakom slučaju, ovaj tip profila je prisutan i u sistemima: voda-propilenglikol/saharoza laurat/benzaldehid-etanol i voda/saharoza laurat-propilenglikol/oleil-laktat [228, 235]. Oba navedena sistema sadrže saharozni ester kao surfaktant, što potvrđuje da oblik krive zavisnosti η od Φ_w , može biti posledica tipa surfaktanta, tj. njegovih inherentnih fizičko-hemijskih karakteristika.

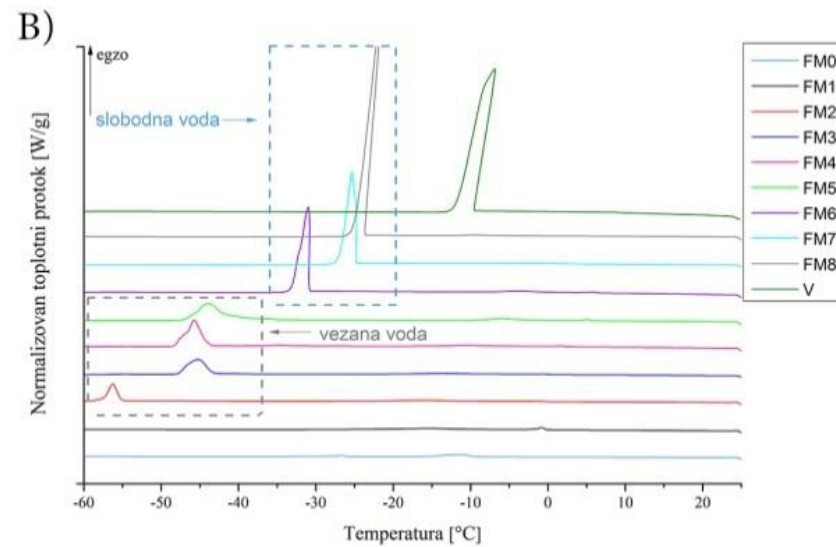
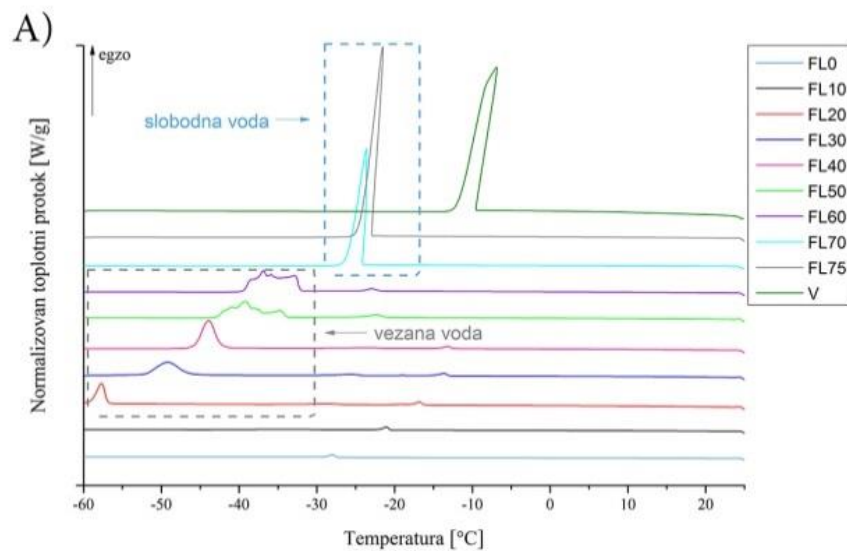
Visoka vrednost η za uzorke pre dodatka vode (obeleženi kao FLO i FM0), je najverovatnije posledica snažnih intermicelarnih interakcija. Interesantno, η vrednost opada sa porastom Φ_w . Stoga, ovi rezultati nisu u skladu sa prethodnim zapažanjem [132] da η vrednost raste sa porastom sadržaja vode u mikroemulzionom sistemu, tj. kako se menja unutrašnja struktura sistema iz V/U u U/V tip. Zapravo, naši rezultati pokazuju da se η naglo smanjuje sa dodatkom visokoprečišćene vode (sa 110 mPas i 97 mPas na 40 mPas za sistem sa SL i SM, respektivno), što se može objasniti smanjenjem fenomena agregacije micela usled razblaženja kontinuirane faze. Ova pojava je u skladu sa ranijim zapažanjima i rezultatima Fisher-a i saradnika [235]. Nakon početnog, naglog pada vrednosti, sledi postepen pad η za uzorke sa sadržajem visokoprečišćene vode u opsegu od 20 do 60% m/m , ukazujući na strukturnu promenu iz sistema u kome je uljana faza spoljašnja, preko bikontinuiranog, ka sistemu sa vodom kao spoljašnjom fazom. Ova pojava smanjenja η sa porastom Φ_w od 20 do 60% m/m , je verovatno udružena sa pomeranjem molekula surfaktanta iz kontinuirane faze na međupovršinu uljane i vodene faze, kao što je predloženo od strane Fanun-a [91]. Relativno niske vrednosti viskoziteta ukazuju na odsustvo anizometrijskih agregata, što je i potvrđeno odsustvom anizotropije kada se uzorci posmatraju polarizacionim mikroskopom. Dalji pad η za uzorke sa višim sadržajem vodene faze može biti posledica raspadanja bikontinuirane strukture. Takođe, i pri vrednostima Φ_w višim od 60% m/m vrednost η i dalje opada, verovatno usled razblaženja i niskog viskoziteta kontinuirane faze (u ovom slučaju vodena faza), što dovodi do slabljenja interkapljičnih interakcija [236]. Stoga, relativno niske izmerene vrednosti viskoziteta za uzorke FL i FM preko 60% m/m vode (FL 70 i FM70) ukazuju na prisustvo pojedinačnih sfernih kapi uljane faze koje su dispergovane u vodi kao kontinuiranoj fazi.

4.2.3.3. Termalna analiza

Termalno određivanje stanja vode u mikroemulzijama (tj. da li je voda vezana ili slobodna) može biti od velike važnosti za karakterizaciju mikroemulzija, s obzirom da su molekuli vode osjetljivi na prisustvo drugih molekula u sistemu koji utiču na njihovo termalno ponašanje [240]. Oba ispitivana sistema sadrže molekule (saharozne estre i izopropanol) koji vrlo lako interaguju vodoničnim vezama sa molekulima vode, te se stoga očekuje snažan uticaj na zamrzavanje vodene faze u oba ispitivana sistema. Iz toga proizilazi da temperatura i entalpija zamrzavanja, dobijene na osnovu površine i položaja pikova na DSC termogramima hlađenja, mogu biti odlični parametri za razdvajanje slobodne (balk) i vezane (međupovršinske)⁷ vode. Treba imati u vidu da vezana (međupovršinska) voda predstavlja vodu koja je snažno vezana za polarne grupe surfaktanata ili hidroksilnu grupu izopropanola posredstvom vodoničnih veza (ili čak i za estarsku grupu izopropilmiristata), dok slobodna (balk) voda predstavlja slabo vezane molekule vode čije se termalne osobine ne razlikuju značajno od čiste vode [226]. Što su interakcije sa molekulima vode jače, pik zamrzavanja vode je pomeren ka nižim temperaturama [107]. Konačno, još jedan tip vode predstavlja voda koja ne zamrzava pri postavljenim uslovima eksperimenta (engl. *non-freezable water*), tj. to su imobilisani molekuli vode u kapima V/U mikroemulzija koji su okruženi molekulima surfaktanta i kosurfaktanta, sprečavajući na taj način njihovo zamrzavanje u datom temperaturnom rangu [240].

DSC krive hlađenja za ispitivane formulacije FL i FM sa različitim udelom visokoprečišćene vode su prikazane na **Slici 4.21**. Kao što se može uočiti, rezultati dobijeni korišćenjem DSC tehnike u potpunosti podržavaju prethodno diskutovane rezultate studija provodljivosti i reologije. Visokoprečišćena voda koja je korišćena u ovoj studiji pokazuje oštar egzotermni pik na $-6,92^{\circ}\text{C}$ (onset $-9,52^{\circ}\text{C}$). S obzirom da uzorci FL0 i FM0 ne sadrže visokoprečišćenu vodu, jasno je da pikovi na $-28,03^{\circ}\text{C}$ i $-26,72^{\circ}\text{C}$ ne potiču od vode. Ovo je takođe potvrđeno proučavanjem termalnog ponašanja smeše surfaktant-kosurfaktant, te je jasno da mali egzotermni pik (između -30°C i -15°C) na uzorcima FL0-10 i FM0-10 potiče od očvršćavanja izopropilmiristata ili njegovih nečistoća.

⁷ U ovoj doktorskoj disertaciji nije napravljena razlika između vezane i međupovršinske vode.



Slika 4.21. DSC krive hlađenja visokoprečišćene vode i sistema A) izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i B) izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1.

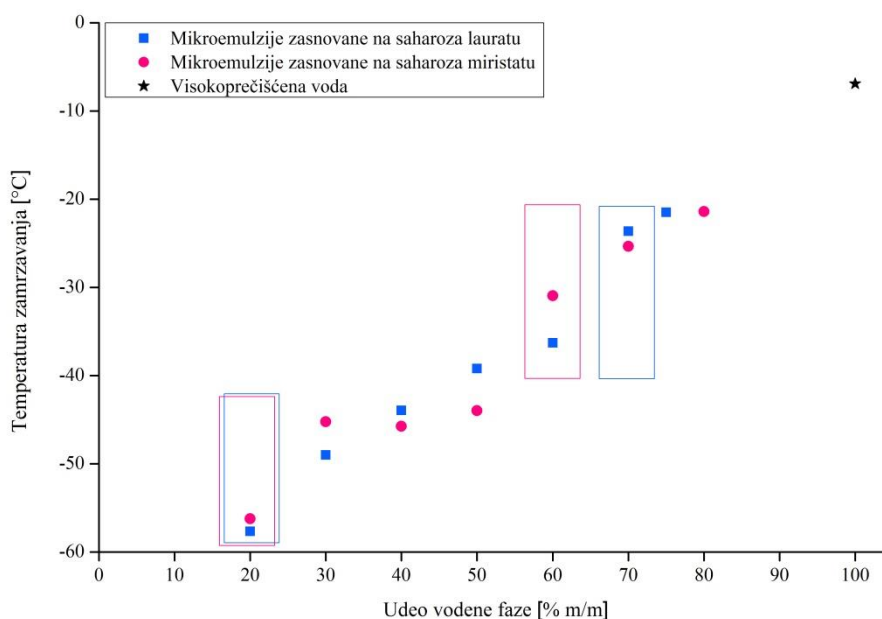
U skladu sa rezultatima provodljivosti i viskoziteta, jasno je da su molekuli vode vezani ili snažno interaguju bilo sa saharoznom grupom (hidrofilna glava) saharoznih estara ili sa izopropanolom. Obe interakcije utiču na termodinamičke osobine vode, pomerajući tačku zamrzavanja ka temperaturi ispod limita detekcije koja je postavljena u našoj studiji. Zapravo, na DSC termogramima, za uzorke pri koncentraciji vodene faze ispod 20% *m/m*, ne može se detektovati pik zamrzavanja vode, što ukazuje na prisustvo V/U mikroemulzija u kojima je vodena faza dispergovana te stoga nije dostupna za zamrzavanje. U nastavku, ako se pogledaju DSC krive hlađenja dobijene za uzorke FL20 i FM20 koji sadrže 20% *m/m* visokoprečišćene vode, prisustvo širokog egzotermnog pika ukazuje da u sistemu dolazi do inverzije strukture. Uzorci FL20-60 i FM20-50 imaju pik na DSC termogramima u temperaturnom opsegu od -60°C do -30°C, što ukazuje na prisustvo vezane ili međupovršinske vode u sistemu. Relativno niska vrednost tačke zamrzavanja vodene faze može biti posledica snažnih surfaktant-voda i izopropanol-voda interakcija, verovatno posredstvom vodoničnih veza između hidroksilnih OH grupa u strukturi ovih molekula [226]. Sa povećanjem sadržaja visokoprečišćene vode, egzotermni pik na DSC termogramu se pomera ka višim temperaturama, što ukazuje na slabljenje interakcija i pomeranje vode u spoljašnju fazu. Naime, sa povećanjem sadržaja vodene faze, koncentracije izopropanola i saharoznog estera se smanjuju, te stoga molekuli vode postaju slabije vezani, što se može videti na osnovu povećanja temperature i entalpije zamrzavanja (**Tabela 4.5**).

Sa daljim povećanjem udela visokoprečišćene vode u sistemu (≥ 70 i 60% *m/m*, u slučaju sistema sa SL i SM, respektivno), izopropanol i hidrofilne grupe saharoznih estara postaju potpuno hidratizane što se manifestuje značajnim promenama na DSC termogramima (**Slike 4.21 i 4.22**). U skladu sa prethodno diskutovanim rezultatima provodljivosti i viskoziteta, oštar pik koji je prisutan na DSC termogramu hlađenja može biti posledica zamrzavanja slobodne vode. Dodatak vode u sistem ubrzava prelazak molekula alkohola sa međupovršine u kontinuiranu fazu. Treba napomenuti da izopropanol, zajedno sa molekulima surfaktanta, u određenom stepenu i dalje interaguje sa molekulima vode, dovodeći do pomeranja temperature zamrzavanja u odnosu na čiste molekule vode. Stoga, pik slobodne vode, koja je slabo vezana za alkohol ili hidrofilne glave surfaktanta, ukazuje na promene u strukturi mikroemulzija iz bikontinuiranog u U/V sistem.

Tabela 4.5. Termodinamički parametri pika vodene faze za sisteme izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FL) i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda (FM), pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1.

	Mikroemulzije zasnovane na saharoza lauratu								
	FL0	FL10	FL20	FL30	FL40	FL50	FL60	FL70	FL75
Entalpija [J/g]	/	/	52,94	83,35	126,41	151,83	212,10	297,34	360,02
Onset [°C]	/	/	-56,9	-45,46	-42,35	-37,61	-35,13	-24,07	-22,93
Pik [°C]	/	/	-57,65	-49,01	-43,94	-39,21	-36,82	-23,62	-21,48
	Mikroemulzije zasnovane na saharoza miristatu								
	FM0	FM10	FM20	FM30	FM40	FM50	FM60	FM70	FM80
Entalpija [J/g]	/	/	51,95	88,11	128,89	146,60	238,66	271,86	373,93
Onset [°C]	/	/	-55,17	-43,39	-43,99	-41,28	-30,85	-24,78	-23,65
Pik [°C]	/	/	-56,24	-45,23	-45,75	-43,97	-30,95	-25,34	-21,40

Istovremeno, odsustvo pika uljane faze kod uzoraka sa ukupnim sadržajem vodene faze preko 60% *m/m* ukazuje na prelazak uljane faze u unutrašnju fazu sistema. Konačno, sa daljim porastom udela vodene faze, pik koji potiče od zamrzavanja vode u sistemu postaje izraženiji.

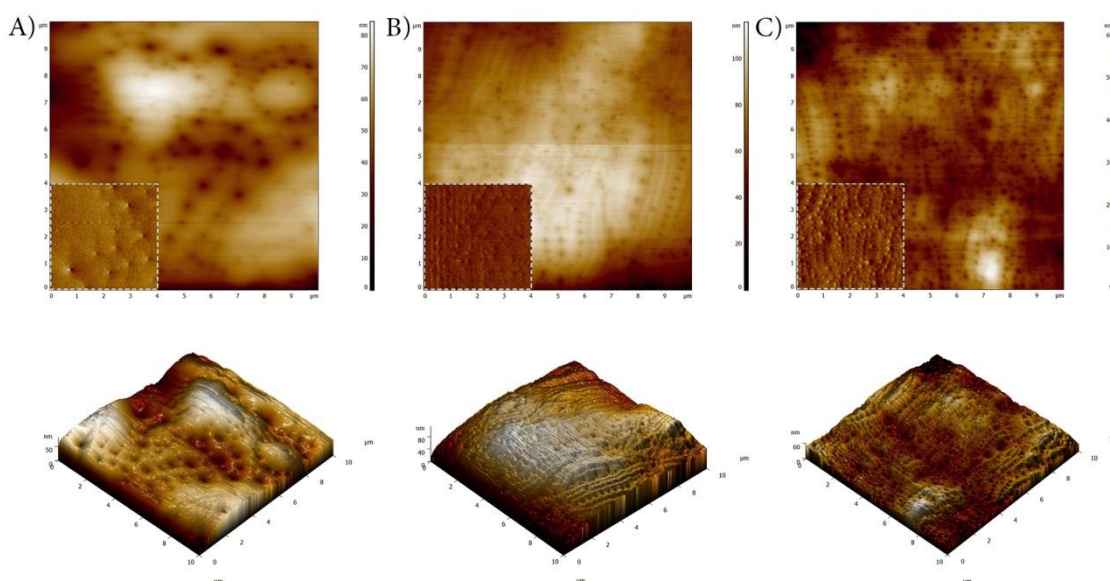


Slika 4.22. Tačka zamrzavanja vode u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode za sistem izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda, koristeći kao saharozni estar saharoza laurat i saharoza miristat.

Na **Slici 4.22** se može uočiti da se oštar pik detektuje ranije u slučaju mikroemulzija zasnovanih na SM. Naime u slučaju sistema zasnovanog na C12-saharoznom estru, na DSC termogramu pik slobodne vode se pojavljuje pri ukupnom sadržaju vode od 70% *m/m*, dok u slučaju C14-saharoznog estra pri sadržaju od 60% *m/m*. Ovo se može pripisati hidrofilnijoj prirodi SL, koji usled kraćeg lanca ima veći afinitet za vodenu fazu, te stoga i ima veći kapacitet za vezivanje molekula vode. Zasnovano na tome, hidrofilne grupe saharoznog estra sa kraćim ugljovodoničnim lancem su u većem stepenu izložene molekulima vode, te samim tim intenzivnije modifikuju termalne osobine molekula vode.

4.2.4. Direktna metode karakterizacije koloidne strukture izabranih mikroemulzija

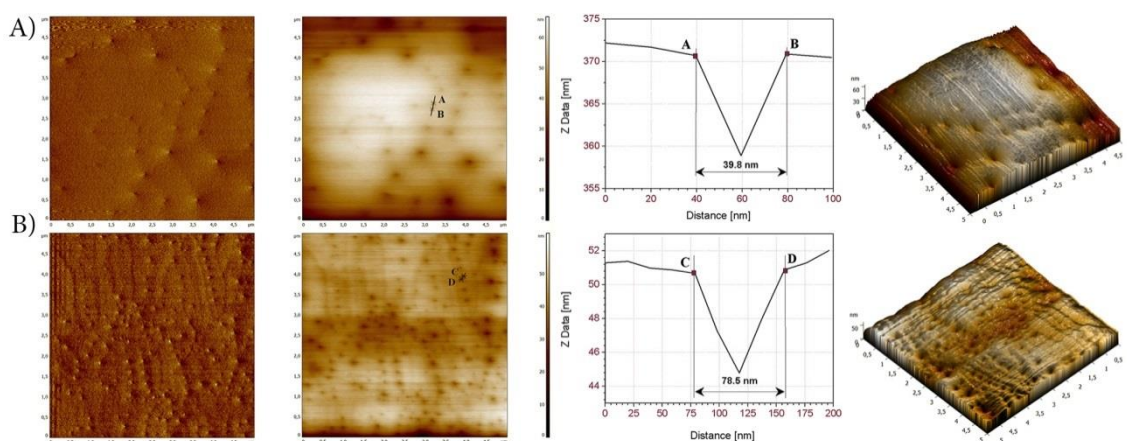
Kako bi se definisao optimalan način pripreme uzoraka, preliminarni eksperiment je uključio poređenje AFM mikrografija istog uzorka pripremljenog na različite načine, kao što je objašnjeno u poglavlju 3.2.2.8 ove doktorske disertacije. Kako nije bilo značajnog uticaja postupka sušenja uzorka na pločici na kvalitet dobijenih mikrografija, u nastavku ove doktorske disertacije za snimanje morfologije mikroemulzija, uzorci su sušeni u eksikatoru. Na **Slici 4.23** su prikazane AFM mikrografije kapljičnih i bikontinuiranih mikroemulzija koje u sastavu sadrže SL kao surfaktant.



Slika 4.23. AFM mikrografije uzoraka mikroemulzija sa kapljičnom i bikontinuiranom strukturom. 2D i 3D mikrografije topografije mikroemulzionih uzoraka: A) FL10; B) FL40; C) FL70, sa umetnutim 2D signalom greške u 2D mikrografije topografije.

Imajući u vidu nizak sadržaj visokoprečišćene vode u uzorku FL10 (10% m/m), pojedinačne kapljične strukture sa poprečnim presekom manjim od 100 nm (**Slike 4.23A** i **4.24A**) ukazuju na prisustvo vodenih kapi u kontinuiranoj uljanoj fazi. Sa druge strane, udeo vode (70% m/m) kao i morfologija uzoraka prikazanih na **Slikama 4.23B** i **4.24C** nedvosmisleno ukazuju na U/V mikroemulzije sa veličinom kapi uljane faze koja je karakteristična za ovakve sisteme. U nastavku, na **Slici 4.23** se može videti da je mikrografija uzorka FL40 različita u odnosu na strukturu uzoraka FL10 i FL70.

Mikrografija uzorka FL40 ukazuje na prisustvo međusobno isprepletanih domena uljane i vodene faze, što je karakteristika unutrašnje strukture bikontinuiranih mikroemulzija, što je i pretpostavljeno indirektnim fizičko-hemijskim metodama (tj. merenjem električne provodljivosti, reološkom, i DSC analizom uzoraka). Na ovoj mikrografiji se može uočiti da pojedinačne kapi imaju tendenciju da formiraju agregate izdužene poligonalne strukture. Stoga, struktura koja se uočava na **Slici 4.23B** može biti interpretirana kao prisustvo vodenih agregata koji koegzistiraju sa uljanom fazom u okviru bikontinuirane strukture mikroemulzija. Nakon perkolacionog praga, površina kapi postaje fluidna u dovoljnom stepenu da dovodi do kolizije, i nakon toga nastanka vodenih klastera i kanala. Stoga, može se izvesti konačan zaključak da mikrografije na **Slici 4.23** potvrđuju prisustvo strukturnih promena u sistemu izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda, gde sistem prelazi iz pojedinačnih vodenih kapi u vodenu mrežu, dajući potvrdu prisustva bikontinuirane strukture u uzorku FL40, nakon čega dolazi do konverzije bikontinuirane strukture u mikroemulzije U/V tipa. Sa druge strane, geometrijska neuređenost koja se uočava na mikrografiji na **Slici 4.23B**, daje i direktnu potvrdu da se ovaj sistem razlikuje od lamelarnih tečnih kristala, koji predstavljaju geometrijski uređene strukture sa visokim viskozitetom i pseudoplastičnim tipom tečenja [80]. Takođe, ovi rezultati su u skladu sa odsustvom anizotropije kada se uzorci posmatraju polarizacionim mikroskopom.



Slika 4.24. Analiza poprečnog preseka AFM mikrografija sa ciljem određivanja veličine kapi V/U i U/V mikroemulzija: A) FL10 i B) FL70.

Ako se posmatra veličina kapi koja je izračunata na osnovu AFM mikrografija (**Slika 4.24**), uljane kapi u uzorku FL70 (koji sadrži 70% *m/m* visokoprečišćene vode) su veće u poređenju sa vodenim kapima u uzorku FL10 (78,5 nm naspram 39,8 nm). Veće dimenzije kapi U/V mikroemulzija mogu biti posledica lokalizacije molekula izopropilmiristata i njegove amfifilne strukture, kao što je pokazano od strane Bardhan i saradnika [241]. Stoga, mikrografije dobijene primenom AFM, potvrđuju preliminarne rezultate o strukturi mikroemulzija na osnovu indirektnih fizičko-hemijskih parametara, te stoga i strukturnu inverziju iz V/U u U/V mikroemulzije, preko bikontinuirane strukture.

4.3. Rezultati i diskusija treće faze istraživanja

4.3.1. Solubilizacija aceklofenaka u mikroemulzionim sistemima zasnovanim na saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca

Potvrđena kompleksnost i složenost strukture mikroemulzija sa različitim udelom vodene faze pruža mogućnost razvoja formulacija koje mogu da solubilizuju terapijske koncentracije aceklofenaka. Imajući to u vidu, u nastavku ove doktorske disertacije ispitan je solubilizacioni kapacitet za aceklofenak duž izabrane linije razblaženja (odnos surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1). Zapaženo je da se solubilizacioni kapacitet mikroemulzija za aceklofenak smanjuje kako se udeo vodene faze u mikroemulzijama povećava. Naime, najviši udeo vodene faze, duž odabrane linije razblaženja, pri kome ne dolazi do taloženja aceklofenaka je 35% *m/m*. Interesantno, rezultati ovog dela doktorske disertacije ukazuju da kapacitet za solubilizaciju aceklofenaka ne zavisi od tipa surfaktanta, tj. od dužine ugljovodoničnog lanca saharoznog estera. Stoga su mikroemulzije zasnovane na SL i SM sa udelom vode od 35% *m/m* izabrane kao optimalne formulacije (označene kao FL i FM u **Tabeli 4.6**) za inkorporaciju aceklofenaka u koncentraciji 2% *m/m*, s obzirom da dalje povećanje frakcije vodene faze dovodi do zamućenja sistema i/ili pojave taloga.

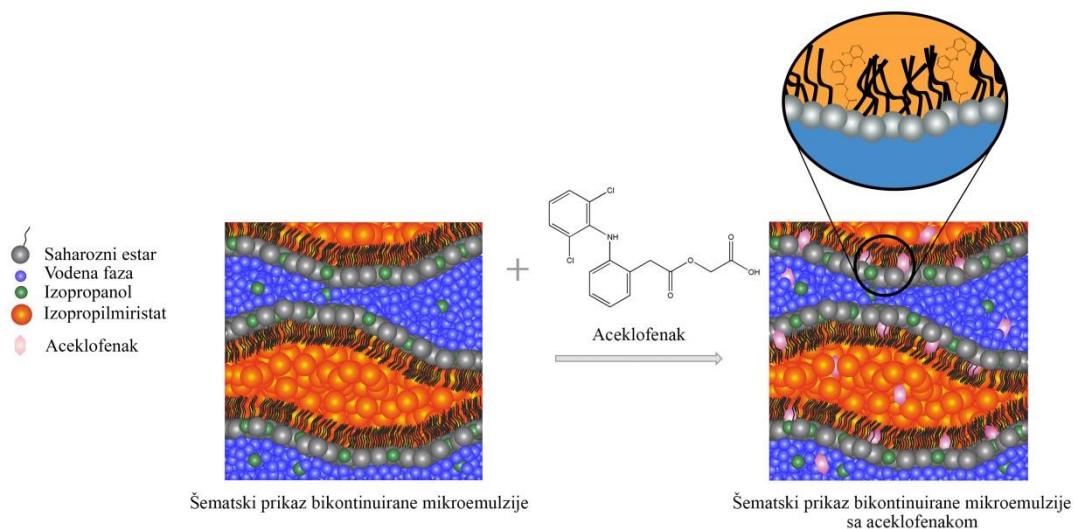
Tabela 4.6. Sastav izabranih mikroemulzionih formulacija

Mikroemulzioni sastav [% <i>m/m</i>]	FL	FM	FP	FT
Saharoza laurat/izopropanol*	58,5			
Saharoza miristat/izopropanol*		58,5		
Polisorbat 80/ izopropanol*			58,5	
Saharoza miristat/Transcutol P*				58,5
Izopropilmiristat	6,5	6,5	6,5	6,5
Visokoprečišćena voda	35,0	35,0	35,0	35,0

*Maseni odnos surfaktant : kosurfaktant je 1 : 1.

Fenomen smanjenja solubilizacionog kapaciteta za aceklofenak sa povećanjem udela vodene faze u sistemu može se razumeti i sagledavanjem hemijske strukture aceklofenaka, koji pored nepolarnog dela (dve fenil grupe) sadrži i karboksilnu (-

COOH) grupu kao mali, polarni deo molekula (**Slika 4.25**). Zahvaljujući prisustvu i lipofilnih i hidrofilnih delova, tj. mezogenoj strukturi, solubilizovan aceklofenak ne ostaje primarno lokalizovan ni u uljanoj fazi (kao nejonizovan molekul), ni u vodenoj fazi (kao jonizovan molekul), već se ponaša i kao kosurfaktant, povećavajući mogućnost inkorporacije u međupovršinski film surfaktanta i kosurfaktanta (**Slika 4.25**).



Slika 4.25. Šematski prikaz lokalizacije aceklofenaka nakon solubilizacije u bikontinuirane mikroemulzije sa saharoznim estrima.

Kako bi se ispitale ove pretpostavke o lokalizaciji aceklofenaka, istovremeno je sprovedena i studija rastvorljivosti aceklofenaka u komponentama mikroemulzija. Kao što je prikazano u **Tabeli 4.7**, aceklofenak ima veoma sličnu rastvorljivost u obe korišćene smeše surfaktant-kosurfaktant, kao i u čistom izopropanolu. Rastvorljivost u čistim surfaktantima (SL i SM) nije ispitana, s obzirom na čvrsto agregatno stanje ovih supstanci. Nasuprot tome, rastvorljivost aceklofenaka u uljanoj fazi (izopropilmiristat) je oko 14 puta niža u odnosu na smešu surfaktant-kosurfaktant, i oko 70 puta viša u odnosu na visokoprečišćenu vodu koja predstavlja vodenu fazu ovog sistema. Imajući u vidu visok udeo smeše surfaktant-kosurfaktant u odabranim mikroemulzijama (**Tabela 4.6**), kao i strukturu aceklofenaka, može se pretpostaviti da je najveći udeo aceklofenaka lokalizovan u međupovršinskom filmu mikroemulzija.

Tabela 4.7. Rastvorljivost aceklofenaka u komponentama mikroemulzija izražena u mg/ml ± SD.

	V	IPA	IPM	SL/IPA	SM/IPA
Rastvorljivost	0,06 ±	56,40 ±	4,46 ±	59,16 ±	52,49 ±
[mg/ml]	0,01	0,89	0,06	1,22	1,03

Ovi rezultati u potpunosti idu u prilog tvrdnji da su hidrofobni lekovi primarno lokalizovani u uljanoj fazi, a hidrofilni u polarnoj, vodenoj fazi mikroemulzija. Stoga, opravdano je pretpostaviti da će najveći udeo lekovitih supstanci sa amfifilnom strukturom biti lokalizovan na međufazi voda/ulje [59, 103]. Sa povećanjem udela vodene faze smanjuje se količina međupovršinskog filma surfaktanta koji je dostupan za inkorporaciju aceklofenaka, što dovodi do toga da dalje povećanje udela vodene faze za rezultat ima formiranje taloga i/ili zamućenje sistema nakon dodatka aceklofenaka u terapijskoj koncentraciji 2% *m/m*.

4.3.2. Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje nanostrukture odabranih mikroemulzija

Struktura i solubilizacioni kapacitet mikroemulzija su veoma važni faktori koji utiču na oslobađanje, a posledično i na isporuku lekovite supstance u dublje slojeve kože, ili u slučaju transdermalne isporuke, u sistemsku cirkulaciju, s obzirom da je proces isporuke lekovite supstance uslovljen koncentracionim gradijentom i Fikovim zakonom difuzije. Sa tog aspekta, visok solubilizacioni kapacitet za lekovitu supstancu može imati pozitivan uticaj na povećanje koncentracionog gradijenta te, samim tim, i na penetraciju/permeaciju lekovite supstance u/kroz kožu. Bez obzira na unutrašnju strukturu (V/U, U/V ili bikontinuirane), mikroemulzije nisu rigidni sistemi, već imaju dinamičan karakter, što može imati značajan uticaj na perkutanu penetraciju/permeaciju. Iako je u literaturi prihvaćeno da svi tipovi mikroemulzija doprinose poboljšanju dermalne/transdermalne isporuke, dinamična struktura bikontinuiranih mikroemulzija može doprineti boljoj isporuci lekovite supstance u dublje slojeve kože u odnosu na kapljični tip mikroemulzija. Poboljšanju penetracije lekovite supstance kroz SC doprinosi i nizak međupovršinski napon bikontinuiranih mikroemulzija koji poboljšava

vlaženje kože [79]. Sve ovo nedvosmisleno opravdava primenu (bikontinuiranih) mikroemulzija za dermalnu i/ili transdermalnu isporuku aceklofenaka.

U okviru ove faze eksperimentalnog rada, u cilju procene bezbednosti i efikasnosti mikroemulzija sa saharoznim estrima, formulisana je mikroemulzija sa polisorbitom 80 (označena kao FP), istog kvantitativnog sastava (isti udeo vodene i uljane faze, i isti odnos surfaktant-kosurfaktant, **Tabela 4.6**). Izbor formulacija sa istom koncentracijom komponenata je značajan u cilju procene uticaja tipa surfaktanta (etoksilovani ili neetoksilovani surfaktant), kao i strukture neetoksilovanog surfaktanta (SL ili SM) na nanostrukturu mikroemulzija, kao i na penetraciju/perkutanu resorpciju aceklofenaka nakon primene mikroemulzija na koži. Na taj način, isključena je mogućnost uticaja udela komponenata, kao i strukture mikroemulzija na isporuku lekovite supstance, s obzirom da ovi faktori u velikoj meri imaju uticaj na sve ispitivane parametre [62].

4.3.2.1. Merenje pH vrednosti, električne provodljivosti i reološka merenja

Solubilizacija aceklofenaka u mikroemulzijama FL, FM, i FP ima snažan uticaj na pH vrednost placebo formulacija (**Tabela 4.8**). Kao što se vidi u **Tabeli 4.8**, bez obzira na početnu pH vrednost placebo mikroemulzija, dodatak aceklofenaka dovodi do smanjenja pH vrednosti za ~ 3 pH jedinice. Imajući u vidu da je pK_a vrednost aceklofenaka 4,7 [242], kao i dobijene eksperimentalne pH vrednosti za mikroemulzije sa aceklofenakom, može se zaključiti da je veliki udeo lekovite supstance u sistemu u nejonizovanom obliku. Ovaj podatak je veoma važan za dalji tok istraživanja, s obzirom da nejonizovana frakcija NSAIL u velikom stepenu doprinosi penetraciji lekovite supstance kroz kožu, te samim tim i lokalnoj/sistemske bioraspodivnosti, dok jonizovana frakcija NSAIL ograničava dermalnu/transdermalnu isporuku usled ograničene rastvorljivosti u lipidima SC [242, 243].

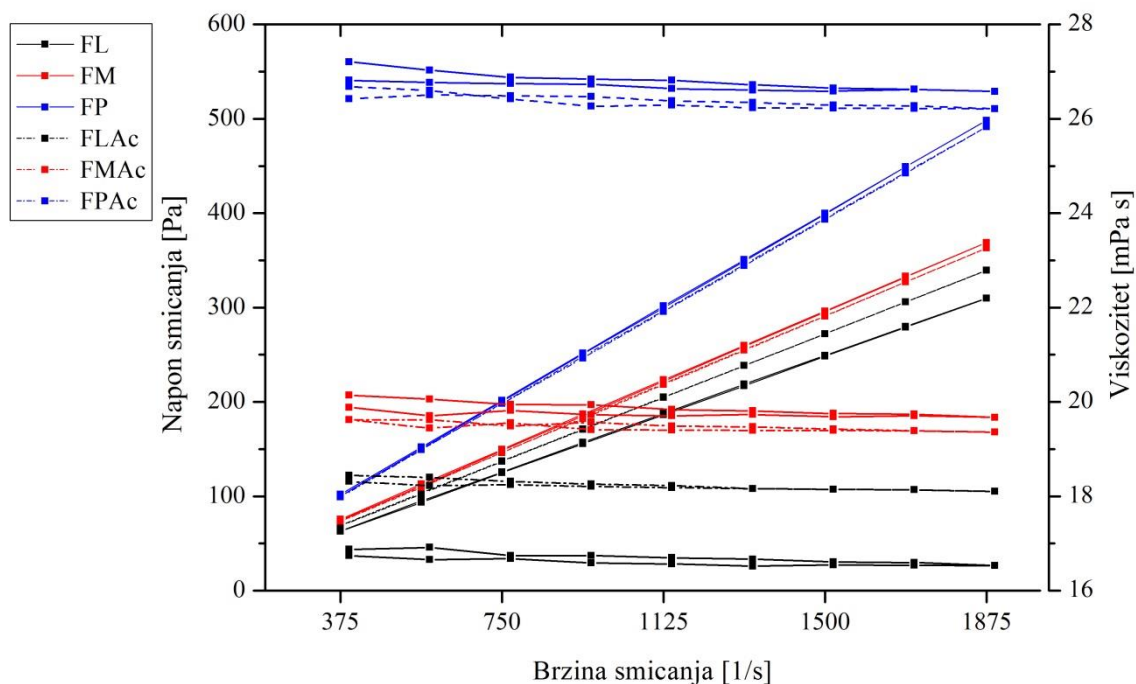
Tabela 4.8. Vrednosti električne provodljivosti, viskoziteta i pH za mikroemulzije sa i bez aceklofenaka. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

	Placebo mikroemulzije			Mikroemulzije sa aceklofenakom		
	σ [$\mu\text{s/cm}$]	η [mPa s]	pH	σ [$\mu\text{s/cm}$]	η [mPa s]	pH
FL	58,13 \pm 0,21	16,87*	6,48 \pm 0,01	63,9 \pm 0,10	18,31*	3,38 \pm 0,01
FM	50,50 \pm 0,82	19,88*	6,32 \pm 0,02	56,83 \pm 0,21	19,62*	3,22 \pm 0,01
FP	23,10 \pm 0,10	26,81*	7,59 \pm 0,01	29,47 \pm 0,15	26,42*	4,01 \pm 0,01

*Vrednosti prividnog viskoziteta pri brzini smicanja 375 s^{-1} .

Kao što se vidi na **Slici 4.26**, sve ispitivane mikroemulzije pokazuju linearnu zavisnost između napona i brzine smicanja što ukazuje da su odabrani sistemi bez (FL, FM i FP) i sa aceklofenakom (FLAc, FMAc i FPAc) njutnovske tečnosti. Niske vrednosti prividnog viskoziteta (16-27 mPa s), kao i odsustvo anizotropije kada se uzorak posmatra pod polarizacionim mikroskopom, omogućavaju razlikovanje mikroemulzija od tečnih kristala, koje mogu imati sličan kvalitativni sastav i udeo komponenata [244]. S obzirom da viskozitet mikroemulzije zavisi od sastava, tj. od udela vodene faze i surfaktanta, a formulacije su izabrane tako da je udeo komponenata u svakoj mikroemulziji isti, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da viskozitet mikroemulzija zavisi od tipa i strukture surfaktanta. Takođe, na **Slici 4.26** se može uočiti da dodatak aceklofenaka u ispitivane formulacije ima mali uticaj na viskozitet placebo mikroemulzija, dok je tip proticanja ostao nepromenjen.

Ukoliko se uporede dobijene krive viskoziteta (**Slika 4.26**), vrednosti viskoziteta su više u slučaju mikroemulzija zasnovanih na polisorbatu 80 (FP i FPAc), u poređenju sa mikroemulzijama zasnovanim na saharoznim estrima (FL, FM, FLAc i FMAc). Interesantno, dobijen trend krivih viskoziteta je u skladu sa molekulskom masom korišćenih surfaktanta (524,60; 552,65; 1310,00 g/mol za SL, SM i polisorbat 80, respektivno). Treba imati u vidu da navedene molekulske mase saharoznih estara predstavljaju molekulske mase saharoza monolaurata i saharoza monomiristata koji predstavljaju 80% ukupnog sadržaja surfaktanata SL i SM (**Tabela 3.1**).

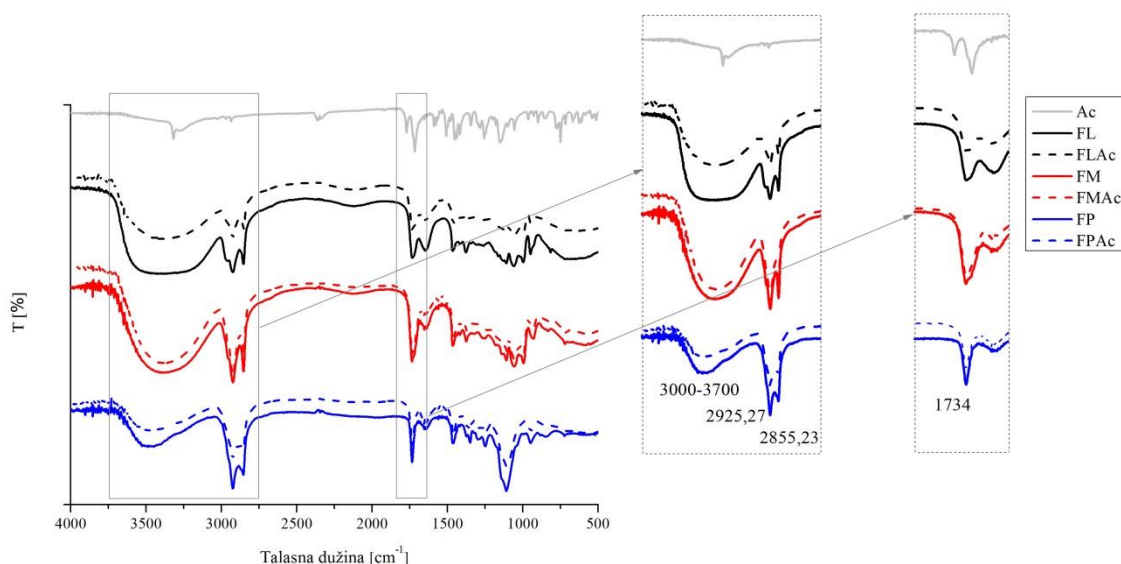


Slika 4.26. Krive proticanja i krive viskoziteta za mikroemulzije sa i bez aceklofenaka za odabrane sisteme sa saharoza lauratom (FL i FLAc), saharoza miristatom (FM i FMAc) i polisorbitom 80 (FP i FPAc).

Izmerene vrednosti σ koje su prikazane u **Tabeli 4.8**, ukazuju na prisustvo vodene mreže koja je odgovorna za provodljivost sistema [110]. Ove pretpostavke, u kombinaciji sa rezultatima profila električne provodljivosti duž izabrane linije razblaženja (surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1) iz prethodne faze istraživanja (4.2.3.1) ukazuju na bikontinuiranu strukturu odabranih uzoraka. U slučaju mikroemulzija sa aceklofenakom, vrednosti električne provodljivosti su neznatno više u odnosu na placebo formulacije ukazujući na odsustvo značajne frakcije jonizovanog leka, što je u skladu sa pK_a vrednošću aceklofenaka i izmerenim pH vrednostima mikroemulzija.

Na FTIR spektru čistog aceklofenaka (**Slika 4.27**) mogu se uočiti karakteristične apsorpcione trake na $3319,5 \text{ cm}^{-1}$ (sekundarne N-H vibracije rastezanja), $3025,57 \text{ cm}^{-1}$ (-C-H vibracije rastezanja aromatičnih jedinjenja), 2937 cm^{-1} (-C-H vibracije rastezanja alifatičnih jedinjenja), 1717 cm^{-1} (karbonilne C=O vibracije rastezanja), 1772 cm^{-1}

(C=O rastezanje karboksilne grupe), 716 cm^{-1} (C-Cl vibracija), $1587,79\text{ cm}^{-1}$, $1577,84\text{ cm}^{-1}$, $1508,18\text{ cm}^{-1}$ i $1451,78\text{ cm}^{-1}$ (aromatične C=C vibracije rastezanja), pik na $965,21\text{ cm}^{-1}$ i izražena traka na $1344.6\text{--}1256.58\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju O–H širokoj traci (savijanje izvan ravni) i –C–O vibraciji rastezanja, respektivno. FTIR spektar, kao i karakteristične trake aceklofenaka su u saglasnosti sa literaturnim podacima [24].



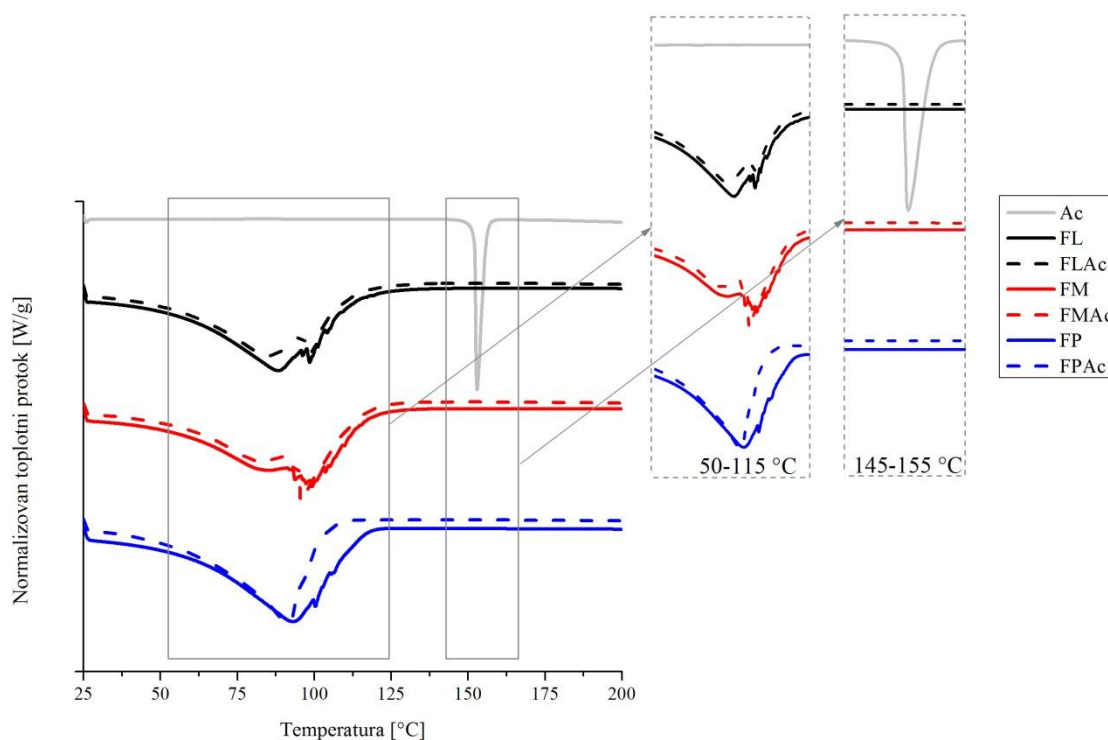
Slika 4.27. FTIR spektri aceklofenaka, mikroemulzija sa i bez aceklofenaka za odabrane sisteme sa saharoza lauratom (FL i FLAc), saharoza miristatom (FM i FMAc) i polisorbitom 80 (FP i FPAc).

Karakteristični pikovi koji se pojavljuju na FTIR spektrima placebo mikroemulzija (široka traka u oblasti 3700 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} koja odgovara O-H rastezanju, trake na $2925,27\text{ cm}^{-1}$ i $2855,23\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju asimetričnom, odnosno simetričnom CH_2 rastezanju, i pik na 1734 cm^{-1} usled C=O rastezanja) su u skladu sa karakterističnim funkcionalnim grupama ekscipijenasa mikroemulzija. Ono što je očigledno na **Slici 4.27** je da se karakteristične trake pojavljuju i na spektrima mikroemulzija sa aceklofenakom, bez prisustva novih ili pomeranja postojećih pikova, što ukazuje da u sistemu ne dolazi do strukturnih promena koje su posledica inkorporiranja lekovite supstance.

4.3.2.2. Termalna analiza odabranih uzoraka mikroemulzija

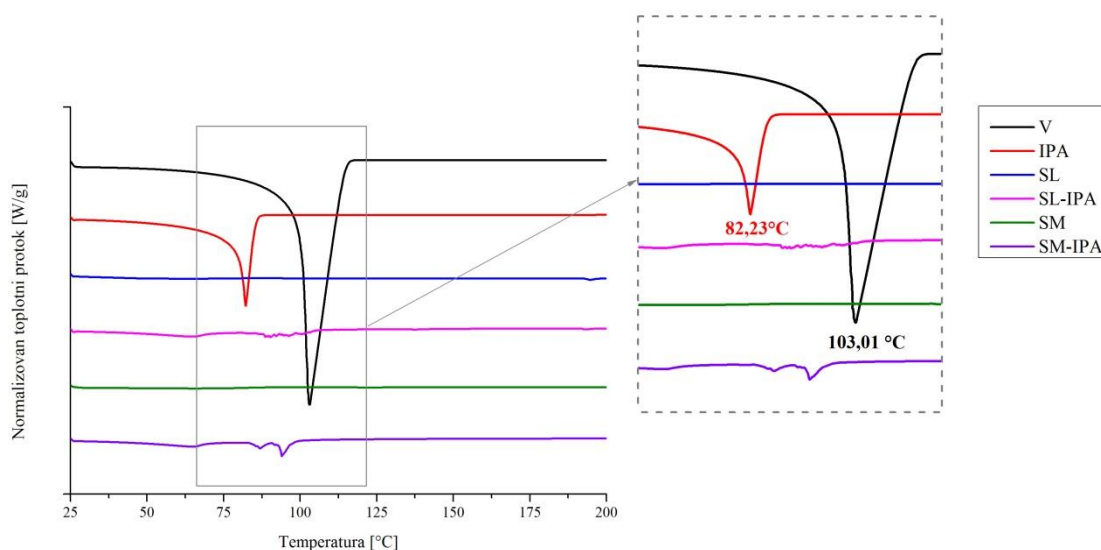
U nastavku ove faze izvršena je termalna analiza odabranih mikroemulzija sa i bez lekovite supstance. Najpre je izvršena DSC analiza uzoraka tokom zagrevanja u

definisanim temperaturnom intervalu. DSC termogrami aceklofenaka, kao i mikroemulzija sa i bez aceklofenaka su prikazani na **Slici 4.28**.



Slika 4.28. DSC termogrami aceklofenaka, mikroemulzija sa i bez aceklofenaka za odabrane sisteme sa saharoza lauratom (FL i FLAc), saharoza miristatom (FM i FMAc) i polisorbitatom 80 (FP i FPAc).

Na DSC termogramu lekovite supstance se uočava endotermni pik na 152,86°C, koji odgovara tački topljenja aceklofenaka, što je u skladu sa literaturnim podacima [39]. Široki endotermni pikovi (**Slika 4.28**) u opsegu od 50 do 115°C na DSC termogramima placebo i mikroemulzija sa aceklofenakom, odgovaraju isparavanju izopropanola i visokoprečišćene vode, što je i potvrđeno DSC analizom pojedinačnih komponenata mikroemulzija (**Slika 4.29**). Naime, na **Slici 4.29** se jasno uočava da izopropanol ima endotermni pik na 82,23°C (onset 78,58°C) dok visokoprečišćena voda ima pik na 103,01°C (onset 98,29°C), što potvrđuje da je širok pik mikroemulzija posledica isparavanja ove dve komponente.



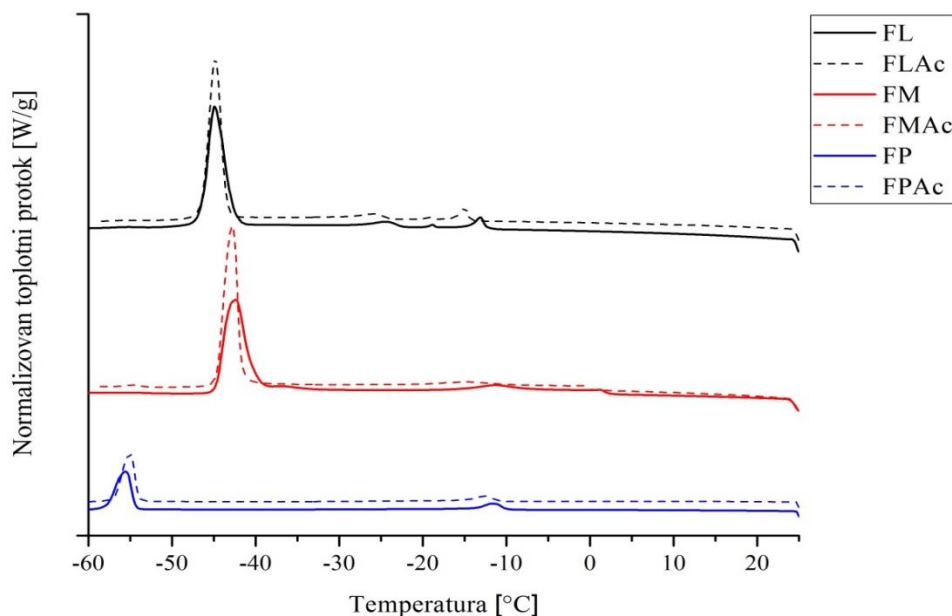
Slika 4.29. DSC termogrami komponenta mikroemulzija (V-visokoprečišćena voda, IPA-izopropanol, SL-saharozna laurat, SM-saharozna miristat).

U nastavku ovog eksperimentalnog dela, a u cilju procene stanja vode u odabranim formulacijama, izvršeno je hlađenje uzoraka u definisanom temperaturnom rangu. Kada se posmatraju DSC krive hlađenja koje su prikazane na **Slici 4.30**, uočava se da je tačka hlađenja visokoprečišćene vode (pik na $-6,92^{\circ}\text{C}$, poglavlje 4.2.3.3) pomerena ka nižim temperaturama u svim ispitivanim sistemima [134]. Treba napomenuti da je u poglavlju 4.2.3.3 pokazano da je tačka zamrzavanja vode u ispitivanim sistemima sa saharoznim estrima (visokoprečišćena voda/saharozni estar-izopropanol/izopropilmiristat) pomerena ispod limita detekcije u slučaju V/U mikroemulzija, s obzirom na snažan uticaj ostalih komponenta sistema na termodinamičke osobine vode kao unutrašnje faze. Termodinamički parametri prikazani u **Tabeli 4.9** ukazuju da je hidratacija surfaktanta, u kombinaciji sa vezivanjem vode za izopropanol, razlog za odsustvo izraženog egzoternog pika visokoprečišćene vode na $-6,92^{\circ}\text{C}$. U skladu sa tim, egzotermni pik koji potiče od zamrzavanja vode na DSC termogramima placebo formulacija FL, FM i FP (**Slika 4.30**, **Tabela 4.9**) ukazuje na bikontinuiranu strukturu mikroemulzija.

Tabela 4.9. Termodinamički parametri pika vodene faze mikroemulzija sa saharoza lauratom, saharoza miristatom, i polisorbitom 80 pri odnosu surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1, i udelu vodene faze 35% m/m.

	Mikroemulzije bez aceklofenaka		
	FL	FM	FP
Onset [°C]	-42,63	-39,01	-53,88
Pik [°C]	-44,94	-41,05	-55,50
	Mikroemulzije sa aceklofenakom		
	FLAc	FMAc	FPAc
Onset [°C]	-43,48	-41,65	-53,33
Pik [°C]	-44,80	-42,82	-55,07

Takođe, bliske vrednosti termodinamičkih parametara za formulacije sa aceklofenakom potvrđuju bikontinuiranu strukturu mikroemulzija nakon inkorporiranja lekovite supstance. Iako dodatak lekovite supstance u koloidni sistem može da utiče na nanostrukturu sistema, prevashodno usled uticaja na međupovršinski film i interakcija sa različitim komponentama sistema [131], na DSC termogramima (**Slika 4.30**) se ne može uočiti značajan efekat aceklofenaka na strukturu placebo mikroemulzija.



Slika 4.30. DSC krive hlađenja mikroemulzija sa i bez aceklofenaka za odabrane sisteme sa saharoza lauratom (FL i FLAc), saharoza miristatom (FM i FMAc) i polisorbitom 80 (FP i FPAc).

U nastavku, izvršena je i TGA analiza mikroemulzija sa i bez aceklofenaka. Ukoliko se uporede termodinamički parametri dobijeni korišćenjem DSC (**Tabela 4.9**) i TGA (**Tabela 4.10**), primećuje se da su vrednosti pika niže ($-44,94^{\circ}\text{C}$ i $-44,80^{\circ}\text{C}$, za FL i FLAc, respektivno) na DSC krivim hlađenja, a vrednosti rezidualne mase više ($70,73 \pm 2,25\%$ i $70,54 \pm 1,09\%$, za FL i FLAc, respektivno) u slučaju mikroemulzija zasnovanih na SL, u poređenju sa mikroemulzijama na bazi SM ($42,37^{\circ}\text{C}$ i $65,10 \pm 1,01\%$ za FM, odnosno $-42,82^{\circ}\text{C}$ i $67,58 \pm 1,32\%$ za FMAc). Imajući u vidu da su ispitivani uzorci istog kvantitativnog sastava i unutrašnje strukture, dobijene vrednosti ukazuju da struktura surfaktanta ima snažan uticaj na termalno ponašanje vode u sistemu. Naime, zamrzavanje vode je odloženo, a isparavanje manje izraženo u slučaju sistema sa SL, što se može objasniti kao posledica većeg stepena vezivanja vode za saharozni estar sa kraćim ugljovodoničnim lancem. Usled kraćeg ugljovodoničnog lanca, SL ima izraženije hidrofилne osobine, te je stoga i sposobnost vezivanja vode izraženija u sistemu sa C12- u odnosu na C14-saharozni estar, što za rezultat ima prethodno opisane fenomene.

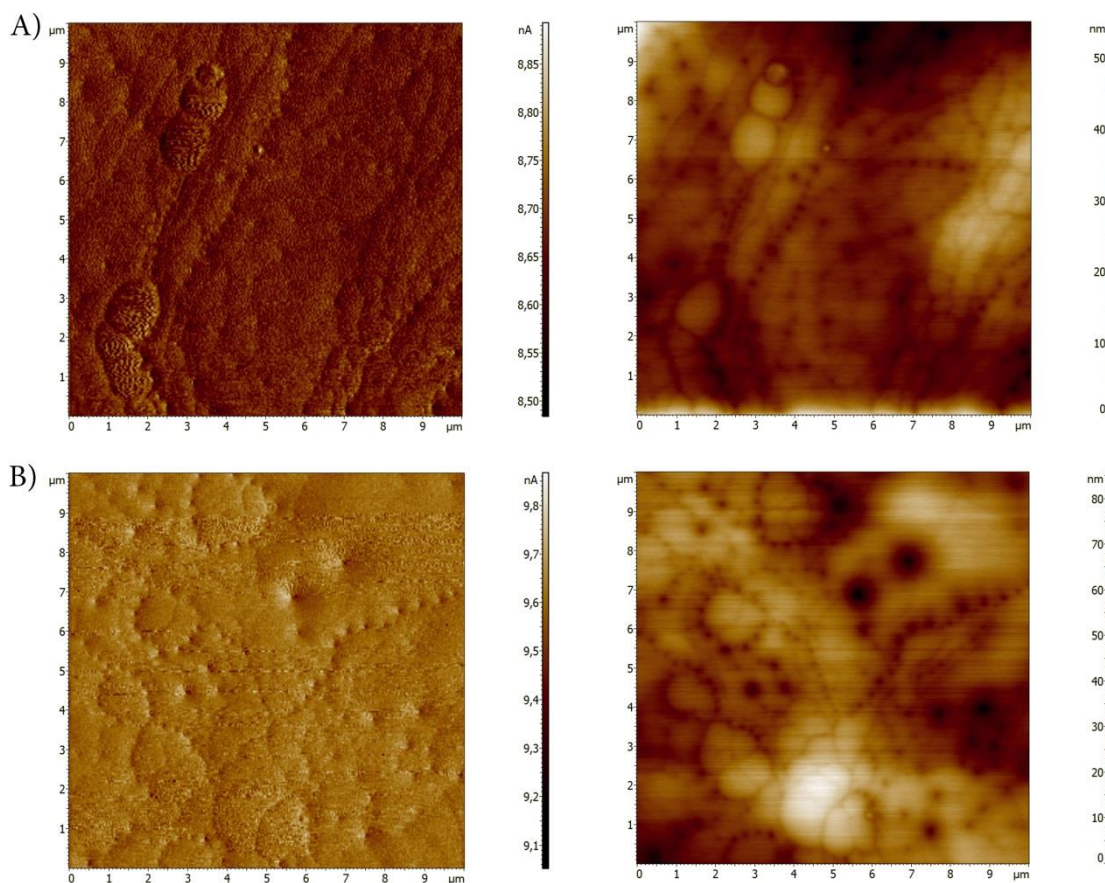
Tabela 4.10. Termoanalitički parametri dobijeni primenom TGA: procenat smanjenja mase u okviru određenih temperaturnih intervala prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

	Mikroemulzije bez aceklofenaka		
	FL	FM	FP
30 – 50°C [%]	6,84 \pm 0,61	7,25 \pm 0,03	7,69 \pm 0,53
50 – 70°C [%]	10,48 \pm 0,42	12,56 \pm 0,41	8,26 \pm 0,80
70 – 110°C [%]	11,94 \pm 1,22	15,08 \pm 0,63	2,98 \pm 1,66
Rezidualna masa [%]	70,73 \pm 2,25	65,10 \pm 1,01	81,05 \pm 2,99
	Mikroemulzije sa aceklofenakom		
	FLAc	FMAc	FPAc
30 – 50°C [%]	7,36 \pm 0,32	9,09 \pm 0,71	6,53 \pm 0,85
50 – 70°C [%]	12,15 \pm 0,11	14,62 \pm 1,49	4,26 \pm 0,52
70 – 110°C [%]	9,94 \pm 0,66	8,7 \pm 0,88	1,28 \pm 0,52
Rezidualna masa [%]	70,54 \pm 1,09	67,58 \pm 1,32	87,92 \pm 0,86

4.3.2.3. Morfološka analiza odabranih formulacija mikroemulzija

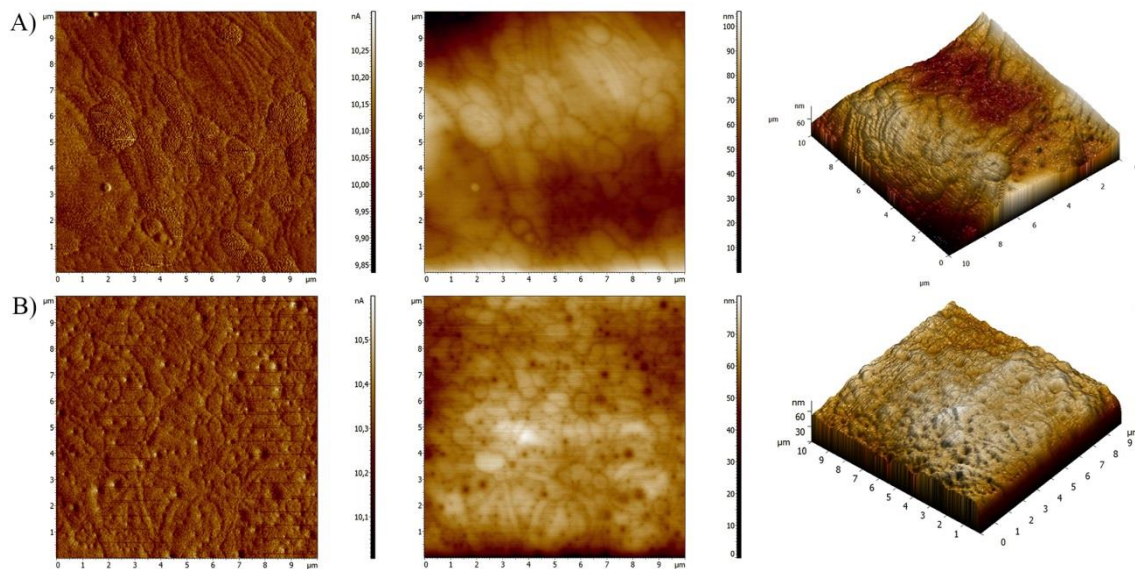
Konačno, da bi se potvrdile pretpostavke o strukturi mikroemulzija sa udelom visokoprečišćene vode od 35% *m/m* dobijene indirektnim fizičko-hemijskim metodama, morfologiji i topografija uzoraka je analizirana primenom AFM. Mikrografije uzoraka FL i FM (**Slika 4.31**) ukazuju na prisustvo kapi koje imaju tendenciju da formiraju

agregate izdužene poligonalne strukture. Stoga, međusobno isprepletani domeni uljane i vodene faze mogu biti interpretirani kao prisustvo vodenih agregata koji koegzistiraju sa uljanom fazom u okviru bikontinuirane strukture mikroemulzija, što je u skladu sa prethodno diskutovanim rezultatima koji su dobijeni indirektnim fizičko-hemijskim metodama.



Slika 4.31. AFM 2D signal greške i 2D slike topografije uzoraka: A) FL, i B) FM.

Nedvosmisleno, mikrografije uzoraka FL i FLAc, koje su prikazane na **Slici 4.32**, ukazuju na prisustvo struktura (međusobno isprepletani domeni uljane i vodene faze) koje su karakteristične za bikontinuirane mikroemulzije. Na slikama 2D signala greške se jasno vide kapi koje su u međusobnom kontaktu, što dovodi do formiranja klastera i kanala koji su prisutni istovremeno sa uljanim domenima. Ovi vodeni fragmenti su u skladu sa rezultatima provodljivosti koji ukazuju na prisustvo vodene mreže koja je odgovorna za električnu provodljivost u sistemu [245].



Slika 4.32. AFM 2D signal greške, 2D i 3D mikrografije topografije mikroemulzija: A) FL, i B) FLAc.

Veoma nizak međupovršinski napon koji se sreće kod bikontinuiranih mikroemulzija sa dinamičnom strukturom i fluktuirajućom međupovršinom može doprineti poboljšanju transporta aktivne supstance kroz SC [79]. Kao što se vidi na **Slici 4.32B**, dodatak aceklofenaka nije imao izražen uticaj na nanostrukturu sistema. Stoga se, na osnovu rezultata indirektnih fizičko-hemijskih tehnika, kao i vizuelizacije uzoraka primenom AFM, može zaključiti da su uzorci sa udelom vodene faze od 35% *m/m* bikontinuirane mikroemulzije, i da njihova struktura nije značajno promenjena nakon solubilizacije aceklofenaka, dok su promene u pH i električnoj provodljivosti posledica fizičko-hemijskih osobina aceklofenaka kao inkorporirane lekovite supstance [131].

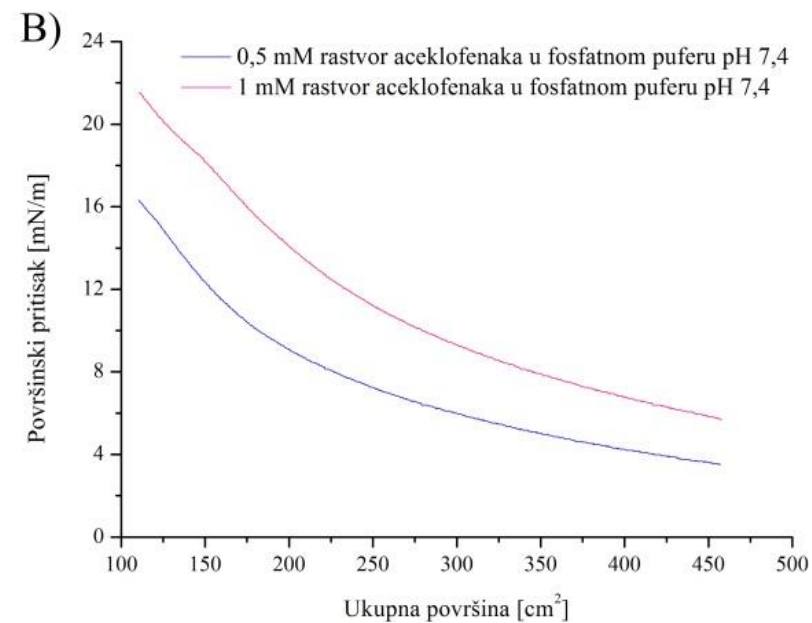
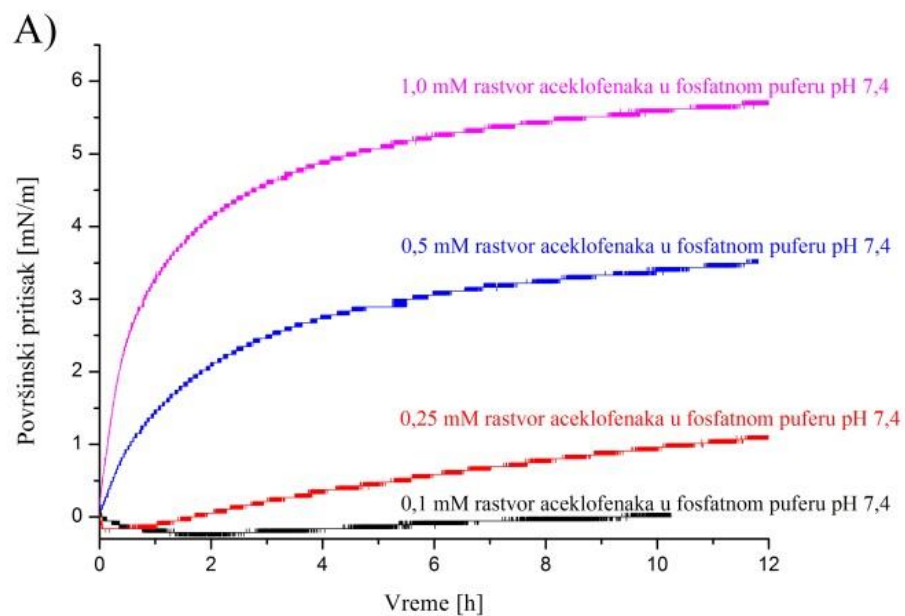
4.3.3. Fizičko-hemijska karakterizacija – određivanje lokalizacije aceklofenaka u odabranim mikroemulzijama

Kao što je već rečeno, lokalizacija i mobilnost lekovite supstance u koloidnim sistemima tipa mikroemulzija može imati direktan uticaj na oslobađanje, a shodno tome, i na dermalnu/transdermalnu isporuku iz nosača. Kao što je već objašnjeno, pored hidrofilnih i lipofilnih lekovitih supstanci, u mikroemulzije je moguće inkorporirati i lekovite supstance amfifilnih karakteristika. U tom slučaju, pretpostavlja se da će molekuli lekovite supstance biti lokalizovani na različitim mestima unutar

mikroemulzione strukture [59]. Shodno strukturi aceklofenaka, kao i prethodno opisanim rezultatima rastvorljivosti u komponentama mikroemulzija (poglavlje 4.3.1), u ovom delu doktorske disertacije će biti ispitana lokalizacija aceklofenaka, kao i mogućnost interakcija sa saharoznim estrima.

4.3.3.1. Fazno ponašanje saharoznih estara i aceklofenaka

Na **Slici 4.33** je prikazana vremenski zavisna adsorpcija aceklofenaka iz rastvora različitih koncentracija u fosfatnom puferu pH 7,4 na međusloj vodena faza/vazduh. Ispitivanje je sprovedeno u vremenskom periodu od 12 h, s obzirom da svako duže ispitivanje otežava interpretaciju dobijenih rezultata usled isparavanja subfaze, što direktno utiče na koncentraciju supstance u rastvoru. Kao što se vidi na **Slici 4.33**, stepen adsorpcije aceklofenaka zavisi od koncentracije supstance u rastvoru, što potvrđuje pretpostavku da je aceklofenak, kao amfifilni molekul, površinski aktivan, kao i da je njegova površinska aktivnost koncentraciono zavisna. Za postizanje vrednosti ravnotežnog pritiska neophodno je određeno vreme, koje očigledno zavisi od početne koncentracije aceklofenaka u subfazi. Za rastvore koncentracije 0,5 i 1,0 mM oblik π -t izoterme je sličan, dok je ravnotežni pritisak veći u slučaju rastvora aceklofenaka veće koncentracije. Isto se može zaključiti i kada se uporede π -t izoterme dobijene za rastvore aceklofenaka koncentracije 0,1 i 0,25 mM. Ako se pak uporede poslednje dve izoterme (0,1 i 0,25 mM) sa prve dve komentarisane (0,5 i 1,0 mM), može se uočiti da je koncentracija aceklofenaka u rastvorima koncentracije 0,1 i 0,25 mM nedovoljna za postizanje ravnotežnog pritiska, tj. i pored adsorpcije na međufazi, između adsorbovanih molekula aceklofenaka ima dovoljno slobodnog prostora koji omogućava da molekuli aceklofenaka i dalje difunduju iz subfaze na međupovršinu. Nasuprot tome, u slučaju rastvora viših koncentracija (0,5 i 1 mM), sa vremenom sve veći broj molekula aceklofenaka biva adsorbovan, dostižući u jednom trenutku ravnotežu između broja adsorbovanih i desorbovanih molekula.



Slika 4.33. A) Vremenski zavisno povećanje površinskog pritiska usled adsorpcije aceklofenaka iz rastvora različite koncentracije (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM i 1 mM) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; B) π -A izoterme dobijene kompresijom nakon adsorpcije aceklofenaka iz rastvora različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na međupovršinu vodena faza/vazduh na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Nakon postizanja ravnotežnog pritiska, međusloj, koji se sastoji od adsorbovanih molekula aceklofenaka, je komprimovan konstantnom brzinom, na osnovu čega su konstruisane π -A izoterme (**Slika 4.33B**). Interesantno, sa kompresijom dolazi do povećanja površinskog pritiska, što ukazuje da molekuli aceklofenaka menjaju orijentaciju na međufazi vodena faza/vazduh. Dodatno, s obzirom da je adsorpcija aceklofenaka koncentraciono zavisna, na osnovu **Slike 4.33B** može se izvesti zaključak da što je viša koncentracija aceklofenaka u subfazi, više će molekula biti adsorbovano na površinu, te će i tokom kompresije doći do većeg povećanja površinskog pritiska pri datoj vrednosti površine po molekulu.

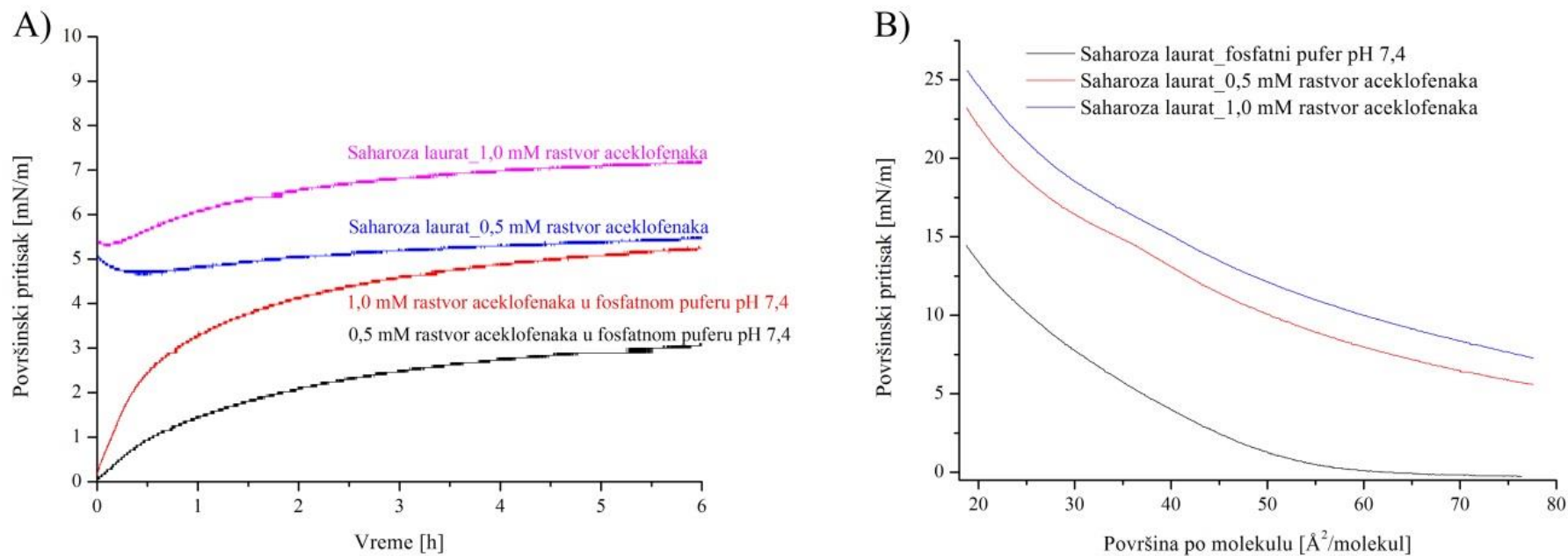
U nastavku ovog dela doktorske disertacije analizirane su kompresione π -A izoterme saharoznih estara na fosfatnom puferu kao subfazi na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (**Slike 4.34** i **4.35**). Iako su oba saharozna estra rastvorljiva u fosfatnom puferu, nakon rasprostiranja oni delimično ostaju na međupovršini fosfatni pufer/vazduh. Tokom kompresije, *lift-off* tačka za SL je $\sim 66 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$ (**Slika 4.34A**), dok je za SM ova vrednost $\sim 99 \text{ \AA}^2/\text{molekul}$ (**Slika 4.35B**). Mali nagib ovih izoterma ukazuje na LE stanje monosloja saharoznih estara (bez dostizanja LC stanja), kao i na delimično rastvaranje molekula u subfazi tokom kompresije [209], što je uočeno i kada je visokoprečišćena voda korišćena kao subfaza (poglavlje 4.1). Pored toga, veće vrednosti površine po molekulu u slučaju SM ukazuju na sporiju desorpciju i rastvaranje u subfazi, ali se delimično može pripisati i većoj površini koju zauzima ugljovodonični lanac C14-saharoznog estra.

Kao što je već objašnjeno, aceklofenak je amfifilni molekul, koji ima sposobnost adsorpcije na međufazu fosfatni pufer/vazduh (**Slika 4.33**). Kako bi se ispitala mogućnost adsorpcije i penetracije aceklofenaka u monosloj saharoznih estara (što odgovara inkorporaciji aceklofenaka u realan mikroemulzioni sistem), u nastavku je ispitano fazno ponašanje saharoznih estara koristeći kao subfazu različite koncentracije aceklofenaka u fosfatnom puferu pH 7,4. Naime, poređenjem π -A i π -t izoterma saharoznih estara u prisustvu i odsustvu aceklofenaka u subfazi na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ može se objasniti uticaj adsorpcije i penetracije aceklofenaka na monosloj saharoznih estara [246]. Nedvosmisleno, prisustvo aceklofenaka u subfazi ima snažan uticaj na π -t izoterme oba ispitivana saharozna estra (**Slike 4.34A** i **4.35A**). Kada je ista zapremina rastvora saharoznog estra naneta na subfazu koja sadrži različite koncentracije

aceklofenaka, obe vrste molekula – i saharozni estri i aceklofenak – su prisutni na međupovršini što se može zaključiti na osnovu povećanja površinskog pritiska odmah nakon nanošenja rastvora saharoznog estera. Dodatno, ako se posmatraju π -A izoterme (**Slike 4.34B** i **4.35B**), povećanje prosečne površine po molekulu pri određenoj vrednosti površinskog pritiska nedvosmisleno ukazuje na penetraciju aceklofenaka u monosloj saharoznog estera [246]. Takođe, značajna razlika u konačnoj vrednosti površinskog pritiska nakon kompresije ukazuje na istovremeno prisustvo molekula aceklofenaka i molekula saharoznih estera na međupovršini vodena faza/vazduh. Stoga, može se zaključiti da su molekuli aceklofenaka penetrirali duboko u monosloj saharoznih estera, te da nisu ostali lokalizovani samo u neposrednoj blizini hidrofilnih glava na međufazi vodena faza/vazduh [246].

Male vrednosti nagiba π -A izoterme saharoznih estera na rastvorima aceklofenaka različite koncentracije ukazuju da su i SL i SM u LE stanju, tj. da molekuli aceklofenaka nisu doveli do većeg stepena uređenosti ugljovodoničnih lanaca saharoznih estera. Više vrednosti prosečne površine po molekulu u slučaju SM pri određenim vrednostima površinskog pritiska, ukazuju na veći stepen rastvaranja SL u subfazi, kao i na veći prostor koji zauzima duži ugljovodonični lanac ovog saharoznog estera. Interesantno, prisustvo molekula aceklofenaka na međupovršini smanjuje desorpciju SL i rastvaranje surfaktanta u subfazi, što se može uočiti gotovo paralelnim pomeranjem izoterme ka višim vrednostima površinskog pritiska (**Slika 4.34B**).

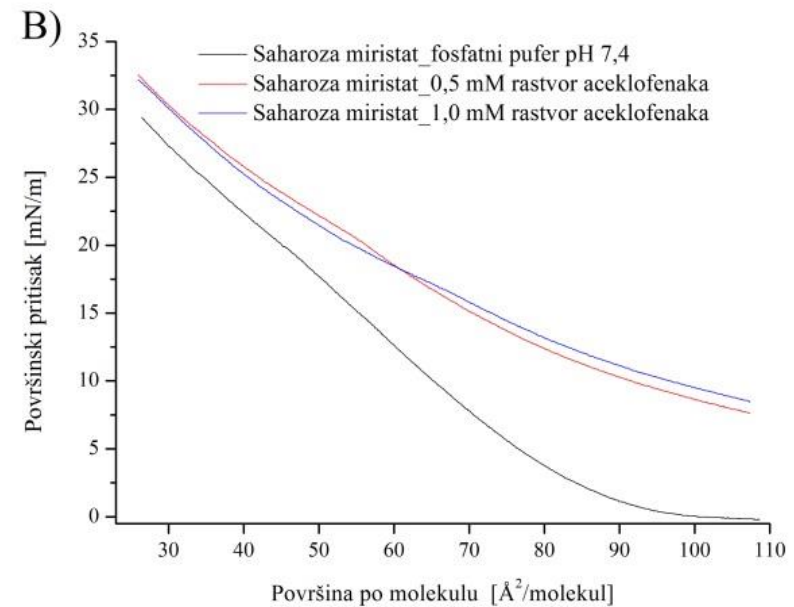
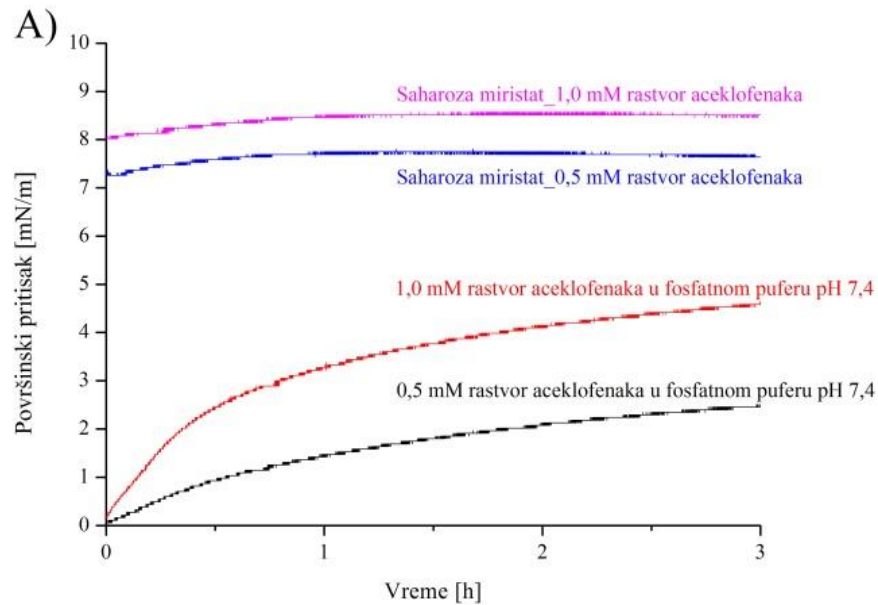
Nasuprot tome, u slučaju C14-saharoznog estera, π -A izoterme dobijene kompresijom monosloja aceklofenak-SM imaju gotovo isti oblik bez obzira na koncentraciju aceklofenaka u subfazi. Ovo se može objasniti činjenicom da molekuli SM, zbog dužeg ugljovodoničnog lanca, zauzimaju više prostora na međufazi te da je ukupna količina adsorbovanog aceklofenaka nezavisna od njegove koncentracije u subfazi.



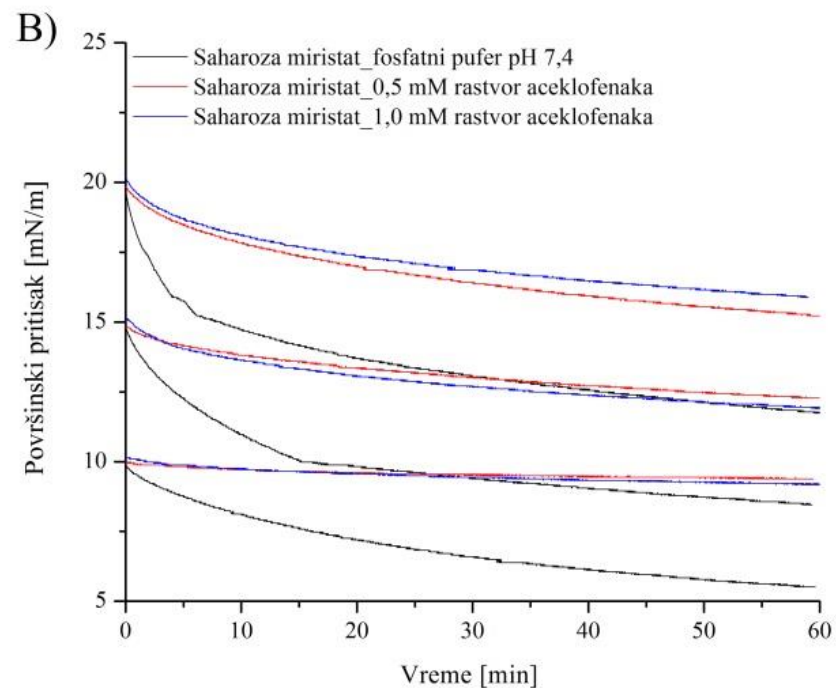
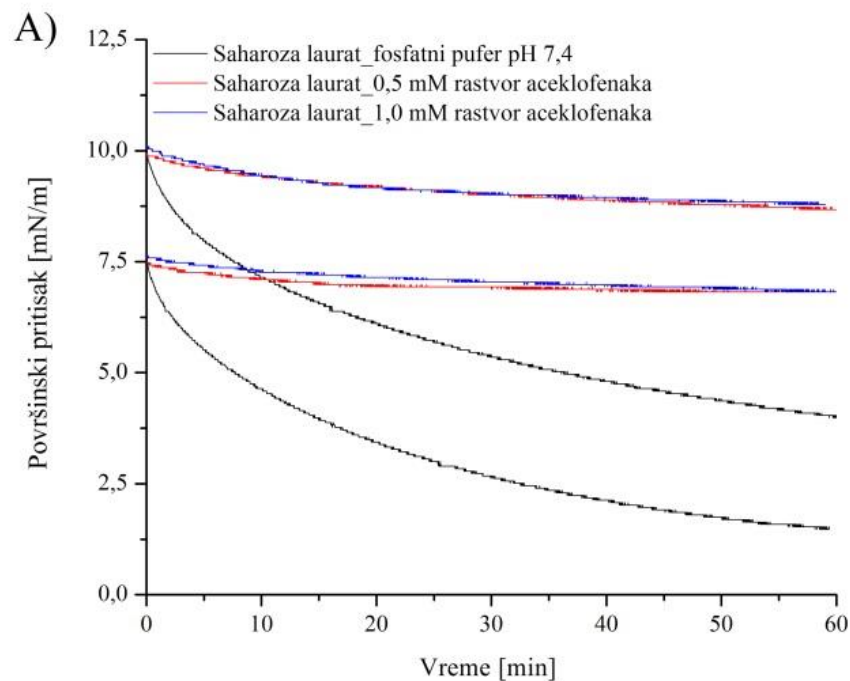
Slika 4.34. A) Vremenski zavisno povećanje površinskog pritiska bez i nakon rasprostiranja saharoza laurata na rastvore aceklofenaka u fosfatnom puferu pH 7,4 različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; B) π -A izoterme dobijene kompresijom monosloja (saharoza laurat, saharoza laurat-aceklofenak) nakon rasprostiranja saharoza laurata na fosfatni pufer i rastvore aceklofenaka različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kako bi se ispitao uticaj aceklofenak na stabilnost mikroemulzija, sprovedene su studije stabilnosti na međufazi fosfatni pufer/vazduh, u kojima je monosloj komprimovan do određene vrednosti površinskog pritiska (7,5 i 10 mN/m, odnosno 10, 15 i 20 mN/m u slučaju SL i SM, respektivno), a zatim je pokretna barijera zaustavljena, te su konstruisane π - t izoterme. U cilju poređenja, na **Slici 4.36** su prikazani rezultati za sve korišćene subfaze (fosfatni pufer, 0,5 mM rastvor aceklofenaka i 1 mM rastvor aceklofenaka). Interesantno, u slučaju oba korišćena saharozna estera, monosloj je stabilniji kada su molekuli aceklofenaka prisutni u subfazi pri svim ispitivanim vrednostima površinskog pritiska (**Slika 4.36**). Ako se prvo posmatra monosloj sa SL, pri vrednosti površinskog pritiska od 10 mN/m, nakon 60 minuta ova vrednost iznosi svega 38% početne vrednosti kada je kao subfaza korišćen fosfatni pufer, dok je u slučaju 0,5 mM i 1mM rastvora aceklofenaka ova vrednost samo neznatno smanjena i iznosi 86%, odnosno 88%, u odnosu na početnu vrednost površinskog pritiska. Pri istim uslovima u slučaju SM, vrednost površinskog pritiska iznosi 55% početne vrednosti, kada se kao subfaza koristi fosfatni pufer, dok je u slučaju 0,5 mM i 1mM rastvora aceklofenaka ova vrednost neznatno smanjena (i iznosi 93% odnosno 91%). Ovi rezultati direktno idu u prilog gore iznetim navodima da molekuli aceklofenaka penetriraju u monosloj saharoznih estara na međufazi fosfatni pufer/vazduh, stabilišući na taj način monosloj surfaktanta na granici dve faze. Dodatno, veće smanjenje površinskog pritiska u slučaju SL, ukazuje na veći stepen desorpcije C12-molekula saharoznog estera sa površine tečne faze, potvrđujući sve prethodno diskutovane rezultate.

Na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da se aceklofenak nalazi na međusloju vodena/uljana faza bikontinuiranih mikroemulzija, te da na taj način doprinosi smanjenju međupovršinskog napona, i, samim tim, stabilnosti mikroemulzija. Ova hipoteza je ispitana u narednom poglavlju.



Slika 4.35. A) Vremenski zavisno povećanje površinskog pritiska bez i nakon rasprostiranja saharoza miristata na rastvore aceklofenaka u fosfatnom puferu pH 7,4 različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; B) π -A izoterme dobijene kompresijom monosloja (saharoza miristat, saharoza miristat-aceklofenak) nakon rasprostiranja saharoza miristata na fosfatni pufer i rastvore aceklofenaka različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.36. A) Stabilnost monosloja (saharoza laurat, saharoza laurat-aceklofenak) nakon rasprostiranja saharoza laurata na fosfatni pufer i rastvore aceklofenaka različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pri definisanim vrednostima površinskog pritiska (7,5 i 10 mN/m); B) Stabilnost monosloja (saharoza miristat, saharoza miristat-aceklofenak) nakon rasprostiranja saharoza miristata na fosfatni pufer i rastvore aceklofenaka različite koncentracije (0,5 mM i 1 mM) na temperaturi $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pri definisanim vrednostima površinskog pritiska (10, 15 i 20 mN/m).

4.3.3.2. EPR kao efikasna tehnika za procenu lokalizacije aceklofenaka

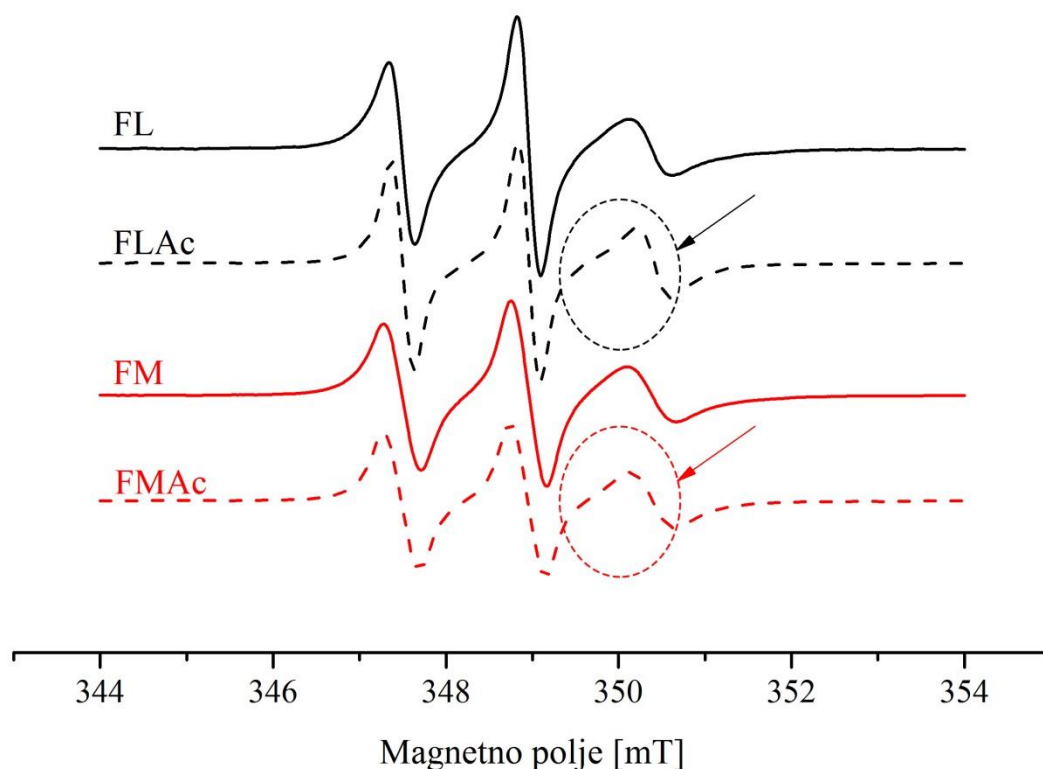
Kako bi se potvrdili rezultati dobijeni u *Langmuir*-ovom monosloju, primenjena je EPR tehnika na mikroemulzionim sistemima koristeći dve spin probe 5-DSA i 12-DSA. EPR tehnika je veoma efikasna za procenu strukture dinamičkih sistema kakve su mikroemulzije [70]. Naime, na osnovu mobilnosti doksil paramagnetnog prstena molekula 5-DSA i 12-DSA, možemo dobiti značajne informacije o dinamičnosti određenih delova međufaze mikroemulzija usled različitog položaja nitroksidnog prstena na alifatičnom lancu masne kiseline. Vrednosti rotacionog korelacionog vremena (τ_R) i parametra uređenosti (S) za mikroemulzije sa i bez aceklofenaka su prikazane u **Tabeli 4.11**.

Tabela 4.11. Rotaciono korelaciono vreme (τ_R) i parametar uređenosti (S) za 5-DSA i 12-DSA u mikroemulzijama zasnovanim na saharoza lauratu i saharoza miristatu sa i bez aceklofenaka.

	5-DSA		12-DSA	
	τ_R [ns]	S	τ_R [ns]	S
FL	$2,76 \pm 0,03$	$0,16 \pm <0,01$	2,06	0,13
FLAc	$1,88 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,01$	2,25	0,14
FM	$2,43 \pm 0,08$	$0,15 \pm <0,01$	$1,83 \pm 0,10$	$0,13 \pm 0,01$
FMAc	$1,81 \pm 0,03$	$0,14 \pm <0,01$	$2,46 \pm 0,10$	$0,14 \pm <0,01$

Ukoliko se posmatraju vrednosti izračunatih parametra za 5-DSA i 12-DSA za placebo sisteme, može se uočiti da je deo međufaznog filma surfaktanta oko dvanaestog ugljenikovog atoma gde se nalazi nitroksidni prsten 12-DSA mobilniji i fleksibilniji u odnosu na deo koji se nalazi bliže hidrofilnim glavama surfaktanta (vrednosti $2,76 \pm 0,03$ ns i 2,06 ns za FL, odnosno $2,43 \pm 0,08$ ns i 1,83 ns za FM). Takođe, vrednosti parametra S su u snažnoj korelaciji sa izračunatim parametrom τ_R potvrđujući veći nivo uređenosti međufilma u blizini nitroksidnog prstena na petom ugljenikovom atomu. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u *Langmuir*-ovom monosloju gde su π -A izoterme ukazale na fluidnost ugljovodoničnih lanaca, dok, sa druge strane, saharozne glave interaguju vodoničnim vezama, ograničavajući pokretljivost monosloja koji je bliži hidrofilnim glavama.

Na osnovu dobijenih vrednosti izračunatih parametara koji su prikazani u **Tabeli 4.11**, može se zaključiti da dodatak aceklofenaka ima snažan uticaj na rigidnost/fluidnost dela međufaznog filma koji se nalazi u neposrednoj blizini paramagnetnog prstena obe korišćene probe. Interesantno, dodatak aceklofenaka ima suprotan uticaj na deo filma koji se nalazi oko petog, odnosno dvanaestog ugljenikovog atoma DSA. Na **Slici 4.37** su prikazani EPR spektri 5-DSA u mikroemulzijama zasnovanim na saharoznim estrima različite dužine ugljovodoničnog lanca, sa i bez dodatka aceklofenaka. U slučaju kada je kao proba korišćena 5-DSA, dodatak aceklofenaka dovodi do smanjenja vrednosti τ_R (sa 2,76 ns na $1,88 \pm 0,03$ ns u slučaju sistema sa SL, odnosno sa $2,43 \pm 0,08$ ns na $1,81 \pm 0,03$ ns u slučaju sistema sa SM). Takođe, istovremeno sa smanjenjem τ_R dolazi i do smanjenja vrednosti S, što ukazuje da dolazi do smanjenja uređenosti korišćene probe. Stoga, smanjenje vrednosti izračunatih parametara ukazuje na povećanje mobilnosti probe, tj. dela međupovršinskog filma koji se nalazi bliže hidrofilnim glavama surfaktanta.



Slika 4.37. EPR spektri 5-DSA u mikroemulzijama zasnovanim na saharoza lauratu i saharoza miristatu sa i bez aceklofenaka.

Nasuprot tome, spin proba 12-DSA je u većem stepenu imobilisana u mikroemulzijama sa aceklofenakom, što se uočava na osnovu povećanja vrednosti τ_R i S (**Tabela 4.11**). Ovi rezultati daju konačnu potvrdu da su molekuli lekovite supstance u značajnom stepenu lokalizovani u membrani bikontinuiranih mikroemulzija, gradeći međupovršinski film zajedno sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta. Naime, na osnovu rezultata prikazanih za obe korišćene probe, može se zaključiti da molekuli aceklofenaka doprinose većoj mobilnosti u regionu oko petog ugljenikovog atoma gde se nalazi nitroksidni prsten 5-DSA, dok dva aromatična prstena lekovite supstance smanjuju pokretljivost dela membrane oko dvanaestog ugljenikovog atoma spin probe 12-DSA. Stoga, na osnovu rezultata u *Langmuir*-ovom monosloju i EPR spektara, izvodimo zaključak da je aceklofenak, kao površinski aktivni molekul sa svoja dva aromatična prstena, u mikroemulzijama zasnovanim na saharoznim estrima lokalizovan na međufazi vodena/uljana faza između molekula surfaktanta, ograničavajući pokretljivost ugljovodoničnih lanaca saharoznih estara.

4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze istraživanja

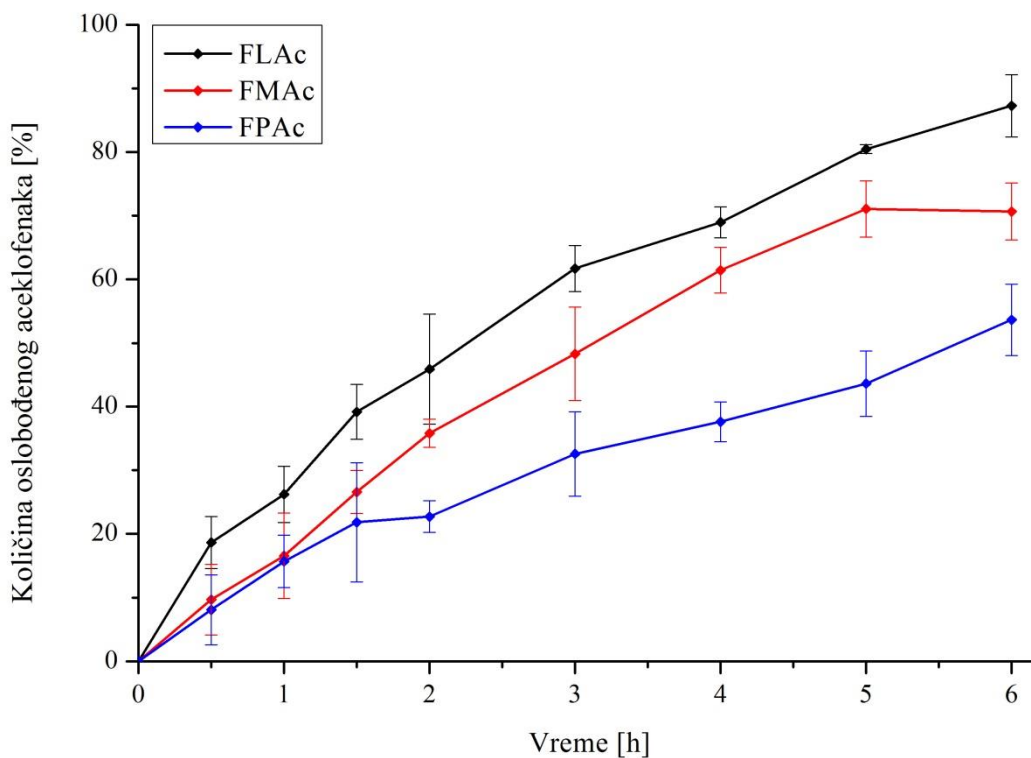
Usled očekivane koristi od bikontinuirane strukture mikroemulzija [79], kao i od lokalne primene aceklofenaka u terapiji reumatoidnih bolesti [122], odabrane mikroemulzije zasnovane na saharoznim estrima sa udelom vodene faze od 35% *m/m* biće predmet istraživanja poslednje, četvrte faze ove doktorske disertacije.

4.4.1. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aceklofenaka primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija

Ukoliko se uporedi ukupna količina aceklofenaka oslobođena nakon 6 h, statistička analiza (ANOVA) je pokazala da je između grupa (FLAc, FMAc i FPAc) prisutna statistički značajna razlika ($F(2, 6) = 33,756$; $p = 0,001$). Naime, količina oslobođenog aceklofenaka je u svakoj vremenskoj tački veća iz mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije zasnovane na polisorbatu 80 (**Slika 4.38**). Stoga, statistički značajno veća količina aceklofenaka je oslobođena iz mikroemulzija FLAc i FMAc ($p < 0,001$ i $p = 0,014$, respektivno) u odnosu na mikroemulzije sa polisorbatom 80 ($87,28 \pm 4,89\%$ i $70,66 \pm 4,46\%$ naspram $53,65 \pm 5,62\%$, respektivno). S obzirom da sve mikroemulzije imaju bikontinuiranu strukturu, istu koncentraciju surfaktanta i istu koncentraciju lekovite supstance, može se zaključiti da koncentracioni gradijent nije jedini faktor koji kontroliše oslobađanje aceklofenaka iz nosača. Takođe, uzimajući u obzir pK_a vrednost aceklofenaka [242], niska pH vrednost svih ispitivanih formulacija (**Tabela 4.8**) isključuje uticaj jonizacije lekovite supstance na oslobađanje aceklofenaka iz mikroemulzija. Shodno tome, može se zaključiti da manja količina oslobođenog aceklofenaka iz mikroemulzije FPAc, može biti, bar delom, posledica nešto višeg viskoziteta formulacije u odnosu na mikroemulzije FLAc i FMAc (**Tabela 4.8**), ali ne treba isključiti ni efekat surfaktanta na oslobađanje lekovite supstance. Pokazano je da saharozni estri povećavaju oslobađanje slabo rastvornih lekovitih supstanci te se stoga može zaključiti da saharozni estri imaju pozitivan uticaj na oslobađanje aceklofenaka iz formulacija FLAc i FMAc [159].

Ukoliko se uporede količine oslobođenog aceklofenaka iz mikroemulzija FLAc i FMAc, značajno veća količina aceklofenaka je oslobođena iz mikroemulzije na bazi SL ($p = 0,016$; $87,28 \pm 4,89\%$ naspram $70,66 \pm 4,46\%$, respektivno) u poređenju sa mikroemulzijom koja kao surfaktant sadrži SM. Ovaj trend je u skladu sa većom

rastvorljivosti aceklofenaka u smeši SL-IPA u poređenju sa SM-IPA ($59,16 \pm 1,22$ mg/ml naspram $52,49 \pm 1,03$ mg/ml, **Tabela 4.7**) ali i sa nižim viskozitetom mikroemulzije FLAc (**Tabela 4.8**). Shodno tome, može se izvesti konačan zaključak, da su tip i struktura surfaktanta veoma važni faktori koji utiču na oslobađanje lekovite supstance iz mikroemulzija.



Slika 4.38. Profil oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija zasnovanih na saharoza lauratu (FLAc), saharoza miristatu (FMAc) i polisorbitu 80 (FPAc). Podaci prikazuju srednju vrednost \pm SD.

U nastavku ovog dela doktorske disertacije, *in vitro* profili brzine oslobađanja su procenjeni i kinetički, tj. korišćenjem različitih modela za opisivanje kinetike oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija. Kinetički modeli (model nultog reda, model prvog reda, *Higuchi* model i *Korsmeyer-Peppas* model) koji su prikazani u **Tabeli 4.12**, su korišćeni za opisivanje oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija.

Tabela 4.12. Matematički modeli korišćeni u analizi profila oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija.

Model	Jednačina
Model nultog reda	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Model prvog reda	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t$
Higuchi model	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas model	$Q_t/Q_\infty = Kt^n$

Q_t – količina lekovite supstance oslobođene u vremenu t ; Q_0 – početna količina lekovite supstance; K_0 , K_1 , K_H – konstanta nultog, prvog reda i Higuchi-jeva konstanta, respektivno; K – Korsmeyer-Peppas konstanta brzine oslobađanja; n – eksponent oslobađanja; Q_∞ – količina lekovite supstance oslobođena u beskonačnom vremenu; Q_t/Q_∞ – razlomak oslobađanja lekovite supstance.

Na osnovu vrednosti R^2 prikazanih u **Tabeli 4.13**, može se izvesti zaključak da model prvog reda najbolje opisuje oslobađanje lekovite supstance iz mikroemulzija na bazi saharoznih estara (FLAc i FMAc) što ukazuje da je oslobađanje aceklofenaka iz ovih nosača kontrolisano kapacitetom nosača za lekovitu supstancu [247].

Tabela 4.13. Vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) za različite modele koji opisuju profile brzine oslobađanja aceklofenaka iz mikroemulzija zasnovanih na saharoza lauratu (FLAc), saharoza miristatu (FMAc) i polisorbatu 80 (FPAc).

Model	FLAc	FMAc	FPAc
Higuchi model	0,9795	0,9271	0,9538
Model nultog reda	0,8753	0,9374	0,9312
Model prvog reda	0,9956	0,9917	0,9762
Korsmeyer-Peppas model	0,9946	0,9713	0,9920*

Podebljane su najviše vrednosti R^2 . Eksponent oslobađanja u Korsmeyer-Peppas modelu $n = 0,71$.

Za razliku od mikroemulzija zasnovanih na saharoznim estrima, oslobađanje aceklofenaka iz formulacije FPAc ima nelinearni difuzioni trend, što se najbolje opisuje Korsmeyer-Peppas modelom. Izračunata n vrednost za eksponent, u opsegu od 0,5 do

1,0 (n = 0,71), ukazuje da je u osnovi oslobađanja ne-Fikova difuzija. Ovo je veoma interesantan podatak, s obzirom da različiti modeli opisuju oslobađanje aceklofenaka iz mikroemulzija zasnovanih na saharoznim estrima i etoksilovanim surfaktantima, bez obzira na isti kvantitativni sastav formulacija, kao i na odsustvo značajnih razlika u strukturi ovih sistema.

4.4.2. *In vitro* procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija – HET-CAM test

HET-CAM test je dobar pokazatelj akutnog iritacionog potencijala formulacija namenjenih za primenu na koži. Iritacioni efekat formulacije se ispoljava narušavanjem vaskularnog protoka, što se manifestuje kao promena boje membrane, hemoragija i povećanje perfuzije [144]. U ovoj doktorskoj disertaciji HET-CAM test je sproveden za sve uzorke mikroemulzija sa i bez aceklofenaka, kao i za pozitivnu (1% rastvor natrijum-laurilsulfata) i negativnu kontrolu (visokoprečišćena voda).

Tabela 4.14. Rezultati HET-CAM testa za sve ispitivane formulacije

	Hemoragija	Liza	Koagulacija	Iritacioni potencijal
FL	1,17	0,00	0,17	Umeren
FLAc	1,17	0,00	0,33	Umeren
FM	1,33	0,17	0,33	Umeren
FMAc	1,50	0,00	0,50	Umeren
FP	1,00	0,33	0,17	Umeren
FPAc	1,33	0,17	0,17	Slab

Kao što je i očekivano, 5 min nakon nanošenja 1% rastvora natrijum-laurilsulfata (pozitivna kontrola), uočljive su brojne membranske diskoloracije, kao i hemoragija, što ukazuje na značajnu iritaciju. Sa druge strane, nanošenje visokoprečišćene vode (negativna kontrola) nije dovelo do iritacije, tj. ispitivani parametri se nisu promenili (hemoragija = 0,00; liza = 0,00 i koagulacija = 0,00).

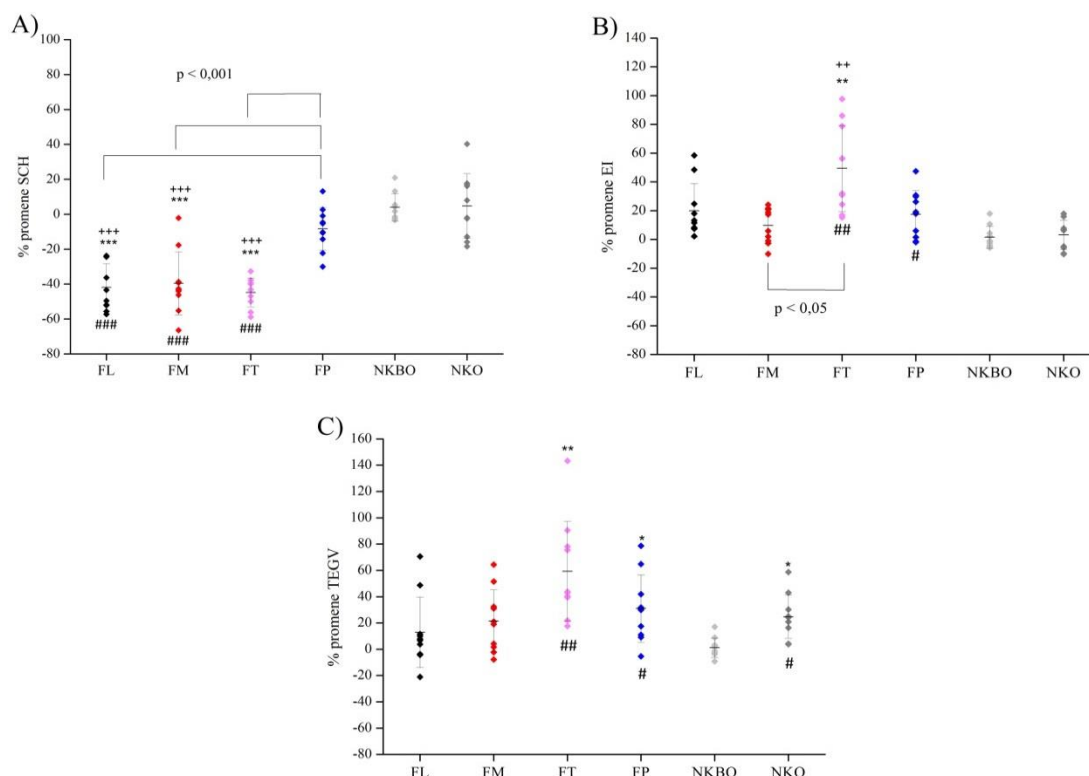
Imajući u vidu da je iritacioni potencijal 1% rastvora natrijum-laurilsulfata okarakterisan kao „jak“ (hemoragija = 1,50; liza = 0,25 i koagulacija = 2,83) može se

zaključiti da sve ispitivane formulacije sa saharoznim estrima imaju umeren iritacioni potencijal. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima različitih mikroemulzionih nosača [144, 248], ukazujući da je dermalna primena odabranih formulacija opravdana. Kako bi se potvrdili ovi navodi u nastavku poglavlja je sprovedeno *in vivo* ispitivanje iritacionog potencijala odabranih formulacija na humanim dobrovoljcima.

4.4.3. *In vivo* procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija

Za procenu promena vrednosti ispitivanih parametara između uzoraka mikroemulzija, kao i između NKO i NKBO, korišćena je ANOVA. Statistička analiza rezultata studije procene bezbednosnog profila ukazuje na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za sve ispitivane parametre SCH ($F(5, 54) = 29,543$; $p < 0,001$), EI ($F(5, 54) = 10,105$; $p < 0,001$) i TEGV ($F(5, 54) = 6,252$; $p < 0,001$). Sa druge strane, kada se posmatraju vrednosti ispitivanih parametara merenih 1 h nakon uklanjanja komorica u odnosu na bazalne vrednosti merene prvog dana, statistički značajna razlika nakon nanošenja formulacija FL i FM je prisutna jedino za vrednost SCH (**Slika 4.39A**), dok za parametre EI i TEGV nema statistički značajnih promena (**Slika 4.39B i C**). Takođe, ako se uporede vrednosti SCH između grupa, uočava se statistički značajna razlika između grupa FL i FM u poređenju sa NKO i NKBO ($p < 0,001$ za sva poređenja). Značajna dehidracija (smanjenje vrednosti parametra SCH) može biti posledica visokih koncentracija izopropanola u ispitivanom uzorku. Sa druge strane, potpuno neočekivano, pokazano je da je smanjenje SCH ($p < 0,001$ u odnosu na bazalnu vrednost, NKBO i NKO) statistički značajno i za uzorak FT, koji umesto izopropanola kao kosurfaktant sadrži Transcutol P. Stoga, statistički značajno smanjenje SCH kod ispitanika, nakon primene mikroemulzije FT, može biti posledica prisustva higroskopskog kosurfaktanta (Transcutol P) u formulaciji. Već je pokazano da penetracija ovog amfifila u kožu može dovesti do dehidracije usled zamene molekula vode u SC molekulima Transcutola P [176]. U slučaju mikroemulzije sa etoksilovanim surfaktantom (FPAc), smanjenje SCH je veoma malo, i nije statistički značajno ($p = 0,364$). Imajući u vidu isti kvantitativni sastav uzoraka FL, FM i FP, kao i da je u ispitivanim uzorcima ista koncentracija izopropanola, ovi rezultati su nedvosmisleno posledica različitog tipa surfaktanta koji je korišćen za formulaciju mikroemulzija.

Naime, hidroksilne grupe saharoznih estara imaju sposobnost da grade jače vodonične veze sa molekulima vode, dok su ove veze slabije sa atomom kiseonika koji je prisutan u molekulu polietilenglikola etoksilovanih surfaktanta [249], što može objasniti intenzivniju dehidraciju kože nakon nanošenja mikroemulzija na bazi saharoznih estara. Ova zapažanja su veoma značajna, s obzirom da smanjena hidratacija kože može doprineti poboljšanju dermalne/transdermalne isporuke lekovitih supstanci.



Slika 4.39. In vivo procena bezbednosnog profila mikroemulzija – procentna promena vrednosti A) hidratacije stratum corneum-a (SCH), B) eritema indeksa (EI), i C) transepidermalnog gubitka vode (TEGV), nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalna merenja, za odabrane placebo formulacije, netretiranu kontrolu bez okluzije (NKBO) i netriranu kontrolu pod okluzijom (NKO). A) ### $p < 0,001$ nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalnu vrednost; * $p < 0,001$ % promene SCH placebo mikroemulzija u odnosu na NKBO; *** $p < 0,001$ % promene SCH placebo mikroemulzija u odnosu na NKO; B) # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalnu vrednost; ** $p < 0,01$ % promene EI placebo mikroemulzija u odnosu na NKBO; ** $p < 0,01$ % promene EI placebo mikroemulzija u odnosu na NKO; C) # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalnu vrednost; * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ % promene TEGV placebo mikroemulzija u odnosu na NKBO. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SD.**

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da formulacije FL i FM imaju povoljan bezbednosni profil, koji ne zavisi od dužine ugljovodoničnog lanca, dok uzorci FP i FT imaju određen iritacioni potencijal. Naime, u slučaju nanošenja ove dve mikroemulzije (FP i FT), kod humanih ispitanika, vrednosti EI su značajno povećane ukoliko se uporede izmerene vrednosti nakon skidanja komorica u odnosu na početne vrednosti ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, respektivno). Takođe, za iste formulacije je i vrednost TEGV statistički značajno povećana u poređenju sa bazalnim vrednostima ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, respektivno), što verovatno ukazuje na promene u barijernoj funkciji kože. Treba istaći da promena u vrednosti TEGV za mikroemulzije FL i FM nije statistički značajna (**Slika 4.39C**). Poznato je da okluzija može da dovede do povećanja TEGV [250], što je i potvrđeno u našoj studiji gde je statistički značajno povećanje TEGV pokazano za NKO ($p < 0,05$). Povećanje vrednosti TEGV nakon primene mikroemulzija sa etoksilovanim surfaktantima je u skladu sa rezultatima Bárány i saradnika [251]. Sa druge strane, dobijeni rezultati za parametar TEGV su u skladu sa činjenicom da, za razliku od polisorbata, saharozni estri ne uklanjaju masni film sa površine kože i ne dovode do denaturacije proteina [79].

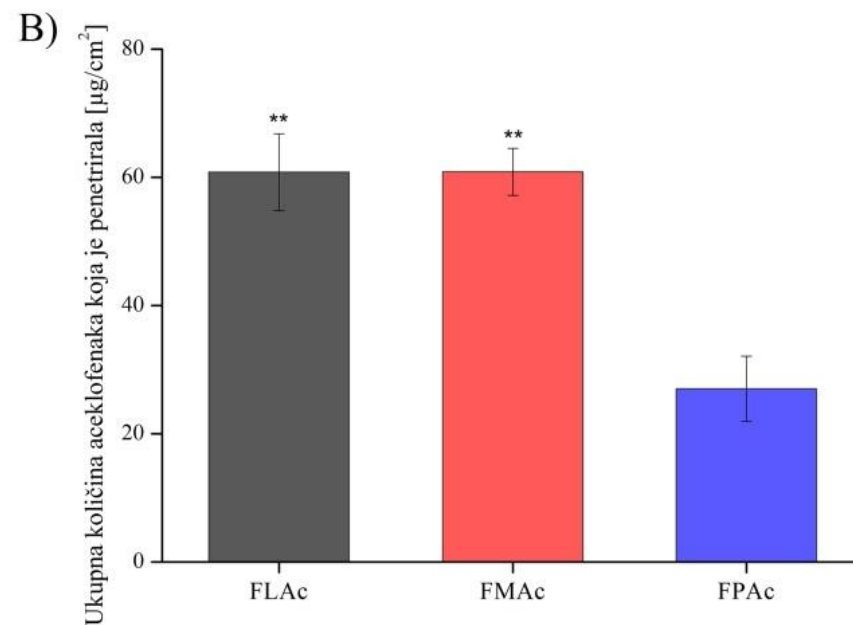
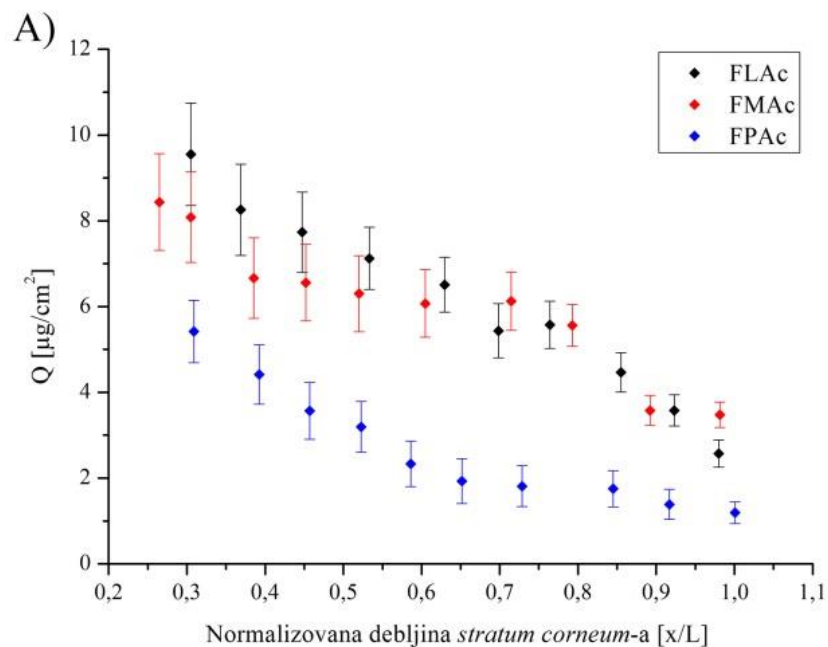
Potpuno neočekivano, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da mikroemulzija FT (koja kao surfaktant sadrži saharozni estar, a kao kosurfaktant Transcutol P) ima najveći potencijal da dovede do iritacije kože, što je pokazano značajnim promenama u vrednostima svih ispitivanih parametara: TEGV ($p < 0,01$ u odnosu na bazalnu vrednost i NKBO), EI ($p < 0,01$ u odnosu na bazalne vrednosti, NKO i NKBO), i SCH ($p < 0,001$ u odnosu na bazalne vrednosti, NKO i NKBO).

Uzimajući u obzir rezultate ove studije, odabrane mikroemulzije zasnovane na saharoznim estrima (SL i SM) imaju zadovoljavajući bezbednosni profil, što ukazuje na bolju podnošljivost mikroemulzija zasnovanih na nejonskim surfaktantima prirodnog porekla, u odnosu na sintetičke etoksilovane surfaktante, kao što je polisorbit 80. Interesantno, nakon nanošenja formulacije FT, koža ispitanika je više oštećena u poređenju sa primenom formulacija FL i FM. Ovo ukazuje da je izopropanol kao surfaktant prihvatljiv, a da Transcutol P deluje negativno na kožnu barijeru, odnosno da nakon nanošenja mikroemulzija koje kao kosurfaktant sadrže ovaj penetracioni inhenser dolazi do iritacionog odgovora.

4.4.4. *In vivo* ispitivanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka – metoda sa trakama (engl. *tape stripping method*)

Slika 4.40A prikazuje količinu aceklofenaka koja je penetrirala nakon oslobađanja iz ispitivanih formulacija u funkciji normalizovane debljine SC. ANOVA ukazuje da između ove tri formulacije postoji statistički značajna razlika u ukupnoj količini aceklofenaka koja penetrira u SC ($F(2, 6) = 15,240$; $p = 0,004$), kao što je prikazano na **Slici 4.40B**.

Poređenjem dobijenih penetracionih profila, može se zaključiti da je količina lekovite supstance koja penetrira u SC značajno veća u slučaju obe formulacije mikroemulzija zasnovanih na saharoznim estrima u odnosu na sistem FPAc ($p < 0,01$ za oba poređenja, tj. i u odnosu na FLAc i na FMAc). Kao što je već rečeno, ni koncentracioni gradijent, ni termodinamička aktivnost, nisu uzroci ovog fenomena, s obzirom da je koncentracija aceklofenaka u ispitivanim uzorcima ista (2% *m/m*), i da analiza uzoraka AFM i polarizacionim mikroskopom nije ukazala na postojanje vidljivih kristala leka. Shodno tome, može se pretpostaviti da saharozni estri u uzorcima FLAc i FMAc doprinose poboljšanju penetracije aceklofenaka u SC. Ovi rezultati su u saglasnosti sa pretpostavkama u literaturi da saharozni estri interaguju sa lipidima SC [168, 176], ali i sa našim rezultatima dobijenim u *Langmuir*-ovom monosloju (poglavlje 4.1). Stoga, u skladu sa rezultatima prve faze ove doktorske disertacije, kao i u skladu sa smanjenjem SCH (poglavlje 4.4.3), ova doktorska disertacija nedvosmislene ukazuje da prisustvo saharoznih estra povećava fluidnost lipida SC, te samim tim dovodi i do povećanja penetracije aceklofenaka nakon primene mikroemulzija sa saharoznim estrima na koži humanih dobrovoljaca. Stoga, rezultati dobijeni metodom sa trakama u kombinaciji sa *in vitro* profilima brzine oslobađanja (poglavlje 4.4.1) ukazuju na prednost oba korišćena saharozna estra (SL i SM) u odnosu na polisorbit 80, u mikroemulzijama za dermalnu/transdermalnu isporuku aceklofenaka. Ono što je interesantno, kada se uporede penetracioni profili dobijeni za mikroemulzije FLAc i FMAc, naši rezultati nisu potvrdili prethodne navode o većoj penetracionoj efikasnosti surfaktanta sa C12-ugljovodoničnim lancem [252].

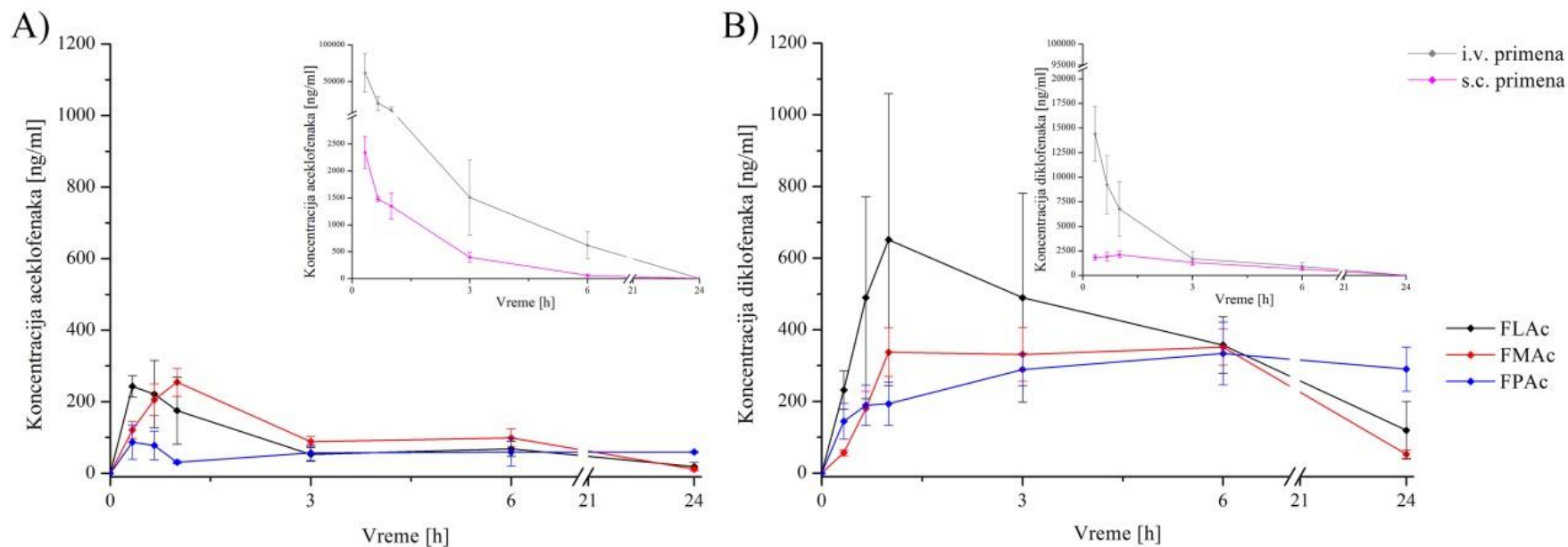


Slika 4.40. A) Komparativni prikaz penetracionih profila aceklofenaka iz mikroemulzija zasnovanih na saharoza lauratu (FLAc), saharoza miristatu (FMAc) i polisorbatu 80 (FPAc) dobijenih primenom metode sa trakama kroz stratum corneum debljine L ; B) Ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u stratum corneum. $**p < 0,01$ u poređenju sa formulacijom FPAc. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM.

4.4.5. *In vivo* ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka na pacovima Wistar soja

Na **Slici 4.41** je prikazan farmakokinetički profil koncentracije aceklofenaka u plazmi u funkciji vremena, nakon primene mikroemulzija na koži pacova Wistar soja. Interesantno, između različitih grupa pacova (grupe 1-3) nema statistički značajne razlike u vrednostima c_{max} ($F(2, 8) = 2,999$; $p = 0,107$) i PIK ($F(2, 8) = 0,806$; $p = 0,480$). U **Tabeli 4.15** je dat prikaz farmakokinetičkih parametara dobijenih na osnovu profila prikazanih na **Slici 4.41**. Nakon primene mikroemulzija FLAc i FMAc, dobijene su c_{max} vrednosti $275,57 \pm 109,49$ ng/ml i $281,31 \pm 76,76$ ng/ml, koje su postignute nakon $0,44 \pm 0,19$ i $0,74 \pm 0,32$ h. Naime, bikontinuirana struktura (poglavlje 4.3.2), i lokalizacija aceklofenaka (poglavlje 4.3.3) doprinose neposrednom kontaktu mikroemulzija sa kožom, omogućavajući direktno oslobađanje aceklofenaka, bez transfera lekovite supstance iz unutrašnje u spoljašnju fazu, i dalje na kožu, što predstavlja logično objašnjenje za relativno niske vrednosti t_{max} . U prilog tome idu i izmerene pH vrednosti formulacija (**Tabela 4.8**), koje ukazuju na prisustvo značajne frakcije nejonizovanog oblika aceklofenaka, koja se brzo rastvara u lipidima SC, ubrzavajući pasivnu difuziju, te stoga i penetraciju lekovite supstance kroz kožu [242, 243].

Međutim, uprkos bikontinuiranoj strukturi i niskoj pH vrednosti, u slučaju mikroemulzije zasnovane na polisorbatu 80 (FPAc), transdermalna resorpcija je odložena ($c_{max} = 150,23 \pm 69,74$ ng/ml, $t_{max} = 2,41 \pm 2,70$ h). Ovi rezultati, u skladu sa *in vitro* profilima brzine oslobađanja (**Slika 4.38**), daju potvrdu da je dermalna/transdermalna isporuka aceklofenaka uslovljena strukturom surfaktanta koji je korišćen za izradu mikroemulzija. Takođe, kada se uporede *in vivo* farmakokinetički profili sa *in vivo* penetracionim profilima (**Slika 4.40**) uočava se sličan trend, što dodatno potvrđuje da saharozni estri deluju kao penetracioni inhenseri, ističući njihovu prednost u odnosu na etoksilovane surfaktante u formulaciji mikroemulzija namenjenih za primenu na koži.



Slika 4.41. A) Farmakokinetički profili aceklofenaka (koncentracija u plazmi–vreme) nakon primene mikroemulzija zasnovanih na saharoza lauratu (FLAc), saharoza miristatu (FMAc) i polisorbatu 80 (FPAc) na pacovima Wistar soja. Umetnuti grafik: Farmakokinetički profili aceklofenaka (koncentracija u plazmi–vreme) nakon i.v. i s.c. primene rastvora aceklofenaka. B) Farmakokinetički profili diklofenaka (koncentracija u plazmi–vreme) nakon primene mikroemulzija zasnovanih na saharoza lauratu (FLAc), saharoza miristatu (FMAc) i polisorbatu 80 (FPAc) na pacovima Wistar soja. Umetnuti grafik: Farmakokinetički profili diklofenaka (koncentracija u plazmi–vreme) nakon i.v. i s.c. primene rastvora aceklofenaka.

Kao što je već rečeno u uvodu ove doktorske disertacije, diklofenak predstavlja glavni metabolit aceklofenaka kod pacova [37]. Nakon primene mikroemulzija u grupama 1-3, koncentracije diklofenaka u krvi su više u odnosu na koncentracije aceklofenaka. Takođe, kao što se vidi u **Tabeli 4.15**, PIK vrednosti za farmakokinetičke profile diklofenaka su oko tri puta više u odnosu na PIK vrednosti aceklofenaka nakon s.c. injekcije rastvora aceklofenaka. Međutim, ukoliko se uporede PIK vrednosti aceklofenaka i diklofenaka (**Tabela 4.15**) nakon lokalne i s.c. primene, može se zaključiti da je metabolizam aceklofenaka više izražen nakon lokalne primene, što je u skladu sa prisustvom enzima esteraza u epidermalnim ćelijama i oko folikula dlake u dermisu pacova [38]. Brz pad koncentracije aceklofenaka nakon i.v. i s.c. primene rastvora aceklofenaka (umetnute **Slike 4.41A i B**), ukazuje na brzu dispoziciju i eliminaciju. Interesantno, slične vrednosti vremena polueliminacije ($t_{1/2}$) su dobijene nakon i.v. i s.c. primene ($2,77 \pm 1,53$ h i $4,00 \pm 0,08$ h, respektivno). Treba napomenuti da se vrednost $t_{1/2}$ nakon lokalne primene mikroemulzija ne može precizno izračunati iz dobijenih rezultata, s obzirom da se resorpcija aceklofenaka u značajnoj meri preklapa sa eliminacijom. Shodno tome, u ovom slučaju treba uzeti u obzir *flip flop* kinetički model, u kome je poluvreme procesa resorpcije duže od poluvremena procesa eliminacije. Prilikom ovakve kinetike, lek je u fazi eliminacije, ali se i dalje resorbuje, što onemogućava precizno računanje $t_{1/2}$ [192].

Apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka (F_{abs}) iz svih ispitivanih mikroemulzija je niža od 5% (**Tabela 4.15**), što je u skladu sa niskim vrednostima PIK-a i F_{abs} ostalih NSAIL primenjenih perkutano [7, 10, 253-257]. Takođe, vrednosti F_{abs} nakon supkutane primene su veoma niske (**Tabela 4.15**). Ako se uporede izračunate vrednosti relativne biološke raspoloživosti (F_{rel}) za aceklofenak (lokalna naspram supkutane primene), F_{rel} vrednosti su više od 30%, što ukazuje da, nakon primene mikroemulzija na bazi saharoznih estara na koži pacova, aceklofenak uspešno penetrira kroz SC i prolazi vijabilni epidermis i dermis. Dobijene niske vrednosti F_{abs} ukazuju da se aceklofenak i diklofenak verovatno akumuliraju i difunduju u dublja tkiva nakon primene na koži, pre nego u sistemsku cirkulaciju.

Tabela 4.15. Farmakokinetički parametri izračunati iz profila koncentracija u plazmi-vreme.

	Put primene				
	Lokalno			Supkutano	Intravenski
	FLAc	FMAc	FPAc		
c_{max} [ng/ml]	275,57 ± 109,49	281,31 ± 76,76	150,23 ± 69,74	2341,74 ± 593,72	69231,37 ± 68716,47
t_{max} [h]	0,44 ± 0,19	0,74 ± 0,32	2,41 ± 2,70	0,33 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PIK ₀₋₂₄ [ngh/ml]	1368,77 ± 619,58	1762,56 ± 656,55	1118,65 ± 838,83	4557,54 ± 1360,63	76431,63 ± 72634,09
F_{abs} [%]	1,82	2,35	1,49	6,08	/
F_{rel} [%]	30,62	39,43	25,03	/	/
c_{max}^* [ng/ml]	684,08 ± 676,14	369,12 ± 131,91	371,05 ± 139,31	2374,11 ± 723,42	14408,96 ± 5613,66
t_{max}^* [h]	2,67 ± 2,89	4,00 ± 2,45	9,75 ± 9,60	0,75 ± 0,32	0,33 ± 0,00
PIK _{0-24}^*} [ngh/ml]	7051,88 ± 3378,72	5465,67 ± 1755,88	7169,57 ± 3177,83	14245,90 ± 5139,21	39633,45 ± 26878,04
F_{abs}^* [%]	7,39	6,35	7,28	16,52	/
F_{rel}^* [%]	45,66	39,20	44,95	/	/

c_{max} , maksimalna koncentracija aceklofenaka; t_{max} , vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije aceklofenaka; PIK, ukupna površina ispod krive koncentracije aceklofenaka; F_{abs} , apsolutna biološka raspoloživost; F_{rel} , relativna biološka raspoloživost (transdermalna naspram supkutane primene); c_{max}^* , maksimalna koncentracija diklofenaka; t_{max}^* , vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije diklofenaka; PIK*, ukupna površina ispod krive koncentracije diklofenaka; F_{abs}^* , apsolutna biološka raspoloživost ukupne koncentracije aceklofenaka i diklofenaka; F_{rel}^* , relativna biološka raspoloživost ukupne koncentracije aceklofenaka i diklofenaka (transdermalna naspram supkutane primene). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

Kienzler i saradnici [254] su ukazali da intraartikularna tkiva mogu biti rezervoari za lokalno primenjen NSAIL, ističući da primena NSAIL na koži može obezbediti visoke lokalne koncentracije u skeletno-mišićnom sistemu, bez dostizanja značajnih nivoa u sistemskoj cirkulaciji. Iako svi ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na prednost mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije na bazi etoksilovanih surfaktanata, neophodna su dalja istraživanja sa ciljem merenja koncentracije aceklofenaka na ciljnom mestu delovanja.

5. ZAKLJUČAK

5.1. Prva faza eksperimentalnog rada

Na osnovu prve faze eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći **zaključci o termodinamičkom i faznom ponašanju saharoznih estara i lipida SC na međufazi voda/vazduh, kao i o proceni uticaja saharoznih estara na fluidnost intercelularnog lipidnog matriksa SC:**

- Saharozni estri (SL i SM) modifikuju fizičko-hemijske osobine međupovršine voda/vazduh, tj. saharozni estri, kao amfifilni molekuli, imaju tendenciju da se adsorbuju i orijentišu na međupovršini. Površinska aktivnost saharoznih estara zavisi od dužine ugljovodoničnog lanca: za razliku od SL, proces adsorpcije SM na međufazu voda/vazduh nije uslovljen samo difuzijom, ukazujući da intermolekulske interakcije i sile kohezije između adsorbovanih molekula imaju važnu ulogu u adsorpcionoj kinetici.

- Površinska aktivnost saharoznih estara je potvrđena i nanošenjem rastvora surfaktanta u hloroformu na visokoprečišćenu vodu kao subfazu – uprkos visokoj rastvorljivosti u vodi, molekuli ostaju delimično zarobljeni na međupovršini voda/vazduh. U slučaju oba korišćena saharozna estra, nagib π -A izoterme je veoma mali što dovodi do zaključka da su oba saharozna estra u LE stanju na međufazi, i da kompresijom ne mogu da dostignu LC stanje, tj. stanje visoke uređenosti. IRRA spektri monosloja saharoznih estara na visokoprečišćenoj vodi su potvrdili LE stanje i SL i SM, sa talasnim dužinama $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ pri svim vrednostima površinskog pritiska.

- π -A izoterma SC lipida na visokoprečišćenoj vodi kao subfazi ima osobine karakteristične za kondenzovane filmove bez postojanja faznih prelaza, a asimetrične vibracije CH_2 grupa u rangu $2918\text{-}2919 \text{ cm}^{-1}$ na IRRA spektru dovode do zaključka da su lipidi SC u LC stanju čak i pri niskim vrednostima površinskog pritiska, usled gustog pakovanja na međupovršini voda/vazduh. Na osnovu IRRA spektara smeša SC lipida sa deuterisanom i protonovanom SA došli smo do zaključka da su masne kiseline više uređene u odnosu na molekule ceramida u monosloju intercelularnih lipida SC, dajući potvrdu da su ceramidi u najvećem stepenu odgovorni za fleksibilnost SC, te da je upravo ova fleksibilnost neophodna kako bi se održala

normalna funkcija kožne barijere u različitim uslovima i pri delovanju spoljašnjih faktora.

- Pomeranje π -A izoterme SC lipida ka višim vrednostima površine po molekulu pri svim vrednostima površinskog pritiska kada se kao subfaza koriste vodeni rastvori saharoznih estara u poređenju sa visokoprečišćenom vodom, i dobijene bliske vrednosti pritiska kolapsa za sve π -A izoterme, ukazuju da saharozni estri difunduju u monosloj SC lipida, te da je povećanje površine po molekulu, bar delimično, posledica promene orijentacije lipofilnog dela molekula lipida SC nakon penetracije saharoznih estara. Shodno tome, fluidizacija lipida SC na međufazi voda/vazduh izazvana penetracijom saharoznih estara ukazuje da saharozni estri mogu da deluju kao penetracioni inhenseri, te da utiču na fluidnost intercelularnih lipida SC.

- Iako je ekspanzioni uticaj saharoznih estara na monosloj SC lipida ispoljen u slučaju kada su u subfazi prisutni i SL i SM, sa povećanjem broja CH_2 jedinica, za datu vrednost površinskog pritiska, izoterma se pomera ka višim prosečnim površinama po molekulu, na osnovu čega se može doneti zaključak da saharozni estar sa dužim ugljovodoničnim lancem (SM) ima veću površinsku aktivnost, usled većeg uticaja na prosečnu površinu po molekulu.

- Na osnovu sveobuhvatne procene smeša saharoznih estara sa lipidima SC može se zaključiti da se saharozni estri i SC lipidi delimično mešaju i formiraju neidealni monosloj na međufazi voda/vazduh. Pomeranje π -A izoterme SC lipida ka većim površinama po molekulu u smeši sa SL i SM, uz smanjenje nagiba izoterme, ukazuje na fluidizirajući efekat saharoznih estara na lipide SC. Porast vrednosti $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ od $\sim 2919 \text{ cm}^{-1}$ (LC stanje monosloja lipida SC) do $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ (LE stanje saharoznih estara) na IRRA spektrima različitih smeša saharoznih estara i lipida SC potvrđuje snažan uticaj saharoznih estara na uređenu strukturu lanaca lipida SC (tzv. *disordered effect*). Vizuelizacija monosloja različitih smeša saharoznih estara i SC lipida potvrđuje fluidizirajući efekat saharoznih estara na lipide SC, čak i pri malom udelu saharoznih estara. BAM mikrografije ukazuju da je ovaj efekat manje izražen u slučaju saharoznog estra sa kraćim ugljovodoničnim lancem.

• U smeši SC lipida sa SM, eksperimentalne MMA vrednosti više odstupaju od idealnih vrednosti, u poređenju sa vrednostima dobijenim za smeše SC lipidi-SL. Pri vrednostima površinskog pritiska od 10 mN/m, vrednosti ΔG_{ex} su skoro dva puta negativnije za smeše SC lipida sa saharoznim estrom koji ima duži ugljovodonični lanac (SM). Ovi rezultati dovode do zaključka da su van der Valsove privlačne sile između hidrofobnih delova SC lipida i SM jače u odnosu na interakcije SC lipida sa SL, usled dužeg lanca SM, što dovodi do formiranja monosloja veće stabilnosti. Ovo je potvrđeno i analizom IRRA spektara očigledno je da SM ima veći uticaj na vrednost talasnih dužina $\nu_{as}CH_2$, ukazujući na intenzivniji fluidizirajući efekat C14-saharoznog estra pri svim molarnim udelima u smeši sa SC lipidima.

• Poklapanje $\nu_{as}CH_2$ frekvencija dobijenih snimanjem IRRA spektara za monosloj 25% CerAS/Chol/SA + 75% SM i 25% CerAS/Chol/SA-d35 + 75% SM, ukazuje da su acil lanci CerAS i SM slične orijentacije, što potvrđuje da su ovi molekuli u istoj fazi na međupovršini voda/vazduh. Međutim, ukoliko se posmatraju IRRA spektri dobijeni za monosloj 25% CerAS/Chol/SA + 75% SL i 25% CerAS/Chol/SA-d35 + 75% SL, talasne dužine su nešto više u slučaju korišćenja deuterisane SA, što ukazuje da je SL u drugoj fazi (tj. faze su razdvojene) i shodno tome, tokom kompresije molekuli su lakše desorbovani sa površine.

Uzimajući sve ovo u obzir, može se zaključiti da: **i) saharozni estri penetriraju u sloj lipida SC, ii) da ispoljavaju koncentraciono zavisian fluidizirajući efekat na acil lance lipida SC, odnosno, da povećavaju neuređenost lanaca masnih kiselina i ceramida koji predstavljaju osnovne komponente SC, kao i iii) da je ovaj efekat više izražen u slučaju saharoznog estra sa dužim ugljovodoničnim lancem, usled jačeg uticaja SM na intermolekulske veze u monosloju.** Međutim, ne treba zaboraviti da slabiji uticaj SL može biti delom i posledica desorpcije molekula sa međupovršine voda/vazduh tokom kompresije monosloja. Pri koncentraciji saharoznih estara < 75%, ovi molekuli interaguju sa lipidima SC privlačnim silama, dok u slučaju viših koncentracija u smeši sa lipidima SC, prevladavaju sterne odbojne sile koje dovode do nastanka termodinamički nestabilnog monosloja na granici faza. Sve ovo nedvosmisleno dovodi do zaključka da saharozni estri mogu da povećaju dermalnu/transdermalnu isporuku lipofilnih lekovitih supstanci kroz interkorneocitni prostor površinskog sloja kože usled povećanja neuređenosti/fluidnosti intercelularnih

lipida SC, kao i da ovaj efekat zavisi od dužine ugljovodoničnog lanca surfaktanta, ukazujući na važnost pažljivog razmatranja strukture surfaktanta prilikom formulacije preparata namenjenih za primenu na koži.

5.2. Druga faza eksperimentalnog rada

Na osnovu druge faze eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći **zaključci o potencijalu saharoznih estara različite dužine ugljovodoničnog lanca da formiraju mikroemulzije, o proceni efikasnosti D-optimalnog dizajna smeše u predviđanju faznog ponašanja sistema sa saharoznim estrima, kao i o promenama u nanostrukтури mikroemulzija različitog sastava:**

- Saharozni estri (SL, SM, SP i SS) ne mogu samostalno da dovedu do smanjenja međupovršinskog napona do vrednosti neophodnih za spontano formiranje mikroemulzija, te je za formiranje mikroemulzija sa saharoznim estrima neophodno korišćenje kosurfaktanta. SS se ne meša sa izopropanolom pri odabranim eksperimentalnim uslovima (odnos saharozni estar-izopropanol 1:1, sobna temperatura), te samim tim ne formira mikroemulzije predloženog sastava.

- Značajna razlika u veličini mikroemulzione oblasti između sistema sa SL, SM i SP, uprkos istoj HLB vrednosti ovih surfaktanta, dovodi do zaključka da hemijska struktura surfaktanta ima izražen uticaj na fazno ponašanje ispitivanog sistema izopropilmiristat/saharozni estar-izopropanol/visokoprečišćena voda. Sterne sile između hidrofilnih glavenih grupa nemaju uticaj na veličinu mikroemulzione oblasti, dok fleksibilnost ugljovodoničnog dela molekula ima direktan uticaj na pakovanje molekula surfaktanta na međufazi voda/ulje. Shodno tome, može se zaključiti da se kapacitet surfaktanta za emulgovanje smanjuje sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca saharoznog estera – surfaktanti sa dužim ugljovodoničnim nizom u okviru homologne serije molekula (npr. SP) čine međupovršinu rigidnijom, ograničavajući fleksibilnost međusloja, dok surfaktanti sa kraćim ugljovodoničnim lancem (npr. SL i SM) mogu da vežu veću količinu vode, jer je formirani međupovršinski film manje osetljiv na dodavanje vode.

- Nešto veća efektivnost i šira mikroemulziona površina za sistem koji kao surfaktant sadrži SM u odnosu na sistem sa SL dovodi do zaključka da je strukturna kompatibilnost hidrofobnog dela surfaktanta i ulja izuzetno važan parametar koji ima

direktan uticaj na međusobno mešanje, kao i na penetraciju molekula ulja u film surfaktanta. Naime, ista dužina ugljovodoničnog lanca SM i izopropilmiristata omogućava da se, izopropilmiristat, kao mali molekul, inkorporira u međupovršinski film, što dovodi do povećanja fleksibilnosti i dodatnog smanjenja međupovršinskog napona.

- Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je D-optimalni dizajn smeše efikasan način za brzo i ekonomično dobijanje granica mikroemulzione oblasti, s obzirom da su položaj i veličina izotropnih regiona dobijeni predviđanjem matematičkih modela veoma slični mikroemulzionim oblastima koje su dobijene klasičnim eksperimentalnim pristupom metodom titracije vodom.

- Primenom indirektnih i direktnih fizičko-hemijskih tehnika pokazano je da, sa kontinuiranim dodatkom vodene faze, dolazi do strukturnih promena koje se dešavaju u izotropnom regionu duž odabrane linije razblaženja surfaktant-kosurfaktant/uljana faza 9/1, te da oba ispitivana sistema (izopropilmiristat/saharoza laurat-izopropanol/visokoprečišćena voda i izopropilmiristat/saharoza miristat-izopropanol/visokoprečišćena voda) prelaze iz V/U u U/V sistem preko bikontinuiranih mikroemulzija.

- Povećanje dužine ugljovodoničnog lanca dovodi do povećanja udela vodene faze pri kojoj dolazi do pojave perkolacionog praga, tj. do prelaska sistema iz V/U u bikontinuirane mikroemulzije, usled jačih privlačnih inter-kapljičnih interakcija u sistemu sa saharoznim estrom kraćeg ugljovodoničnog lanca (SL). Interakcija između kapi zavisi od interpenetracije međupovršinskih slojeva koji dovode jezgro vodenih kapi u neposredan kontakt, te se može izvesti konačan zaključak da je razlika u dužini ugljovodoničnih lanaca SL i SM glavni faktor koji je odgovoran za veći stepen preklapanja u slučaju C12-saharoznog estra. Usled kraćeg lanca, SL ima veći afinitet za vodenu fazu u poređenju sa SM, te stoga ima veći kapacitet za vezivanje molekula vode. Zasnivano na tome, hidrofilne grupe C12-saharoznog estra su u većem stepenu izložene molekulima vode, te samim tim intenzivnije modifikuju termalne osobine molekula vode, dovodeći do toga da se u sistemu sa SL strukturna promena iz bikontinuirane u U/V mikroemulzije dešava pri višem ukupnom sadržaju vode.

- S obzirom da mikrografije dobijene primenom AFM potvrđuju strukturnu inverziju iz V/U u U/V mikroemulzije, preko bikontinuirane strukture, može se zaključiti da je AFM korisna tehnika za direktnu vizuelizaciju morfologije i kapljičnih i bikontinuiranih mikroemulzija.

Rezultati drugog eksperimentalnog dela dovode do konačnog zaključka da je **dužina ugljovodoničnog lanca saharoznog estera važan faktor koji određuje količinu vode koja može biti solubilizovana u sistemu, i stoga veličinu mikroemulzione oblasti.** Ukoliko se uzme u obzir razlika u strukturi saharoznih estera u homolognom nizu, može se izvesti zaključak da **povećanje broja ugljenikovih atoma u lipofilnom delu surfaktanta dovodi do narušavanja pakovanja surfaktanata na međufazi vodena/uljana faza, te da ima negativan uticaj na veličinu mikroemulzione oblasti.** Na osnovu merenja električne provodljivosti može se zaključiti da u sistemu sa saharoznim estrima postoji perkolacioni prag, i u skladu sa ostalim rezultatima, nedvosmisleno ukazuje na strukturnu inverziju u sistemu sa porastom udela vodene faze: V/U mikroemulzije su detektovane pri udelu vode $< 15\%$ *m/m*, U/V mikroemulzije pri udelu vode $> 60\%$ *m/m*, i region između kapljičnih struktura odgovara bikontinuiranim mikroemulzijama. Pored toga, rezultati ovog dela doktorske disertacije direktno ukazuju na **opravdanost primene D-optimalnog dizajna smeše u cilju predviđanja granica mikroemulzione oblasti**, kao i na efikasnost AFM u vizuelizaciji kompleksne unutrašnje strukture izotropnih sistema.

5.3. Treća faza eksperimentalnog rada

Na osnovu treće faze eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći **zaključci o strukturi odabranih mikroemulzija, površinskoj aktivnosti aceklofenaka, interakciji između aceklofenaka i saharoznih estera, kao i o lokalizaciji aceklofenaka u odabranim mikroemulzijama:**

- Povećanje udela vodene faze dovodi do zamućenja sistema i/ili pojave taloga, dok su mikroemulzije zasnovane na SL i SM sa udelom vode od 35% *m/m* izabrane kao optimalne formulacije za inkorporaciju aceklofenaka u koncentraciji 2% *m/m*.

- Dobijene vrednosti pH i električne provodljivosti ukazuju da je najveći udeo lekovite supstance u mikroemulzijama u nejonizovanom obliku. Na osnovu rezultata indirektnih fizičko-hemijskih tehnika, kao i vizuelizacije uzoraka primenom AFM,

može se zaključiti da su uzorci sa udelom vodene faze od 35% *m/m* bikontinuirane mikroemulzije, i da njihova struktura nije značajno promenjena nakon solubilizacije aceklofenaka.

- π - t izoterme su pokazale da je aceklofenak, sa svojom karboksilnom grupom kao hidrofilnom glavom, i dve fenil grupe kao lipofilnim delom molekula, površinski aktivan, kao i da je površinska aktivnost ovog molekula koncentraciono zavisna.

- Prisustvo aceklofenaka u subfazi ima snažan uticaj na π - A izoterme oba ispitivana saharozna estara (SL i SM) – povećanje prosečne površine po molekulu pri određenoj vrednosti površinskog pritiska, kao i razlika u konačnoj vrednosti površinskog pritiska nakon kompresije, dovode do zaključka da su pored molekula saharoznih estara, i molekuli aceklofenaka prisutni na međupovršini voda/vazduh. Nakon penetracije u monosloj saharoznih estara, jedan deo molekula aceklofenaka ostaje na međufazi do kraja kompresije, što dovodi do zaključka da molekuli aceklofenaka popunjavaju prazan prostor između ugljovodoničnih lanaca saharoznih estara koji su u LE stanju na međusloju voda/vazduh, interagujući međusobno privlačnim silama.

- Više vrednosti prosečne mase po molekulu u slučaju SM pri određenim vrednostima površinskog pritiska, ukazuju na veći stepen rastvaranje SL u subfazi, dok prisustvo molekula aceklofenaka na međupovršini smanjuje desorpciju SL. Nasuprot tome, količina adsorbovanog aceklofenaka je nezavisna od njegove koncentracije u subfazi kada se na površinu subfaze nanese C14-saharozni estar. U slučaju oba korišćena saharozna estara, monosloj saharoznog estara je stabilniji kada su molekuli aceklofenaka prisutni u subfazi pri svim ispitivanim vrednostima površinskog pritiska, a veće smanjenje površinskog pritiska u studiji stabilnosti u slučaju SL, ukazuje na veći stepen desorpcije C12-molekula saharoznog estara sa površine tečne faze, kao i na manju stabilnost monosloja SL-aceklofenak.

- Na osnovu EPR spektara može se zaključiti da dodatak aceklofenaka ima snažan uticaj na rigidnost/fluidnost međufaznog filma. Povećanje mobilnosti probe 5-DSA u mikroemulzijama sa aceklofenakom, ukazuje na povećanje fluidnosti dela međupovršinskog filma koji se nalazi bliže hidrofilnim glavama surfaktanta kada je u sistem inkorporirana lekovita supstanca. Nasuprot tome, 12-DSA je u većem stepenu

imobilisana u mikroemulzija sa aceklofenakom. Stoga se može zaključiti da molekuli aceklofenaka doprinose većoj mobilnosti u regionu oko petog ugljenikovog atoma gde se nalazi nitroksidni prsten 5-DSA, dok dva aromatična prstena lekovite supstance smanjuju pokretljivost dela membrane oko dvanaestog ugljenikovog atoma 12-DSA.

Na osnovu ovoga može se zaključiti da **kapacitet mikroemulzija za solubilizaciju aceklofenaka zavisi od nanostrukture koloidnih sistema**, tj. od tipa mikroemulzija. Aceklofenak je uspešno inkorporiran u bikontinuirane mikroemulzije sa saharoznim estrima u terapijskoj koncentraciji. **Molekuli aceklofenaka penetriraju u monosloj saharoznih estara na međufazi voda/vazduh**, i ne ostaju lokalizovani samo u neposrednoj blizini hidrofилnih glava. Dodatak aceklofenaka povećava stabilnost monosloja saharoznih estara na međufazi voda/vazduh. EPR tehnika je dala konačnu potvrdu da su **molekuli lekovite supstance u značajnom stepenu lokalizovani u membrani bikontinuiranih mikroemulzija**, gradeći međupovršinski film zajedno sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta.

5.4. Četvrta faza eksperimentalnog rada

Na osnovu četvrte faze eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci o bezbednosti/iritacionom potencijalu formulacija, uticaju saharoznih estara na povećanje dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka, kao i o farmakokinetici aceklofenaka i njegovog metabolita – diklofenaka:

- Tip i struktura surfaktanta su veoma važni faktori koji utiču na oslobađanje lekovite supstance iz mikroemulzija – u poređenju sa etoksilovanim surfaktantima saharozni estri povećavaju oslobađanje aceklofenaka iz mikroemulzija, i ovaj efekat zavisi od dužine ugljovodoničnog lanca.

- Rezultati HET-CAM testa ukazuju na umeren iritacioni potencijal formulacija sa saharoznim estrima. Na osnovu *in vivo* iritacione studije može se zaključiti da formulacije FL i FM, koje kao surfaktant sadrže SL, odnosno SM, a kao kosurfaktant izopropanol, imaju povoljan bezbednosni profil (tj. dobru podnošljivost), koji ne zavisi od dužine ugljovodoničnog lanca, dok uzorci FP (surfaktant polisorbit 80, kosurfaktant izopropanol) i FT (surfaktant SM, kosurfaktant Transcutol P) imaju

određen iritacioni potencijal, koji se može pripisati prisustvu polisorbata 80, odnosno Transcutola P, respektivno.

- Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da Transcutol P deluje negativno na kožnu barijeru.

- Rezultati ukazuju da prisustvo saharoznih estara povećava fluidnost lipida SC, te samim tim dovodi i do povećanja penetracije aceklofenaka nakon primene mikroemulzija sa saharoznim estrima na koži humanih dobrovoljaca. Rezultati dobijeni metodom sa trakama u kombinaciji sa *in vitro* profilima brzine oslobađanja ukazuju na prednost oba korišćena saharozna estra (SL i SM) u odnosu na polisorbat 80 kao surfaktant u mikroemulzijama za dermalnu/transdermalnu isporuku aceklofenaka.

- Kada se uporede penetracioni profili dobijeni za mikroemulzije zasnovane na SL i SM, naši rezultati nisu potvrdili literaturne navode o većoj *in vivo* penetracionoj efikasnosti surfaktanta sa C12-ugljovodoničnim lancem.

- Bikontinuirana struktura i međupovršinska lokalizacija aceklofenaka doprinose neposrednom kontaktu sa kožom, omogućavajući direktno oslobađanje aceklofenaka, bez transfera lekovite supstance iz unutrašnje u spoljašnju fazu, i dalje na kožu, što objašnjava relativno niske vrednosti t_{max} u farmakokinetičkoj studiji, dok je u slučaju mikroemulzija zasnovanih na polisorbatu 80, transdermalna apsorpcija odložena.

- Na osnovu relativne biološke raspoloživosti za aceklofenak (lokalna naspram supkutane primene), može se zaključiti da nakon primene mikroemulzija na bazi saharoznih estara na koži pacova, aceklofenak uspešno penetrira kroz SC i prolazi vijabilni epidermis i dermis, dok dobijene niske vrednosti apsolutne biološke raspoloživosti ukazuju da se aceklofenak i diklofenak verovatno akumuliraju i difunduju u dublja tkiva nakon primene na koži.

Na osnovu rezultata ovog dela doktorske disertacije može se zaključiti da je tip surfaktanta (i kosurfaktanta) važan faktor koji utiče na podnošljivost mikroemulzija, tj. na njihov iritacioni potencijal. Odabrane bikontinuirane mikroemulzije zasnovane na saharoznim estrima (SL i SM) imaju zadovoljavajući bezbednosni profil, što upućuje na **bolju podnošljivost mikroemulzija zasnovanih na nejonskim surfaktantima**

prirodnog porekla, u odnosu na sintetske etoksilovane surfaktante, kao što je polisorbat 80. Sličan trend je primećen analizom *in vitro* profila oslobađanja, *in vivo* penetracionih profila i *in vivo* studija farmakokinetike – **prisustvo saharoznih estara povećava brzinu i stepen oslobađanja i dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka.** Pored uticaja na oslobađanje aceklofenaka iz nosača, **saharozni estri povećavaju penetraciju i dermalnu/transdermalnu isporuku aceklofenaka u odnosu na etoksilovane surfaktante.** Međutim, mora se istaći da se nakon primene mikroemulzija u sistemske cirkulaciji ne dostižu visoke koncentracije, što može ukazati na efikasnost dermalne isporuke uz pojavu minimalnih sistemskih neželjenih efekata. U tom smislu, intraartikularna tkiva mogu biti rezervoari za lokalno primenjen aceklofenak, tj. lokalna primena mikroemulzija sa saharoznim estrima može da obezbedi visoke koncentracije aceklofenaka u dubljim tkivima, bez dostizanja značajnih nivoa leka u sistemske cirkulaciji, što za posledicu može imati potencijalne brojne koristi: efikasnost u terapiji bolesti skeletno-mišićnog sistema, uz izbegavanje sistemskih neželjenih efekata i presistemskog metabolizma.

5.5. Konačan osvrt i dalji koraci

Ukupno gledano, na osnovu prikazanih rezultata i činjenica navedenih u uvodu ove doktorske disertacije može se zaključiti da su uspešno razvijene biokompatibilne, nejonske mikroemulzije na bazi saharoznih estara za dermalnu isporuku aceklofenaka kod pacijenata sa osteoartritisom (uzimajući u obzir preporuke za terapiju reumatskih bolesti). Aceklofenak je, kao površinski aktivan molekul sa svoja dva aromatična prstena, lokalizovan u delu međupovršinskog filma bikontinuiranih mikroemulzija koji se nalazi u blizini ugljovodoničnih lanaca saharoznih estara, dok je njegova hidrofilna glava lokalizovana u blizini saharoznog dela molekula surfaktanta. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da saharozni estri deluju kao penetracioni inhenseri, povećanjem fluidnosti lipida SC, te samim tim mogu da povećaju dermalnu/transdermalnu isporuku lipofilnih lekovitih supstanci kroz interkorneocitni put površinskih slojeva kože. Prednost mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije na bazi etoksilovanih nejonskih surfaktanata je višestruka: pored bolje podnošljivosti, tj. boljeg bezbednosnog profila, veći stepen i brzina oslobađanja i dermalne/transdermalne isporuke aceklofenaka se postiže iz

mikroemulzija na bazi saharoznih estara, što potvrđuje pretpostavke o bezbednosti ovih surfaktanata kao i o njihovoj sposobnosti da deluju kao penetracioni inhenseri.

Iako svi ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na prednost mikroemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na mikroemulzije na bazi etoksilovanih surfaktanata, neophodna su dalja istraživanja kako bi se ispitala sudbina aceklofenaka nakon penetracije kroz SC. Naime, s obzirom da je apsolutna biološka raspoloživost nakon primene odabranih mikroemulzija veoma niska (< 5%), neophodno je pokazati da su lokalne koncentracije aceklofenaka u skeletno-mišićnom sistemu dovoljno visoke da bi se ispoljila efikasnost u smanjenju bola i ukočenosti u osteoartritisu, ali i da je usporen dalji tok degenerativnih promena na kostima i hrskavici.

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, osnovni preduslov za konačnu procenu efikasnosti ovih formulacija, namenjenih za dermalnu isporuku aceklofenaka, predstavlja istovremeno praćenje farmakokinetike i bihevioralnih promena koje se povezuju sa simptomima bolesti. U skladu sa raznovrsnošću efekata koje ispoljavaju NSAIL, razvijeni su brojni animalni modeli za prekliničko izučavanje patološkog procesa osteoartritisa. Animalni model osteoartritisa izazvan intraartikularnom injekcijom inhibitora metabolizma hondrocita, natrijum-monojodacetata, dovodi do hroničnog razvoja bolesti inhibicijom procesa glikolize. Ovako izazvan animalni model osteoartritisa ima tok sličan onom kod ljudi, omogućavajući razumevanje strukturnih promena, razvoja patologije, ali i proučavanje ponašanja životinja kao posledica inflamacije usled razvoja osteoartritisa. Stoga, animalni model osteoartritisa daje mogućnost za procenu efikasnosti formulacija namenjenih za primenu aceklofenaka na koži: praćenjem inhibicije zapaljenskog procesa merenjem nivoa citokina, praćenjem refleksnog odgovora na mehaničke stimuluse primenom *von Frey* filamenata, kao i praćenjem uticaja na zapaljenske i degenerativne promene histopatološkom analizom kolena pacova.

U skladu sa tim, naša istraživačka grupa je započela razvoj animalnog modela osteoartritisa na pacovima *Wistar* soja. Kako bi se odredila optimalna doza koja je dovoljna da dovede do razvoja hroničnog zapaljenskog procesa, osteoarthritis je izazvan intraartikularnom injekcijom natrijum-monojodacetata u desno koleno pacova *Wistar* soja (Vojna farma, Beograd, Srbija), u količini 1, 2 i 3 mg rastvorenih u 50 μ L

fiziološkog rastvora. Preliminarnim eksperimentom je pokazano da je optimalna doza natrijum-monodacetata koja dovodi do razvoja hroničnih degenerativnih promena 3 mg u 50 μ L fiziološkog rastvora. Stoga, konačni eksperimentalni protokol je uključio intraartikularnu injekciju natrijum-monodacetata (3 mg u 50 μ L fiziološkog rastvora), nakon čega je tok procesa inflamacije praćen merenjem dimenzija kolena pacova, merenjem sniženja nivoa citokina TNF- α u mekom tkivu oko zgloba primenom enzimskog imunoabsorpcionog testa (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay ELISA*; eBioscience), praćenjem osetljivosti pacova na mehaničke stimuluse primenom *von Frey* filamenata (Ugo Basile, Varese, Italija), a inflamatorne i degenerativne promene na hrskavici, zglobu i sinovijalnom tkivu su praćene histopatološkom analizom. Iako su koncentracije TNF- α bile nedovoljne za praćenje antiinflamatornog efekta ELISA testom, tj. u našem eksperimentu nije postignut limit kvantifikacije, uspešnost eksperimenta je pokazana primenom *von Frey* filamenata i histopatološkom analizom (u toku 28 dana nakon injektovanja natrijum-monodacetata). Dalji koraci ovog eksperimenta će uključiti praćenje uticaja hronične primene mikroemulzija sa aceklofenakom na sve ispitivane parametre, tj. na tok inflamatornih i degenerativnih promena. Jedino na taj način, možemo doneti konačne zaključke o efikasnosti odabranih mikroemulzija sa aceklofenakom u tretmanu simptoma osteoartritisa, kao i o potencijalu aceklofenaka da utiče na tok osteoartritisa.

6. LITERATURA

1. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pain Research* 2015; 8: 105-118.
2. Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease—presence and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 168-211.
3. Dwivedi AK, Gurjar V, Kumar S, Singh N. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Drug Discovery Today* 2015; 20: 863-873.
4. Kam P, So A. COX-3: Uncertainties and controversies. *Current Anaesthesia & Critical Care* 2009; 20: 50-53.
5. Baldo BA, Pham NH. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In *Drug Allergy*. Springer 2013; 319-342.
6. Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Current Medical Research and Opinion* 2005; 21: 1217-1226.
7. Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases. *Drugs* 2000; 60: 555-574.
8. Fanelli A, Ghisi D, Fanelli G. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in clinical practice: Managing gastric and cardiovascular risks. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis* 2013; 84: 98-101.
9. Álvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J et al. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65: 998-1005.
10. Barthel HR, Axford-Gatley RA. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis. *Postgraduate Medicine* 2010; 122: 98-106.
11. Singh JA, Saag KG, Bridges SL et al. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2016; 68: 1-26.
12. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013; annrheumdis-2013-204573.
13. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan M et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014; 22: 363-388.
14. Hochberg MC, Altman RD, April KT et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care & Research* 2012; 64: 465-474.
15. Jevsevar DS. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2013; 21: 571-576.
16. Pendleton A, Arden N, Dougados M et al. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Annals of the Rheumatic Diseases* 2000; 59: 936-944.
17. <http://ard.bmj.com/content/59/12/936.full> , Poslednji pristup: Mart 2017.
18. Ward MM, Deodhar A, Akl EA et al. American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and

- Treatment Network 2015 recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2016; 68: 282-298.
19. Braun Jv, Van den Berg R, Baraliakos X et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011; 70: 896-904.
 20. Hooten W, Timming R, Belgrade M et al. Assessment and management of chronic pain. Institute for Clinical Systems Improvement 2013; 106.
 21. Koes BW, van Tulder M, Lin C-WC et al. An updated overview of clinical guidelines for the management of non-specific low back pain in primary care. *European Spine Journal* 2010; 19: 2075-2094.
 22. Derry S, Conaghan P, Da Silva JAP et al. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *The Cochrane Library* 2016.
 23. Dooley M, Spencer CM, Dunn CJ. Aceclofenac. *Drugs* 2001; 61: 1351-1378.
 24. Jana S, Manna S, Nayak AK et al. Carbopol gel containing chitosan-egg albumin nanoparticles for transdermal aceclofenac delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014; 114: 36-44.
 25. Shakeel F, Faisal MS, Shafiq S. Comparative pharmacokinetic profile of aceclofenac from oral and transdermal application. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* 2009; 1: 013-017.
 26. Pavelka K. A comparison of the therapeutic efficacy of diclofenac in osteoarthritis: a systematic review of randomised controlled trials. *Current Medical Research and Opinion* 2012; 28: 163-178.
 27. Akimoto H, Yamazaki R, Hashimoto S et al. 4'-Hydroxy aceclofenac suppresses the interleukin-1-induced production of promatrix metalloproteinases and release of sulfated-glycosaminoglycans from rabbit articular chondrocytes. *European Journal of Pharmacology* 2000; 401: 429-436.
 28. Alvarez-Soria M, Herrero-Beaumont G, Moreno-Rubio J et al. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 16: 1484-1493.
 29. Syggelos S, Giannopoulou E, Gouvousis P et al. In vitro effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cytokine, prostanoid and matrix metalloproteinase production by interface membranes from loose hip or knee endoprostheses. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15: 531-542.
 30. Raza K, Kumar M, Kumar P et al. Topical delivery of aceclofenac: challenges and promises of novel drug delivery systems. *BioMed Research International* 2014; 2014.
 31. Brogden RN, Wiseman LR. Aceclofenac. *Drugs* 1996; 52: 113-124.
 32. Legrand E. Aceclofenac in the management of inflammatory pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2004; 5: 1347-1357.
 33. Mathy M, Deby G, Reginster J-Y et al. Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1beta, nitric oxide and prostaglandin E (2) production by human chondrocytes. 2002.
 34. Sanchez C, Mateus MM, Defresne M-P et al. Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The Journal of Rheumatology* 2002; 29: 772-782.

35. Henrotin Y, De Leval X, Mathy-Hartet M et al. In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators. *Inflammation Research* 2001; 50: 391-399.
36. Sharma G, Goyal H, Thakur K et al. Novel elastic membrane vesicles (EMVs) and ethosomes-mediated effective topical delivery of aceclofenac: a new therapeutic approach for pain and inflammation. *Drug Delivery* 2016; 1-11.
37. Noh K, Shin BS, Kwon K-i et al. Absolute bioavailability and metabolism of aceclofenac in rats. *Archives of Pharmacal Research* 2015; 38: 68-72.
38. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology* 2014; 88: 2135-2190.
39. Maulvi FA, Dalwadi SJ, Thakkar VT et al. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. *Powder Technology* 2011; 207: 47-54.
40. Park J-J, Meghani N, Choi J-S, Lee B-J. Development and evaluation of decorated aceclofenac nanocrystals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016; 143: 206-212.
41. Raj R, Mongia P, Ram A, Jain N. Enhanced skin delivery of aceclofenac via hydrogel-based solid lipid nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2015; 1-6.
42. Garg NK, Sharma G, Singh B et al. Quality by Design (QbD)-enabled development of aceclofenac loaded-nano structured lipid carriers (NLCs): An improved dermatokinetic profile for inflammatory disorder (s). *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 517: 413-431.
43. Isailović T, Đorđević S, Marković B et al. Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 105: 308-323.
44. Gaur PK, Mishra S, Aeri V. Formulation and evaluation of Guggul lipid nanovesicles for transdermal delivery of aceclofenac. *The Scientific World Journal* 2014; 2014.
45. Dasgupta S, Dey S, Choudhury S, Mazumder B. Topical delivery of aceclofenac as nanoemulsion comprising excipients having optimum emulsification capabilities: preparation, characterization and in vivo evaluation. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2013; 10: 411-420.
46. Gaur PK, Purohit S, Mishra S. Development of aceclofenac nanovesicular system using biomaterial for transdermal delivery: physical characterization, ex vivo, in vivo, and anti-inflammatory studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2013; 24: 2126-2141.
47. Patel D, Dasgupta S, Dey S et al. Nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for the topical delivery of aceclofenac: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Scientia Pharmaceutica* 2012; 80: 749-764.
48. Nasr M, Mansour S, Mortada ND, Elshamy A. Vesicular aceclofenac systems: a comparative study between liposomes and niosomes. *Journal of Microencapsulation* 2008; 25: 499-512.
49. Shakeel F, Baboota S, Ahuja A et al. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8: 191-199.

50. Yang J-H, Kim Y-I, Kim K-M. Preparation and evaluation of aceclofenac microemulsion for transdermal delivery system. *Archives of Pharmacal Research* 2002; 25: 534-540.
51. Prow TW, Grice JE, Lin LL et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63: 470-491.
52. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99: 21-50.
53. Roberts MS. *Dermal absorption and toxicity assessment*. CRC Press 2007.
54. Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* 2010; 141: 277-299.
55. Ghafourian T, Nokhodchi A, Kaialy W. Surfactants as Penetration Enhancers for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer 2015; 207-230.
56. Gibson M. *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*. CRC Press 2004.
57. Rizwan M, Aqil M, Talegaonkar S et al. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2009; 3: 105-124.
58. Hoar T, Schulman J. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature* 1943; 152: 102-103.
59. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64, Supplement: 175-193.
60. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012; 8: 1719-1729.
61. Bagwe R, Kanicky J, Palla B et al. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2001; 18: 77.
62. Heuschkel S, Goebel A, Neubert RH. Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97: 603-631.
63. Tadros TF. *An introduction to surfactants*. Walter de Gruyter 2014.
64. Shinoda K, Lindman B. Organized surfactant systems: microemulsions. *Langmuir* 1987; 3: 135-149.
65. Schulman JH, Stoeckenius W, Prince LM. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry* 1959; 63: 1677-1680.
66. Shinoda K, Kunieda H. Conditions to produce so-called microemulsions: Factors to increase the mutual solubility of oil and water by solubilizer. *Journal of Colloid and Interface Science* 1973; 42: 381-387.
67. Overbeek JTG. The First Rideal Lecture. Microemulsions, a field at the border between lyophobic and lyophilic colloids. *Faraday Discussions of the Chemical Society* 1978; 65: 7-19.
68. Fanun M. *Microemulsions: properties and applications*. CRC Press 2008.
69. Santos P, Watkinson A, Hadgraft J, Lane M. Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* 2008; 21: 246-259.
70. Tondre CE. Dynamics of Surfactants Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases. In *CRC Press (Online)* 2005.

71. Kahlweit M. Microemulsions. Annual Reports Section'C'(Physical Chemistry) 1999; 95: 89-116.
72. Gillberg G, Lehtinen H, Friberg S. NMR and IR investigation of the conditions determining the stability of microemulsions. Journal of Colloid and Interface Science 1970; 33: 40-53.
73. Alany R, Agatonovic-Kustrin S, Rades T, Tucker I. Use of artificial neural networks to predict quaternary phase systems from limited experimental data. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 19: 443-452.
74. Djekic L, Ibric S, Primorac M. The application of artificial neural networks in the prediction of microemulsion phase boundaries in PEG-8 caprylic/capric glycerides based systems. International Journal of Pharmaceutics 2008; 361: 41-46.
75. Richardson C, Mbanefo A, Aboofazeli R et al. Prediction of phase behavior in microemulsion systems using artificial neural networks. Journal of Colloid and Interface Science 1997; 187: 296-303.
76. Furlanetto S, Cirri M, Piepel G et al. Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011; 55: 610-617.
77. Florence A, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. Chapter 7. Emulsions, Suspensions and other disperse systems. In. Publisher by the Pharmaceutical Press 2006.
78. Alany R, Rades T, Agatonovic-Kustrin S et al. Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems. International Journal of Pharmaceutics 2000; 196: 141-145.
79. Bolzinger M, Thevenin CC, Poelman M. Bicontinuous sucrose ester microemulsion: a new vehicle for topical delivery of niflumic acid. International Journal of Pharmaceutics 1998; 176: 39-45.
80. Alany RG, Tucker IG, Davies NM, Rades T. Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems. Drug Development and Industrial Pharmacy 2001; 27: 31-38.
81. Rhee Y-S, Choi J-G, Park E-S, Chi S-C. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. International Journal of Pharmaceutics 2001; 228: 161-170.
82. Chen H, Chang X, Du D et al. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. International Journal of Pharmaceutics 2006; 315: 52-58.
83. Hua L, Weisan P, Jiayu L, Hongfei L. Preparation and evaluation of microemulsion of vinpocetine for transdermal delivery. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 59: 274-278.
84. Jadhav K, Ambade K, Jadhav S et al. Formulation and evaluation of flurbiprofen microemulsion. Current Drug Delivery 2008; 5: 32-41.
85. Li P, Ghosh A, Wagner RF et al. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. International Journal of Pharmaceutics 2005; 288: 27-34.
86. Goindi S, Narula M, Kalra A. Microemulsion-Based Topical Hydrogels of Tenoxicam for Treatment of Arthritis. AAPS PharmSciTech 2016; 1-10.
87. Shevachman M, Garti N, Shani A, Sintov AC. Enhanced percutaneous permeability of diclofenac using a new U-type dilutable microemulsion. Drug Development and Industrial Pharmacy 2008; 34: 403-412.

88. Kantarcı G, Özgüney I, Karasulu HY et al. Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate, and skin irritation studies. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8: 75-81.
89. Sintov AC, Botner S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 311: 55-62.
90. Özgüney IS, Karasulu HY, Kantarcı G et al. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7: E39-E45.
91. Fanun M. Conductivity, viscosity, NMR and diclofenac solubilization capacity studies of mixed nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids* 2007; 135: 5-13.
92. Fanun M. Oil type effect on diclofenac solubilization in mixed nonionic surfactants microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2009; 343: 75-82.
93. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 296: 73-79.
94. Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 271: 11-19.
95. Kweon J-H, Chi S-C, Park E-S. Transdermal delivery of diclofenac using microemulsions. *Archives of Pharmacal Research* 2004; 27: 351-356.
96. Fouad SA, Basalious EB, El-Nabarawi MA, Tayel SA. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 453: 569-578.
97. Lee J, Lee Y, Kim J et al. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aceclofenac. *Archives of Pharmacal Research* 2005; 28: 1097-1102.
98. Shah R, Magdum CS, Patil SS, Niakwade NS. Preparation and evaluation of aceclofenac topical microemulsion. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 5-11.
99. Aloisio C, Longhi MR, De Oliveira AG. Development and Characterization of a Biocompatible Soybean Oil-Based Microemulsion for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 104: 3535-3543.
100. El Maghraby GM. Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: effect of phase transition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 75: 595-600.
101. Djekic L, Martinovic M, Stepanović-Petrović R et al. Design of Block Copolymer Costabilized Nonionic Microemulsions and Their In Vitro and In Vivo Assessment as Carriers for Sustained Regional Delivery of Ibuprofen via Topical Administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 104: 2501-2512.
102. Ren Q, Deng C, Meng L et al. In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation of the Effect of Saturated Fat Acid Chain Length on the Transdermal Behavior of Ibuprofen-Loaded Microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 103: 1680-1691.

103. Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 433: 25-33.
104. Duangjit S, Mehr LM, Kumpugdee-Vollrath M, Ngawhirunpat T. Role of simplex lattice statistical design in the formulation and optimization of microemulsions for transdermal delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2014; 37: 1948-1957.
105. Zhang J, Michniak-Kohn B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 421: 34-44.
106. Tomšič M, Podlogar F, Gašperlin M et al. Water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: Small-angle X-ray scattering study. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 327: 170-177.
107. Podlogar F, Rogač MB, Gašperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40®-Imwitor 308®-IPM microemulsions on ketoprofene release. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 302: 68-77.
108. Paolino D, Ventura CA, Nistico S et al. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 244: 21-31.
109. Nikumbh KV, Sevankar SG, Patil MP. Formulation development, in vitro and in vivo evaluation of microemulsion-based gel loaded with ketoprofen. *Drug Delivery* 2015; 22: 509-515.
110. Üstündağ Okur N, Yavaşoğlu A, Karasulu HY. Preparation and evaluation of microemulsion formulations of naproxen for dermal delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2014; 62: 135-143.
111. Üstündağ Okur N, Apaydın Ş, Yavaşoğlu NÜK et al. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 416: 136-144.
112. Dong X, Ke X, Liao Z. The microstructure characterization of meloxicam microemulsion and its influence on the solubilization capacity. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2011; 37: 894-900.
113. Yuan Y, Li S-m, Mo F-k, Zhong D-f. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 321: 117-123.
114. Abd-Allah FI, Dawaba HM, Ahmed A. Preparation, characterization, and stability studies of piroxicam-loaded microemulsions in topical formulations. *Drug Discoveries and Therapeutics* 2010; 4: 267-275.
115. Park E-S, Cui Y, Yun B-J et al. Transdermal delivery of piroxicam using microemulsions. *Archives of Pharmacal Research* 2005; 28: 243-248.
116. Subramanian N, Ghosal SK, Moulik S. Enhanced in vitro percutaneous absorption and in vivo anti-inflammatory effect of a selective cyclooxygenase inhibitor using microemulsion. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2005; 31: 405-416.
117. Garti N, Avrahami M, Aserin A. Improved solubilization of celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution. *Journal of Colloid and Interface Science* 2006; 299: 352-365.

118. Goindi S, Kaur R, Kaur R. An ionic liquid-in-water microemulsion as a potential carrier for topical delivery of poorly water soluble drug: Development, ex-vivo and in-vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 495: 913-923.
119. Hoppel M, Juric S, Ettl H, Valenta C. Effect of monoacyl phosphatidylcholine content on the formation of microemulsions and the dermal delivery of flufenamic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 479: 70-76.
120. Schwarz JC, Hoppel M, Kählig H, Valenta C. Application of quantitative ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy in tape-stripping experiments with natural microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 102: 2699-2706.
121. Desai KGH. Enhanced skin permeation of rofecoxib using topical microemulsion gel. *Drug Development Research* 2004; 63: 33-40.
122. Bansal SS, Joshi A, Bansal AK. New dosage formulations for targeted delivery of cyclo-oxygenase-2 inhibitors. *Drugs and Aging* 2007; 24: 441-451.
123. Schubert KV, Kaler E. Nonionic microemulsions. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1996; 100: 190-205.
124. Effendy I, Maibach HI. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1995; 33: 217-225.
125. Tadros TF. *Applied surfactants: principles and applications*. John Wiley & Sons 2005.
126. Shinoda K, Saito H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* 1968; 26: 70-74.
127. Wang Z, Mu H-J, Zhang X-M et al. Lower irritation microemulsion-based rotigotine gel: formulation optimization and in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine* 2015; 10: 633.
128. Ge S, Lin Y, Lu H et al. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 465: 120-131.
129. Che J, Wu Z, Shao W et al. Synergetic skin targeting effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin combined with microemulsion for ketoconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015; 93: 136-148.
130. Mehta S, Kaur G, Mutneja R, Bhasin K. Solubilization, microstructure, and thermodynamics of fully dilutable U-type Brij microemulsion. *Journal of Colloid and Interface Science* 2009; 338: 542-549.
131. Junyaprasert VB, Boonme P, Songkro S et al. Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2007; 10: 288-298.
132. Boonme P, Krauel K, Graf A et al. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97: 1-butanol. *Aaps Pharmscitech* 2006; 7: E99-E104.
133. Bardhan S, Kundu K, Saha SK, Paul BK. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. *Journal of Colloid and Interface Science* 2013; 402: 180-189.
134. Bardhan S, Kundu K, Saha SK, Paul BK. Physicochemical investigation of mixed surfactant microemulsions: water solubilization, thermodynamic properties, microstructure, and dynamics. *Journal of Colloid and Interface Science* 2013; 411: 152-161.

135. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 67: 699-706.
136. Getie M, Wohlrab J, Neubert RH. Dermal delivery of desmopressin acetate using colloidal carrier systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005; 57: 423-427.
137. Lehmann L, Keipert S, Gloor M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2001; 52: 129-136.
138. James-Smith MA, Shekhawat D, Cheung S et al. Effect of chain length on binding of fatty acids to Pluronics in microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 62: 5-10.
139. Pal P, Thakur R, Ray S, Mazumder B. Design and development of a safer non-invasive transungual drug delivery system for topical treatment of onychomycosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2015; 41: 1095-1099.
140. Tian Q, Ren F, Xu Z et al. Preparation of high solubilizable microemulsion of naproxen and its solubilization mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 426: 202-210.
141. Subramanian N, Ghosal SK, Moulik SP. Topical delivery of celecoxib using microemulsion. *Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research* 2004; 61: 335-341.
142. Bergh M, Shao LP, Magnusson K et al. Atmospheric oxidation of poly (oxyethylene) alcohols. Identification of ethoxylated formates as oxidation products and study of their contact allergenic activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999; 88: 483-488.
143. Karlberg AT, Bodin A, Matura M. Allergenic activity of an air-oxidized ethoxylated surfactant. *Contact Dermatitis* 2003; 49: 241-247.
144. Goebel AS, Neubert RH, Wohlrab J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. *International journal of pharmaceutics* 2011; 404: 159-168.
145. Duangjit S, Chairat W, Opanasopit P et al. Development, Characterization and Skin Interaction of Capsaicin-Loaded Microemulsion-Based Nonionic Surfactant. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2016; 39: 601-610.
146. Goebel A, Schmaus G, Neubert R, Wohlrab J. Dermal peptide delivery using enhancer molecules and colloidal carrier systems—part I: carnosine. *Skin Pharmacology and Physiology* 2012; 25: 281-287.
147. Graf A, Ablinger E, Peters S et al. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 350: 351-360.
148. Trotta M, Ugazio E, Peira E, Pulitano C. Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. *Journal of Controlled Release* 2003; 86: 315-321.
149. Goebel AS, Knie U, Abels C et al. Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010; 75: 162-172.
150. Schwarz JC, Klang V, Hoppel M et al. Natural microemulsions: formulation design and skin interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 81: 557-562.

151. ElMeshad AN, Tadros MI. Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglycosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12: 1-9.
152. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg. 2014.
153. Cosmetics Directive E. Commission Decision 2006/257/EC of 09 February 2006 amending Decision 96/335/EC establishing an inventory and a common nomenclature of ingredients employed in cosmetic products. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006D0257&from=EN>. Official Journal of the European Union 2006.
154. Drummond CJ, Fong C, Krodkiewska I et al. Sugar fatty acid esters. *Surfactant Science Series* 2003; 95-128.
155. Csizmazia E. Drug permeation study through biological membrane barriers. In. PhD thesis, University of Szeged, Szeged 2011.
156. Baker IJ, Matthews B, Suares H et al. Sugar fatty acid ester surfactants: structure and ultimate aerobic biodegradability. *Journal of Surfactants and Detergents* 2000; 3: 1-11.
157. Toro C, Sanchez S, Zanocco A et al. Solubilization of lipid bilayers by myristyl sucrose ester: effect of cholesterol and phospholipid head group size. *Chemistry and Physics of Lipids* 2009; 157: 104-112.
158. Nava-Arzaluz MG, Piñón-Segundo E, Ganem-Rondero A. Sucrose Esters as Transdermal Permeation Enhancers. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer 2015; 273-290.
159. Szűts A, Szabó-Révész P. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—a mini-review. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 433: 1-9.
160. Stubenrauch C. Sugar surfactants—aggregation, interfacial, and adsorption phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2001; 6: 160-170.
161. Glatter O, Orthaber D, Stradner A et al. Sugar-ester nonionic microemulsion: structural characterization. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001; 241: 215-225.
162. Yutani R, Kikuchi T, Teraoka R, Kitagawa S. Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose laurate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2014; 62: 274-280.
163. Yutani R, Komori Y, Takeuchi A et al. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2016; 68: 46-55.
164. Fanun M. Diclofenac solubilization in mixed nonionic surfactants microemulsions. In Fanun M (ed) *Colloids in Drug Delivery*. CRC Press 2010; 271–298.
165. Fanun M, Papadimitriou V, Xenakis A. Characterization of cephalexin loaded nonionic microemulsions. *Journal of colloid and interface science* 2011; 361: 115-121.
166. Dragicevic N, Atkinson JP, Maibach HI. Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer 2015; 11-27.
167. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14: 101-114.
168. Ayala-Bravo HA, Quintanar-Guerrero D, Naik A et al. Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on in vivo human stratum corneum permeability. *Pharmaceutical Research* 2003; 20: 1267-1273.

169. Ogiso T, Iwaki M, Tsuji S. Percutaneous absorption of bromhexine in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1991; 39: 1609-1611.
170. Lerk P, Sucker H. Application of sucrose laurate in topical preparations of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* 1993; 92: 203-210.
171. Vermeire A, MUYNCK C, Vandebossche G et al. Sucrose laurate gels as a percutaneous delivery system for oestradiol in rabbits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1996; 48: 463-467.
172. Li GL, Danhof M, Bouwstra JA. Effect of elastic liquid-state vesicle on apomorphine iontophoresis transport through human skin in vitro. *Pharmaceutical Research* 2001; 18: 1627-1630.
173. Honeywell-Nguyen PL, Frederik PM, Bomans PH et al. Transdermal delivery of pergolide from surfactant-based elastic and rigid vesicles: characterization and in vitro transport studies. *Pharmaceutical Research* 2002; 19: 991-997.
174. Honeywell-Nguyen P, Van den Bussche M, Junginger H, Bouwstra J. The effect of surfactant-based elastic and rigid vesicles on the penetration of lidocaine across human skin. *STP Pharma Sciences* 2002; 12: 257-262.
175. Okamoto H, Sakai T, Danjo K. Effect of sucrose fatty acid esters on transdermal permeation of lidocaine and ketoprofen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28: 1689-1694.
176. Cázares-Delgado J, Naik A, Kalia YN et al. Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 297: 204-212.
177. Calderilla-Fajardo S, Cazares-Delgado J, Villalobos-Garcia R et al. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion, and emulsion. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2006; 32: 107-113.
178. Csóka G, Marton S, Zelko R et al. Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 65: 233-237.
179. Spornath A, Aserin A, Sintov AC, Garti N. Phosphatidylcholine embedded micellar systems: Enhanced permeability through rat skin. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008; 318: 421-429.
180. Piao H, Kamiya N, Hirata A et al. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium. *Pharmaceutical Research* 2008; 25: 896-901.
181. Tahara Y, Honda S, Kamiya N et al. A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery. *Journal of Controlled Release* 2008; 131: 14-18.
182. Muzzalupo R, Tavano L, Cassano R et al. A new approach for the evaluation of niosomes as effective transdermal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 79: 28-35.
183. El-Laithy HM. Novel transdermal delivery of Timolol maleate using sugar esters: preclinical and clinical studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 72: 239-245.
184. Yamato K, Takahashi Y, Akiyama H et al. Effect of penetration enhancers on transdermal delivery of propofol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009; 32: 677-683.
185. Otto A, Wiechers J, Kelly C et al. Effect of emulsifiers and their liquid crystalline structures in emulsions on dermal and transdermal delivery of hydroquinone,

- salicylic acid and octadecenedioic acid. *Skin Pharmacology and Physiology* 2010; 23: 273-282.
186. Klang V, Matsko N, Zimmermann A-M et al. Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 393: 153-161.
187. Tavano L, Muzzalupo R, Cassano R et al. New sucrose cocoate based vesicles: preparation characterization and skin permeation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 75: 319-322.
188. Okamoto H, Sakai T, Tokuyama C, Danjo K. Sugar ester J-1216 enhances percutaneous permeation of ionized lidocaine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 100: 4482-4490.
189. Csizmazia E, Erős G, Berkesi O et al. Ibuprofen penetration enhance by sucrose ester examined by ATR-FTIR in vivo. *Pharmaceutical Development and Technology* 2012; 17: 125-128.
190. Klang V, Schwarz JC, Matsko N et al. Semi-solid sucrose stearate-based emulsions as dermal drug delivery systems. *Pharmaceutics* 2011; 3: 275-306.
191. Klang V, Matsko N, Raupach K et al. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimisation through γ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 79: 58-67.
192. El-Laithy HM, Shoukry O, Mahran LG. Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: preclinical and clinical studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 77: 43-55.
193. Klang V, Schwarz JC, Lenobel B et al. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 80: 604-614.
194. Fülöp I, Gyéresi Á, Kiss L et al. Preparation and investigation of mefenamic acid–polyethylene glycol–sucrose ester solid dispersions. *Acta Pharmaceutica* 2015; 65: 453-462.
195. Yang F, Kamiya N, Goto M. Transdermal delivery of the anti-rheumatic agent methotrexate using a solid-in-oil nanocarrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 82: 158-163.
196. Abdel-Mageed HM, El-Laithy HM, Mahran LG et al. Development of novel flexible sugar ester vesicles as carrier systems for the antioxidant enzyme catalase for wound healing applications. *Process Biochemistry* 2012; 47: 1155-1162.
197. Balázs B, Vizserálek G, Berkó S et al. Investigation of the Efficacy of Transdermal Penetration Enhancers Through the Use of Human Skin and a Skin Mimic Artificial Membrane. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 105: 1134-1140.
198. Fehér P, Ujhelyi Z, Váradi J et al. Efficacy of Pre-and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes. *Molecules* 2016; 21: 1269.
199. Design-Expert 7.1 User's Guide, 2007.
200. Kommareddi NS, O'Connor KC, John VT. EPR characterizations of α -chymotrypsin active site dynamics in reversed micelles at enhanced gas pressures and after subjection to clathrate formation conditions. *Biotechnology and bioengineering* 1994; 43: 215-224.

201. Papadimitriou V, Pispas S, Syriou S et al. Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications. *Langmuir* 2008; 24: 3380-3386.
202. Guidance FD. Guidance for Industry: topical dermatological drug product NDAs and ANDAs-in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER) 1998.
203. Pantelić I. Dermal bioavailability of antiinflammatory drugs from sugar emulsifier stabilized bases: comparative application of in vitro / in vivo characterization methods. In. University of Belgrade 2013.
204. Mutalik S, Manoj K, Reddy MS et al. Chitosan and enteric polymer based once daily sustained release tablets of aceclofenac: in vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9: 651-659.
205. Mao G, VanWyck D, Xiao X et al. Oleic acid disorders stratum corneum lipids in Langmuir monolayers. *Langmuir* 2013; 29: 4857-4865.
206. Benedini L, Fanani ML, Maggio B et al. Surface phase behavior and domain topography of ascorbyl palmitate monolayers. *Langmuir* 2011; 27: 10914-10919.
207. Flach CR, Mendelsohn R, Rerek ME, Moore DJ. Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000; 104: 2159-2165.
208. Kanikkannan N, Babu RJ. Structure-Activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer 2015; 39-54.
209. Eeman M, Francius G, Dufrêne Y et al. Effect of cholesterol and fatty acids on the molecular interactions of fengycin with stratum corneum mimicking lipid monolayers. *Langmuir* 2009; 25: 3029-3039.
210. Roche Y, Peretti P, Bernard S. Influence of the chain length of ubiquinones on their interaction with DPPC in mixed monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2006; 1758: 468-478.
211. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1999; 1462: 109-140.
212. Eastoe J, Dalton J. Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air–water interface. *Advances in Colloid and Interface Science* 2000; 85: 103-144.
213. Svitova T, Hoffmann H, Hill RM. Trisiloxane surfactants: surface/interfacial tension dynamics and spreading on hydrophobic surfaces. *Langmuir* 1996; 12: 1712-1721.
214. Garofalakis G, Murray BS, Sarney DB. Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000; 229: 391-398.
215. Plat T, Linhardt RJ. Syntheses and applications of sucrose-based esters. *Journal of Surfactants and Detergents* 2001; 4: 415-421.
216. Camino NA, Pérez OE, Sanchez CC et al. Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air–water and oil–water interfaces. *Food Hydrocolloids* 2009; 23: 2359-2368.

217. Graham D, Phillips M. Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science* 1979; 70: 403-414.
218. Seta L, Baldino N, Gabriele D et al. The effect of surfactant type on the rheology of ovalbumin layers at the air/water and oil/water interfaces. *Food Hydrocolloids* 2012; 29: 247-257.
219. Castelli F, Sarpietro MG, Rocco F et al. Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembrane models studied by Langmuir–Blodgett technique. *Journal of Colloid and Interface Science* 2007; 313: 363-368.
220. Mendelsohn R, Flach CR, Moore DJ. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2006; 1758: 923-933.
221. Lozano N, Pinazo A, Pons R et al. Surface tension and adsorption behavior of mixtures of diacyl glycerol arginine-based surfactants with DPPC and DMPC phospholipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 74: 67-74.
222. Shaikh SR, Brzustowicz MR, Gustafson N et al. Monounsaturated PE does not phase-separate from the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol: role for polyunsaturation? *Biochemistry* 2002; 41: 10593-10602.
223. Mendelsohn R, Moore DJ. Infrared determination of conformational order and phase behavior in ceramides and stratum corneum models. *Methods in Enzymology* 2000; 312: 228.
224. Seoane R, Minones J, Conde O et al. Thermodynamic and Brewster angle microscopy studies of fatty acid/cholesterol mixtures at the air/water interface. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000; 104: 7735-7744.
225. Zulueta Díaz YdlM, Mottola M, Vico RV et al. The rheological properties of lipid monolayers modulate the incorporation of L-ascorbic acid alkyl esters. *Langmuir* 2016; 32: 587-595.
226. Garti N, Aserin A, Tiunova I, Fanun M. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2000; 170: 1-18.
227. Fanun M. Surfactant chain length effect on the structural parameters of nonionic microemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2008; 29: 289-296.
228. Fanun M. Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids* 2008; 139: 14-22.
229. Wesolowski M, Suchacz B. Artificial neural networks: theoretical background and pharmaceutical applications: a review. *Journal of AOAC International* 2012; 95: 652-668.
230. Barot BS, Parejiya PB, Patel HK et al. Microemulsion-based gel of terbinafine for the treatment of onychomycosis: optimization of formulation using D-optimal design. *AAPS PharmSciTech* 2012; 13: 184-192.
231. Jeirani Z, Jan BM, Ali BS et al. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2012; 112: 1-7.
232. Mehta S, Kaur G. *Microemulsions: thermodynamic and dynamic properties*. INTECH Open Access Publisher 2011.
233. Mehta S, Bala K. Volumetric and transport properties in microemulsions and the point of view of percolation theory. *Physical Review E* 1995; 51: 5732.
234. Borkovec M, Eicke HF, Hammerich H, Das Gupta B. Two percolation processes in microemulsions. *The Journal of Physical Chemistry* 1988; 92: 206-211.

235. Fisher S, Wachtel EJ, Aserin A, Garti N. Solubilization of simvastatin and phytosterols in a dilutable microemulsion system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 107: 35-42.
236. de Castro Santana R, Fasolin LH, da Cunha RL. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2012; 398: 54-63.
237. Chakraborty I, Moulik SP. Physicochemical studies on microemulsions: 9. Conductance percolation of AOT-derived W/O microemulsion with aliphatic and aromatic hydrocarbon oils. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005; 289: 530-541.
238. Podlogar F, Gašperlin M, Tomšič M et al. Structural characterisation of water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 276: 115-128.
239. Mitra RK, Paul BK. Physicochemical investigations of microemulsification of eucalyptus oil and water using mixed surfactants (AOT+ Brij-35) and butanol. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005; 283: 565-577.
240. Garti N, Aserin A, Ezrahi S et al. Water behavior in nonionic surfactant systems I: subzero temperature behavior of water in nonionic microemulsions studied by DSC. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996; 178: 60-68.
241. Bardhan S, Kundu K, Paul BK, Saha SK. Interfacial composition and characterization of a quaternary water-in-oil mixed surfactant (cationic of different alkyl chain lengths+ polyoxyethylene type nonionic) microemulsions in absence and presence of inorganic salts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2013; 433: 219-229.
242. Cordero J, Alarcon L, Escribano E et al. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997; 86: 503-508.
243. Beetge E, du Plessis J, Müller DG et al. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 193: 261-264.
244. Formariz T, Chiavacci L, Sarmiento V et al. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 63: 287-295.
245. Bolzinger-Thevenin M, Grossiord J, Poelman M. Characterization of a sucrose ester microemulsion by freeze fracture electron micrograph and small angle neutron scattering experiments. *Langmuir* 1999; 15: 2307-2315.
246. Nunes C, Brezesinski G, Pereira-Leite C et al. NSAIDs interactions with membranes: a biophysical approach. *Langmuir* 2011; 27: 10847-10858.
247. Feng G, Xiong Y, Wang H, Yang Y. Gelation of microemulsions and release behavior of sodium salicylate from gelled microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 71: 297-302.
248. Sahle FF, Wohlrab J, Neubert RH. Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2014; 86: 244-250.
249. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G et al. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability

- and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 406: 163-172.
250. Hirata K, Mohammed D, Hadgraft J, Lane ME. Influence of lidocaine hydrochloride and penetration enhancers on the barrier function of human skin. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 477: 416-420.
251. Bárány E, Lindberg M, Lodén M. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 195: 189-195.
252. Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D, Falson-Rieg F, Buri P. Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 173: 203-210.
253. Brunner M, Davies D, Martin W et al. A new topical formulation enhances relative diclofenac bioavailability in healthy male subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011; 71: 852-859.
254. Kienzler JL, Gold M, Nollevaux F. Systemic bioavailability of topical diclofenac sodium gel 1% versus oral diclofenac sodium in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2010; 50: 50-61.
255. Rhee Y-S, Nguyen T, Park E-S, Chi S-C. Formulation and biopharmaceutical evaluation of a transdermal patch containing aceclofenac. *Archives of Pharmacal Research* 2013; 36: 602-607.
256. Toshiaki N, Akira K, Kiyoshi S et al. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. *International Journal of Pharmaceutics* 1988; 46: 1-7.
257. Banning M. Topical diclofenac: clinical effectiveness and current uses in osteoarthritis of the knee and soft tissue injuries. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2008; 9: 2921-2929.

7. PRILOZI

7.1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

- **Marija N. Todosijević**, Gerald Brezesinski, Snežana D. Savić, Reinhard H. H. Neubert. Sucrose esters as biocompatible surfactants for penetration enhancement: An insight into the mechanism of penetration enhancement studied using stratum corneum model lipids and Langmuir monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017; 99: 161-172.

- **Marija N. Todosijević**, Miroslav M. Savić, Bojan B. Batinić, Bojan D. Marković, Mirjana Gašperlin, Danijela V. Randelović, Milica Ž. Lukić, Snežana D. Savić. Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015; 496 (2): 931-941.

- **Marija N. Todosijević**, Nebojša D. Cekić, Miroslav M. Savić, Mirjana Gašperlin, Danijela V. Randelović, Snežana D. Savić. Sucrose ester-based microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design. *Colloid and Polymer Science*, 2014; 292 (12): 3061-3076.

Poglavlja knjiga:

- Ivana Pantelić, Sanela Savić, Tanja Ilić, **Marija Todosijević**, Miroslav Savić, Snežana Savić: From physicochemically stable nanocarriers to targeted delivery: in-vivo pharmacokinetic, pharmacodynamic and biodistribution studies. In Alexandru Mihai Grumezescu, editor: *Pharmaceutical Nanotechnology*, Elsevier, Submitted.

- Tanja M. Isailović, **Marija N. Todosijević**, Sanela M. Đorđević, Snežana D. Savić: Natural surfactants-based micro/nanoemulsion systems for NSAIDs – Practical formulation approach, physicochemical and biopharmaceutical characteristics/performances. In Bojan R. Čalija, editor: *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, Elsevier, 2017; 179-217.

Radovi saopšteneni na međunarodnim skupovima štampani u celini (M33):

- **M. Todosijević**, E. Mitsou, S. Avramiotis, D. Randelović, V. Papadimitriou, S. Savić. EPR as an effective tool to study interphase behaviour of aceclofenac in the sucrose ester-based bicontinuous microemulsions. 2nd European Conference on Pharmaceutics, 3-4 april 2017, Krakov, Poljska.
- **M. Todosijević**, R.H.H. Neubert, G. Brezesinski, D. Randelović, S. Savić. Interaction between surfactant and drug at the interface of sucrose ester-based bicontinuous microemulsions. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 22-24. septembar 2016, Beograd, Srbija.
- **M. Todosijević**, R. H. H. Neubert, G. Brezesinski, S. Savić. Sucrose esters as penetration enhancers: the influence on stratum corneum lipids in Langmuir monolayers. 10th World meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 4-7. april 2016, Glasgov, Velika Britanija.
- **M. Todosijević**, V. Savić, M. Savić, D. Randelović, M. Gašperlin, B. Batinić, T. Isailović, B. Marković, S. Savić. Aceclofenac loaded bicontinuous microemulsions: in vitro release, tape stripping and pharmacokinetic study. 1st European Conference on Pharmaceutics – Drug Delivery, 13-14. april 2015, Rems, Francuska.
- **M. Todosijević**, N. Cekić, M. Gašperlin, T. Isailović, S. Savić. Aceclofenac loaded sucrose esters-based microemulsions: physicochemical and biopharmaceutical characterization. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 18-20. septembar 2014, Portorož, Slovenija.
- **M. Todosijević**, N. Cekić, M. Gašperlin, S. Savić. Sucrose esters-based microemulsions for (trans)dermal delivery of aceclofenac as a model drug: physicochemical characterization. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31. mart-3.april 2014, Lisabon, Portugal.
- **M. Todosijević**, N. Cekić, M. Gašperlin, S. R. Savić, D. Randelović, S. D. Savić. Development and characterization of aceclofenac loaded nonionic microemulsions. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31. mart-3.april 2014, Lisabon, Portugal.

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34)

- **M. Todosijević**, I. Nikolić, N. Paunović, V. Savić, M. Lukić, S. Đorđević, S. Savić. Physicochemical, biopharmaceutical characterization and in vivo skin irritation study of sucrose ester-based microemulsions: the influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. 2nd Congress of Pharmacists of Montenegro with International participation, 28-31. maj 2015, Budva, Crna Gora.

- **M. Todosijević**, N. Cekić, M. Lukić, M. Gašperlin, S. Savić. Sucrose ester-versus polysorbate-based non-ionic microemulsions: physicochemical, biopharmaceutical and in vivo skin irritation studies. Skin Forum Annual Meeting 2014: A Joint Conference with APV, 4-5. septembar 2014, Prag, Češka.

Radovi saopšteni na nacionalnim skupovima štampani u izvodu (M64)

- **M. Todosijević**, N. Cekić, V. Savić, M. Lukić, I. Nikolić, N. Paunović, S. Savić. Microemulsions as potential carriers for transdermal delivery of aceclofenac: the influence of surfactant and cosurfactant type. VI Serbian Congress of Pharmacy with international participation, 15-19. oktobar 2014, Beograd, Srbija.

7.2. Biografija autora

Mag. farm. Marija Todosijević je rođena 02. januara 1989. godine u Užicu, a osnovnu školu „Aleksa Dežović“ u Sevojnu je završila kao đak generacije i nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Srednju školu, Užičku gimnaziju, je završila u Užicu, takođe kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008. godine, a diplomirala je 04. septembra 2012. godine kao student generacije sa prosečnom ocenom 9,86. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Farmaceutska tehnologija, upisala je školske 2012/2013. godine.

Tokom osnovnih studija bila je stipendista grada Užica, Fonda za stipendiranje studenata Mihajlo Pupin, Fonda za mlade talente Republike Srbije, Zadužbine Dragoljub Marinković, i Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Dobitnik je Povelje Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta Farmaceutskog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 2011/2012. godini (nagrada „Student generacije“), kao i nagrade Naučnog fonda „Profesor Ivan Berkeš“ koju dodeljuje Društvo medicinskih biohemičara Srbije. Tokom doktorskih studija dobitnik je stipendije fondacije „Hemofarm“ za studente prirodnih nauka koji postižu izuzetan uspeh tokom školovanja.

Od decembra 2012. do početka 2017. godine bila je zaposlena na projektu iz oblasti tehnološkog razvoja (TR 34031) kojeg finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Tokom rada na fakultetu učestvovala je u izvođenju praktične nastave iz predmeta Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutska tehnologija II i Osnovi farmaceutske biotehnologije na studijskom programu Farmacija, integrisane akademske studije, na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu. Od januara do maja 2017. godine je bila zaposlena kao saradnik u proizvodnji u kompaniji Hemofarm A.D., Odeljenje injekcionih rastvora – Pogon sterilinih proizvoda. Trenutno je zaposlena u kompaniji Novo Nordisk Pharma d.o.o. Beograd, u Odeljenju za kliničke studije, medicinske i regulatorne poslove.

Do sada je u više navrata boravila na stručnom usavršavanju u inostranstvu, u toku 2012. i 2013. godine na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Slovenija (mentor prof. dr Mirjana Gašperlin). U toku 2015. godine, kao dobitnik istraživačke stipendije Nemačke službe za akademsku razmenu

(*DAAD short term research grant*), bila je na Institutu za farmaciju, Martin Luter Univerziteta, Halle (Saale), Nemačka, mentor prof. dr dr Reinhard Neubert, i na Maks Plank Institutu (engl. *Max Planck Institute of Colloids and Interfaces*), Potsdam, Nemačka, mentor prof. dr Gerald Brezesinski. U okviru bilateralnog projekta 2016. godine je boravila na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard Karls Univerziteta u Tbingenu, Nemačka, pod mentorstvom prof. dr Rolfa Danielsa, a iste godine bila je na Institutu za biologiju, medicinsku hemiju i biotehnologiju, Atina, Grčka, pod mentorstvom dr Vassiliki Papadimitriou.

Govori engleski jezik (Cambridge Certificate: *First Certificate in English* – FCE).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Марија Тодосијевић

Број индекса: 2/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Формулација, физичко-хемијска карактеризација и биолошка испитивања биокомпатибилних микроемулзија за дермалну и трансдермалну испоруку ацеклофенака

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других факултета,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.07.2017.

М.Тодосијевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Тодосијевић

Број индекса: 2/12

Студијски програм: Докторске академске студије, модул: Фармацеутска технологија

Наслов рада: Формулација, физичко-хемијска карактеризација и биолошка испитивања биокомпатибилних микроемулзија за дермалну и трансдермалну испоруку ацеклофенака

Ментор: проф. др Снежана Савић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05.07.2017.

М. Тодосијевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Формулација, физичко-хемијска карактеризација и биолошка испитивања биокомпатибилних микроемулзија за дермалну и трансдермалну испоруку ацеклофенака

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прерада
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, 05.07.2017.

др. Ђорђевић