

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Adhezivita in situ PLGA filmů pro lokální aplikaci léčiv
Adhesivity of in situ PLGA films for the local drug delivery

Vedoucí diplomové práce:
PharmDr. Šnejdřová Eva, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Julie Paňkiv

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce PharmDr. Evě Šnejdrové, PhD. za odborné vedení, příjemnou spolupráci, poskytnuté cenné rady a připomínky, za ochotu a poskytnuté materiály v průběhu vypracování mé diplomové práce.

V Hradci Králové

Julie Paňkiv

OBSAH

| | |
|--|----|
| Abstrakt..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Zadání práce..... | 6 |
| Úvod..... | 7 |
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Teoretická část | 9 |
| 1.1 Definice filmotvorných systémů (FFS)..... | 9 |
| 1.2 Komponenty FFS | 11 |
| 1.2.1 Aktivní farmaceutická substance (API)..... | 11 |
| 1.2.2 Polymer..... | 14 |
| 1.2.3 Plastifikátor..... | 15 |
| 1.2.4 Rozpouštědlo | 17 |
| 1.2.5 Další pomocné látky | 18 |
| 1.3 Testování FFS | 18 |
| 1.4 Komerční filmotvorné systémy..... | 21 |
| 1.5 Bioadheze..... | 22 |
| 1.5.1 Faktory ovlivňující bioadhezi | 23 |
| 1.5.2 Metody testování bioadheze | 25 |
| 1.6 Testování bioadheze in vitro | 27 |
| 1.6.1 Zkoušky tahové..... | 27 |
| 1.6.2 Průtokový test | 30 |
| 1.6.3 Reologický synergismus | 31 |
| 1.6.4 Fyzikálně chemické metody | 33 |
| 2 Experimentální část..... | 34 |
| 2.1 Přístroje | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2 | Suroviny | 34 |
| 2.3 | Příprava FFS..... | 35 |
| 2.4 | DSC | 35 |
| 2.5 | Stanovení doby evaporace organického rozpouštědla | 36 |
| 2.6 | SEM..... | 37 |
| 2.7 | Měření adhezivních vlastností..... | 38 |
| 3 | Výsledky | 39 |
| 3.1 | DSC..... | 39 |
| 3.2 | Doba evaporace rozpouštědla | 40 |
| 3.3 | SEM..... | 46 |
| 3.4 | Adhezivita FFS..... | 48 |
| 3.4.1 | Adhezivita FFS obsahujících CBD..... | 48 |
| 3.4.2 | Adhezivita FFS bez léčiva | 49 |
| 4 | Diskuze | 53 |
| 4.1 | DSC..... | 53 |
| 4.2 | Evaporace organického rozpouštědla..... | 55 |
| 4.3 | SEM..... | 57 |
| 4.4 | Adhezivní vlastnosti..... | 57 |
| | Závěry | 63 |
| | Literatura..... | 64 |

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Věříš Andrea

Posluchač: Julie Paňkiv

Název diplomové práce: Adhezivita *in situ* PLGA filmů pro lokální aplikaci léčiv

Cílem této práce bylo studium systémů pro tvorbu filmů *in situ* (film forming system – FFS). Byly formulovány FFS tvořené poly(mléčnou-*ko*-glykolovou) kyselinou lineární nebo větvené struktury, plastifikované methyl-salicylátem, ethylpyruvátém nebo ektoinem, s inkorporovaným kanabidiolem. Jako rozpouštědlo byl testován aceton a ethyl-acetát. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci FFS, jejich složení a testování. *In situ* filmy byly charakterizovány pomocí DSC a SEM. Byl sledován průběh evaporace organického rozpouštědla z FFS. Byla vypracována metodika testování adheze *in situ* filmů pomocí tahové zkoušky na reometru.

Bylo zjištěno, že doba evaporace organického rozpouštědla z FFS je ovlivněna jak typem použitého rozpouštědla, tak i typem plastifikátoru. Evaporace více než 90 % rozpouštědla nastane za dobu 5 minut. V porovnání s komerčním přípravkem Lamisil Once, zvoleným jako standard, vykazují testované PLGA *in situ* filmy vyšší adhezivitu. Významnými faktory, ovlivňující adhezivní vlastnosti, je koncentrace polymeru ve FFS a typ plastifikátoru. Homogenní struktura *in situ* filmů, hladký povrch bez pórů a strukturálních defektů byly prokázány pomocí SEM. DSC potvrdila, že inkorporovaný kanabidiol je v PLGA filmu rozpuštěný.

Klíčová slova: *in situ* film, PLGA, bioadheze, kanabidiol, lokální aplikace léčiv

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Mentor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Věříš Andrea

Student: Julie Paňkiv

Title of Thesis: Adhesivity of *in situ* PLGA films for the local drug delivery

The goal of this work was the formulation and study of the film forming systems FFS formed by poly(lactic-*co*-glycolic) acid of linear or branched structure, plasticized with methyl-salicylate, ethyl-pyruvate or ectoine, with incorporated cannabidiol. Acetone and ethyl acetate were tested as solvents. The theoretical part is focused on the characterization of FFS, their composition and testing. *In situ* films were characterized by DSC and SEM. The course of evaporation of the organic solvent from the FFS was monitored. A methodology for testing adhesion of *in situ* films using a tensile test on a rheometer was developed. It was found that the evaporation time of the organic solvent from FFS is influenced by both the type of solvent used and the type of plasticizer. In non-plasticized polymers, organic solvent evaporates faster than in plasticized ones. Evaporation of more than 90 % of the solvent occurs within 5 minutes. Compared to the commercial preparation Lamisil Once, the tested PLGA *in situ* films show higher adhesiveness. Significant factors affecting adhesive properties include FFS dilution and plasticizer type. SEM of the *in situ* films showed a homogeneous structure and a smooth surface without pores and structural defects. DSC confirmed that the incorporated cannabidiol is dissolved in the PLGA film.

Key words: film forming system, *in situ* film, PLGA, bioadhesion, cannabidiol, local drug application

ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo studium adhezivních vlastností systémů pro tvorbu filmu *in situ* (film forming system – FFS). Bylo zadáno připravit FFS tvořené poly(mléčnou-ko-glykolovou) kyselinou (PLGA) lineární nebo větvené struktury. Polymery byly plastifikovány methyl-salicylátem (MS), ethyl-pyruvátém (EP) nebo ektoinem (ECT). Jako rozpouštědlo polymerního systému byl testován aceton a ethyl-acetát. Vhodnost rozpouštědla pro FFS byla hodnocena zejména rychlostí jeho evaporace po aplikaci FFS. Polymerní soustavy byly testovány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Struktura povrchu *in situ* filmů byla pozorována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Hlavní cílem práce bylo studium adhezivity FFS a *in situ* vytvořených filmů. Byla vypracována metodika testování adheze pomocí tahové zkoušky na reometru. Kromě standardních podmínek jako je vzdálenost horní a dolní geometrie, teplota, kontaktní doba a síla, rychlost odtržení vzorku od podkladu byl testován vliv rychlosti evaporace organického rozpouštědla na adhezivitu filmů.

ÚVOD

Kůže jako největší orgán lidského těla představuje ideální a snadno dostupný cíl pro aplikaci topických přípravků, ať už pro lokální nebo systémovou léčbu. Použití konvenčních topických dávkových forem, jako jsou polotuhé látky (krémy, masti, gely atd.) a náplasti, je omezeno některými jejich nežádoucími vlastnostmi. Náplasti často způsobují podráždění kůže, obtížně se nanášejí na nerovný povrch, jejich odstranění může způsobovat bolest a estetický dojem je spíše negativní. Polotuhé formulace některé z těchto obtíží překonávají, ale lze je snadno setřít a aplikované množství je silně ovlivněno pacienty, takže dodání terapeuticky účinných dávek není zaručeno. Filmotvorný systém (FFS) překonává některé z výše uvedených nevýhod konvenčních přípravků. Relativně krátká doba používání se odráží v nedostatku standardizovaných testovacích metod pro finální lékovou formu. V předložené práci byla pozornost zaměřena na nekomerční kopolymery D,L kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), které mají nižší molární hmotnost nebo větvenou strukturu a sníženou hydrofobicitu, díky čemuž jsou vhodné pro formulaci FFS. PLGA splňují požadavky na systémy s řízeným uvolňováním – biodegradabilita, biokompatibilita a nízká toxicita, avšak jejich strukturální vlastnosti (křehkost, pevnost) omezují zpracování do těchto systémů. Přidáním změkčovadel můžeme dosáhnout uspokojivých změn vlastností, které mohou také zlepšit parametry bioadheze.

Tato diplomová práce tématicky a metodicky navazuje na diplomové a rigorózní práce z předchozích ročníků, kde byly studované adhezivní a tepelné vlastnosti polyesterů poly(mléčná-ko-glykolová kyselina) s tím rozdílem, že byly použity jiné varianty, nebo koncentrace polymeru, plastifikátorů, rozpouštědla nebo léčiva.¹⁻⁴

SEZNAM ZKRATEK

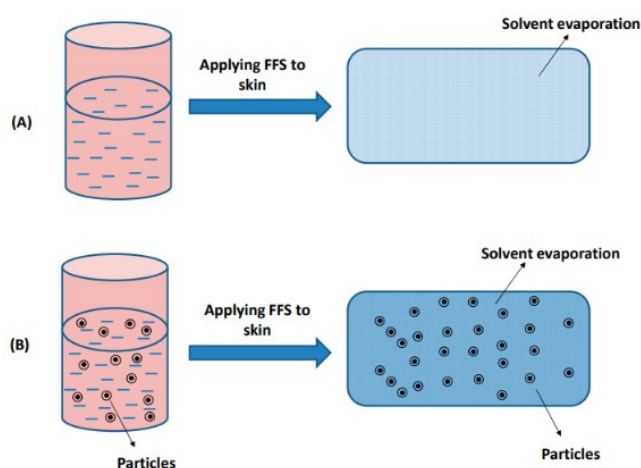
| | |
|------|--|
| A2 | poly(laktid-ko-glykolid) větvený na kys. polyakrylové 2 % ve směsi |
| A4 | poly(laktid-ko-glykolid) větvený na kys. polyakrylové 4 % ve směsi |
| API | aktivní farmaceutická substance |
| CBD | kanabidiol |
| DSC | diferenciální skenovací kalorimetrie |
| EA | ethyl-acetát |
| ECT | ektoin |
| EMA | Evropská agentura pro léčivé přípravky |
| EP | ethyl-pyruvát |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv |
| FFS | film forming system |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| MCT | olej se středně dlouhým řetězcem triglyceridů |
| MS | methyl-salicylát |
| PLGA | poly(laktid-ko-glykolid) |
| PVA | polyvinylalkohol |
| PVP | polyvinylpyrrolidon |
| TGA | termogravimetrická analýza |

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Definice filmotvorných systémů (FFS)

Filmotvorný systém (FFS) je nový přístup k transdermálnímu a dermálnímu dodávání léčiv, který je alternativou k současným lokálním přípravkům. Je popsán jako kapalná dávková forma, která vytváří tenký, průhledný film *in situ*, tj. po aplikaci na kůži nebo jiný povrch těla. Tyto systémy se skládají z účinné látky a filmotvorných složek dispergovaných ve vehikulu, které se rychle odpařuje, nebo absorbuje ve stratum corneum (SC) a zanechává adhezivní film.⁵ Kromě toho, že FFS překonávají některé nevýhody konvenčních topických produktů, jako je okluze potních kanálků, bolestivého odstranění (náplasti) nebo setření vedoucího k subterapeutickým hladinám léčiva (krémy, masti, gely), mohou také fungovat jako zásobník léčiva snižující frekvenci aplikace, a tím zlepšují compliance pacienta.^{5,6} Navíc jejich kosmetické aspekty mohou být vhodnější než u polotuhých přípravků, protože jsou rychleschnoucí, méně mastné a diskretnější díky průhlednosti.

Tvorba filmu začíná těsně po aplikaci, kdy se začnou odpařovat první molekuly rozpouštědla. V závislosti na rozpustnosti filmotvorného polymeru v použitém rozpouštědle mohou být FFS buď roztoky (A), nebo disperze (B) viz. Obrázek 1. Zatímco v roztoku jsou polymerní řetězce důkladně propleteny a po odpaření rozpouštědla dochází k tvorbě filmu, částice polymeru v disperzi se musí nejprve spojit, aby se umožnilo vzájemné pronikání jednotlivých polymerních řetězců. Koalescence je způsobena tím, že s odpařováním rozpouštědla vzrůstají kapilární síly. Výchozí stav polymeru ovlivňuje vlastnosti finálního filmu. Polymerní roztoky obvykle vedou k průhlednému hladkému filmu, zatímco filmy vytvořené z disperze, zejména emulze, mohou být neprůhledné s drsným povrchem. V obou případech se obvykle přidává změkčovadlo, aby se snížila křehkost polymerních filmů.^{5,7}



Obrázek 1: Znárodnění tvorby filmu z FFS - roztok (A), disperze částic (B) ⁷

Jak bylo popsáno, hlavním problémem při dermální a transdermální aplikaci léčiv prostřednictvím kapalných a polotuhých formulací je smývání a stírání formulací, takže nelze dosáhnout požadovaného terapeutického účinku. Z tohoto důvodu se pro transdermální použití nachází velmi málo polotuhých formulací. Myšlenkou vývoje filmotvorných formulací je vývoj formulací se zvýšenou odolností vůči mechanickým a vodním vlivům a zlepšením kosmetických vlastností. Mohou být formulovány jako polymerní roztoky, gely nebo emulze.

Filmotvorný roztok se nejčastěji aplikuje na kůži aplikátorem nebo se na kůži nastříká.²⁷ Pro dodání testosteronu byl připraven filmotvorný roztok za použití směsi polyvinylpyrrolidonu a polyvinylalkoholu v isopropanolu jako filmotvorných polymerních roztoků.¹⁰ Dále byl vyvinut transdermální filmotvorný sprej obsahující estradiol, následně formulace byla optimalizovaná pomocí různých polymerů a změkčovadel pro účinnou penetraci estradiolu po delší dobu ve srovnání s gelem a náplastí.²⁷ Pro léčbu dermatologických plísňových infekcí byl vyvinut transdermální sprej obsahující vorikonazol.¹¹

Filmotvorné hydrogely se převážně používají při hojení ran. Formulace aplikovaná na poraněné místo poskytuje film, který je odolný vůči fyziologickému stresu způsobenému pohybem kůže.³⁷ Ve srovnání s jinými formami nabízejí tyto systémy snadnější aplikaci, vhodnou přilnavost, dobrou flexibilitu, elasticitu a snadnou výrobu. Byl vyvinut filmotvorný gel pro prodloužené dodání terbinafin-hydrochloridu za použití kombinace polymeru kyseliny methakrylové a hypromelosy.³⁸ Dále byla

vyvinuta filmotvorná gelová formulace pro prodloužené uvolňování rotigotinu s hydroxypropylcelulózou a Carbomerem.⁵ Pro transdermální podávání byl vyvinut měkký hydrogel testosteronu na bázi polyvinylalkoholu. Formulace byla uvnitř zkumavek v polotuhé fázi, ale při aplikaci na kůži vytvořila tenké filmy během 2 - 3 minut.³⁹

Filmotvorné emulze kromě olejové fáze a vodné fáze obsahují filmotvorný polymer.⁵ Výhodou filmotvorných emulzí oproti polotuhým formulacím je to, že umožňují ošetření větších oblastí postižené kůže s prodlouženou dobou kontaktu, což umožňuje dermální terapii chronických onemocnění.³⁹ Byla vyvinuta filmotvorná emulze pro prodloužené dermální dodávání nonivamidu obsahujícího kopolymer esterů kyseliny akrylové a methakrylové a kopolymer ethylakrylátu, methylmethakrylátu a trimethylamonioethylmethakrylátchloridu jako filmotvorné látky.⁴⁰ V další studii byla studována in vitro permeace a penetrace nonivamidu kůží. Bylo zjištěno, že rychlost permeace účinné látky je určena difúzí přes polymerní matici, ve které byly kapičky rozpuštěny. Konstantní rychlosti permeace a účinné koncentrace API v kůži tak mohly být udržovány po dobu 12 hodin.³⁹

1.2 Komponenty FFS

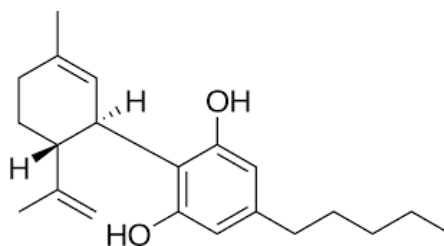
Všechny látky použité pro formulaci FFS ovlivňují jak vlastnosti konečného filmu, tak i dodání léčiva.⁵

1.2.1 Aktivní farmaceutická substance (API)

Účinnost léčby závisí na pronikání léčiva přes cílové vrstvy kůže v účinných koncentracích. Obecně jsou léčiva, která jsou použitelná v těchto systémech, vysoce účinná, rychle prostupují kůží, nezpůsobují podráždění kůže a jsou relativně stabilní vůči enzymům přítomným v epidermis. Další vlastnosti léčiva, jako je rozdělovací koeficient, určují cestu, kterou lék bude procházet kůží. Molekulová hmotnost API je rovněž důležitým faktorem při permeaci léčiva, protože malé molekuly procházejí kůží lépe než velké molekuly. Pro přípravu FFS se používají různé účinné látky: lidokain hydrochlorid, bupivakain⁸, terbinafin hydrochlorid, imatinib⁹, testosteron¹⁰, estradiol⁵, vorikonazol¹¹, betametason¹¹, benzalkonium bromid¹¹, atd.

V současné době se uvažuje o perspektivní tvorbě filmotvorných systému s obsahem CBD.

Kanabidiol (CBD) je přírodní sloučenina, která patří mezi kanabinoidy, a tvoří se v konopí setém a indickém (*Cannabis sativa*, *C. indica*). Od chemické struktury viz. Obrázek 2. se odvíjí síla léčebných účinků.



Obrázek 2: Chemická struktura kanabidiolu ¹²

Přesný mechanismus účinku CBD není v současné době plně objasněn. Je známo, že CBD působí na kanabinoidní (CB) receptory endokanabinoidního systému, které se nacházejí v mnoha oblastech těla, včetně periferního a centrálního nervového systému a mozku. Endokanabinoidní systém reguluje mnoho fyziologických reakcí těla včetně bolesti, paměti, chuti k jídlu a nálady. Receptory CB1 lze nalézt v dráhách bolesti v mozku a míše, kde mohou ovlivnit analgezií a anxiolýzu vyvolanou CBD, a receptory CB2 mají účinek na imunitní buňky, kde mohou ovlivnit protizánětlivé procesy vyvolané CBD.¹²

Hlavními dvěma kanabinoidy jsou psychotropní tetrahydrokanabinol (THC) a nepсихоaktivní CBD. THC je farmakologicky a toxikologicky nejvýznamnější. Má široké spektrum léčebných účinků. CBD má potenciální terapeutické účinky, ale je zapotřebí více výzkumu, abychom plně porozuměli jeho účinkům a bezpečnosti. Kromě toho se účinky kanabidiolu mohou lišit v závislosti na jedinci, použité dávce a interakci s jinými léky. CBD působí proti psychózám a úzkostem vyvolaným užitím THC.¹³ Byla popsána jeho funkce jako neuroprotektivního antioxidantu¹⁴ s účinky silnějšími než kyselina askorbová a tokoferol.¹⁵ CBD má protizánětlivý, imunosupresivní účinek a mírní artritidu.¹⁶ Příznivě působí i při léčbě Alzheimerovy¹⁷ a pravděpodobně i Parkinsonovy choroby.¹⁸ Vykazuje cytostatické a cytotoxické účinky.¹⁵ Bylo prokázáno, že kanabidiol má vlastnosti zmiřující chronickou bolest spojenou s artritidou, roztroušenou sklerózou a fibromyálií.¹² I když vazba CBD

k receptorům je slabá, vykazuje výrazný antagonistický účinek a pro léčbu je ideální v kombinaci s agonistou (jako THC).¹⁹ Přípravek Sativex (označovaný jako Nabiximols) je směs THC a CBD v poměru 1:1. Kombinace THC a CBD zvyšuje účinnost a snižuje vedlejší účinky.¹⁵

Pro distribuci kanabidiolu do tkání jsou určující jeho fyzikálně-chemické vlastnosti viz. Tabulka 1, neexistuje pro něj žádný specifický přenašeč nebo bariérový systém.

Tabulka 1: Přehled fyzikálně – chemických vlastností CBD (vlastní zpracování dle ^{20,21})

| Vlastnost | Popis |
|-----------------------|---|
| Vzorec | C ₂₁ H ₃₀ O ₂ |
| Molekulová hmotnost | 314,46 g/mol |
| Skupenství | Pevné |
| Vzhled/forma | Krystalický prášek |
| Barva | Bílá až světle žlutá |
| Zápach | Lehká vůně/hořká chuť |
| Bod tání/ bod tuhnutí | 66-69 °C |
| pH | Relativně neutrální, nemá silně kyselé nebo zásadité pH |
| Rozpustnost | Lipofilní |
| Stabilita | Relativně stabilní, za normálních podmínek skladování se nerozkládá. Může však degradovat v kyselých podmínkách nebo při vysokých teplotách nebo světlu |
| Čistota | Odlišná, v závislosti na použité extrakční metodě a kvalitě výchozího materiálu. Lze extrahovat z rostliny konopí pomocí různých metod, včetně extrakce CO ₂ , ethanolové extrakce a extrakce rozpouštědlem. |
| Hořlavost | Nehořlavý |

Profil disoluce kanabidiolu z lékové formy je důležitý při vývoji léků, protože může ovlivnit biologickou dostupnost a farmakokinetiku sloučeniny. Mezi faktory, které ovlivňují disoluci, patří:

- Formulace produktu, zejména nosič CBD (hydrofilní, hydrofobní).
- Velikost částic - menší částice mohou vést k rychlejšímu rozpouštění a vyšší biologické dostupnosti.
- Vyšší teplota a nižší hodnoty pH mohou zvýšit rozpustnost a zvýšit rychlost rozpouštění.
- Léková forma (tobolky, tablety, perorální roztoky)

Aplikační formy CBD zahrnují vodné nebo olejové roztoky, gely, masti, krémy ²², tobolky, ústní spreje.²³

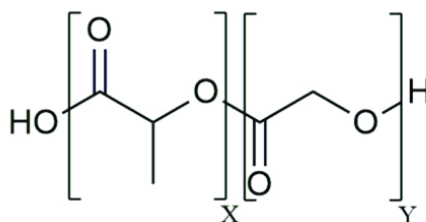
1.2.2 Polymer

Tvoří základ FFS a pro přípravu těchto systémů je k dispozici celá řada polymerů. Aby bylo dosaženo požadovaných vlastností filmu, mohou být tyto polymery použity samostatně nebo v kombinaci s jinými filmotvornými polymery. Polymery by měly tvořit čirý pružný film při teplotě pokožky. Měly by být vybrány s ohledem na kompatibilitu s léčivem, stabilitu, disoluční profil a konečný terapeutický účinek. Polymery rovněž ovlivňují vizuální vlastnosti finálního filmu a spolu s plastifikátory určují jeho mechanické a adhezivní vlastnosti. Byly testovány různé komerčně dostupné polymery, jako například deriváty celulosy, polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP), chitosan, polymethakryláty, kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA).

V předložené práci byly pro přípravu FFS použity tři nekomerční PLGA polymery syntetizované a charakterizované na katedře farmaceutické technologie.²⁴ Mezi jejich výhody patří bezpečnost, biologická odbouratelnost, vstřebatelnost přirozenými cestami a biokompatibilita. Hlavní výhodou PLGA může být také jeho schválení FDA a EMA.²⁵ Tělem je metabolizován na neškodné vedlejší produkty. Patří mezi biodegradabilní polymery, které se úspěšně používají pro výrobu bioresorbovatelných chirurgických stehů, podpůrného materiálu v tkáňovém inženýrství a v poslední době i systémů pro podávání léků. Degradace vede k akumulaci kyselých monomerů, kyseliny mléčné a glykolové. Výrazné snížení pH prostředí může zvýšit rozpustnost léčiv lépe rozpuštěných v kyselém prostředí a podpořit hojení. PLGA je lineární polyester tvořený ekvimolárním množstvím kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové (Obrázek 3). Polyestery označené A4 a A2 jsou větvené na kyselině polyakrylové (A) o molární hmotnosti 2000 g/mol. Číslo v označení znamená množství větvící složky, použité při syntéze. Větvením na kyselině polyakrylové byly získány polyestery s koncovými karboxyly, což je předpokladem pro snížení hydrofobicity a zvýšení interakce s léčivem. Rozvětvená struktura a potlačená hydrofobicita dodávají materiálům mukoadhezivní vlastnosti. Číselné a hmotnostní průměry molární hmotnosti, hmotnostní průměr vnitřní viskozity a větvící poměr jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Číselné (M_n) a hmotnostní (M_w) průměry molární hmotnosti, hmotnostní průměr vnitřní viskozity $[\eta]_w$ a větvící poměr g'

| Polymer | M_n (g/mol) | M_w (g/mol) | $[\eta]_w$ (mL/g) | g' |
|---------|---------------|---------------|-------------------|------|
| A2 | 8 600 | 14 400 | 8,9 | 0,54 |
| A4 | 10 900 | 18 700 | 8,0 | 0,42 |
| PLGA | 1 700 | 2 400 | 5,9 | 1,0 |



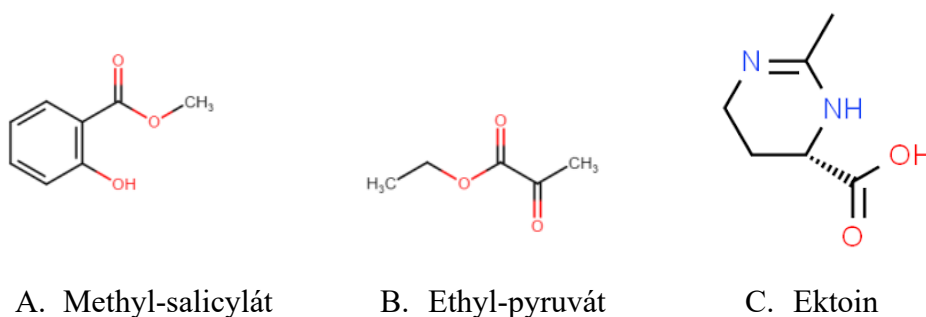
Obrázek 3: Struktura PLGA ²⁶

1.2.3 Plastifikátor

Ke zlepšení mechanických vlastností polymeru a konečného filmu je často nutné přidat plastifikátory. Typicky se používají nízkomolekulární sloučeniny, zvyšující flexibilitu polymeru. Toho je dosaženo začleněním molekul plastifikátoru mezi polymerní řetězce, což vede ke zvýšení volného objemu a pohybu volných řetězců. Film je méně křehký, pevnější a pružnější. Plastifikace snižuje teplotu skelného přechodu polymeru (T_g), nad kterou jsou řetězce pohyblivé a vytvořený film je pružný. V ideálním případě je této žádoucí vlastnosti dosaženo pod teplotou pokožky (~ 32 °C), což umožňuje, aby se fólie přizpůsobila pohybu kůže. Povaha změkčovadla a jeho koncentrace určují jeho vliv na tvorbu filmu.

Vliv plastifikátoru na liberaci léčiva závisí na tom, zda má FFS formu disperze nebo roztoku. V případě disperze plastifikátor usnadňuje koalescenci polymerních částic a vytvořený film je kompaktnější a je umožněno ustálené a prodloužené uvolňování léčiva. Naproti tomu pokud je FFS ve formě roztoku, plastifikace neovlivňuje tvorbu filmu v takovém rozsahu, ale obecně zvyšuje jak flexibilitu polymerního řetězce, tak difuzivitu a uvolňování léčiva. Rovněž kompatibilita plastifikátoru a polymeru může

mít také důležitý vliv na uvolňování léčiva. Bylo zjištěno, že lipofilní změkčovadla (tributylcitrát, dibutylsebakát) zvýší více uvolňování BMV z FFS na bázi hydrofobního polyakrylátového kopolymeru než z hydrofilního FFS na bázi hydroxypropylcelulosity. Plastifikátory používané v polymerních systémech musí mít nízkou tendenci k migraci, tvorbě exsudátu, odpařování nebo těkání. Mezi další vlastnosti ideálního změkčovadla patří jeho zpracovatelnost, schopnost poskytovat požadované mechanické vlastnosti konečného produktu, stabilita při nízkých i vysokých teplotách. Běžně používaná změkčovadla jsou glycerol, polyethylenglykol, sorbitol, dibutylftalát, propylenglykol, triethylcitrát, močovina, triacetin.^{11,27} V rámci diplomové práce byly testovány tři změkčovadla, a to methylsalicylát, ethyl-pyruvát a ektoin (Obrázek 4).



Obrázek 4: Struktury plastifikátorů²⁸⁻³⁰

Methylsalicylát (MS)

Lékopisný organický ester kyseliny salicylové (název podle IUPAC methyl-2-hydroxybenzoát) je přirozeně se vyskytující látka v mnoha rostlinách. V dnešní době je jeho výroba pro průmyslové využití převážně syntetická. Za normálních podmínek je to bezbarvá, nažloutlá, nebo načervenalá olejovitá kapalina s typickým zápachem, mísitelná s organickými rozpouštědly. Má bod varu 220-224 °C.²⁸ MS je pro svou vůni a chuť široce používán v potravinářském průmyslu a v kosmetice. Využití v kosmetice je dáno i jeho hřejivým účinkem a skutečností, že methylsalicylát jako prekurzor kyseliny salicylové má určité protizánětlivé a keratolytické vlastnosti. Z toho důvodu se používá i v léčivých topických přípravcích určených k oddálení a léčbě bolesti svalů nebo kloubů.³¹

Ethyl pyruvát (EP)

Malá molekula s názvem IUPAC ethyl-2-oxopropanoát je ester endogenního metabolitu, kyseliny pyrohroznové. Za normálních podmínek je to bezbarvá kapalina se sladkou květinovou vůní a vysokou teplotou varu.²⁹ Používá se ve farmaceutickém a chemickém průmyslu jako důležitý meziprodukt pro syntézu léčiv, pesticidů, pryskyřic a plastů. Díky své příjemné vůni a plastifikačním vlastnostem se používá ve vůních a kosmetických přípravcích. Rovněž byla popsána jeho protizánětlivá aktivita.³²

Ektoin (ECT)

Přírodní látka, kterou produkují mikroorganismy v reakci na různé zátěže prostředí, jako je vysoká koncentrace soli, teplota a nízká dostupnost vody. IUPAC název pro ECT je (4S, 2R)-2-karboxy-4-(trimethylamonio)butanoát. Bod tání je 280°C. Získal si svoji pozornost díky svým vlastnostem, jako je schopnost chránit buňky před environmentálním stresem a jeho potenciální aplikace v různých průmyslových odvětvích. Pro své stabilizační účinky na proteiny a enzymy se široce využívá v kosmetice, farmacii a biotechnologii.³⁰

1.2.4 Rozpouštědlo

Jako nosné médium tvoří rozpouštědla často hlavní část FFS, zejména v roztocích tvořících film.³³ Jednou z nejdůležitějších charakteristik FFS, která je vysoce ovlivněna rozpouštědlem, je doba schnutí, která by neměla být delší než 5 minut, aby se minimalizovalo nepohodlí pacienta. Proto jsou preferována vysoce těkavá organická rozpouštědla, např. nižší alkoholy (ethanol, isopropanol). V první řadě musí být použité rozpouštědlo kompatibilní s pokožkou, nemělo by pokožku dráždit ani krátkodobě během procesu odpařování. Filmotvorný polymer musí být ve vybraném rozpouštědle dobře dispergovatelný, nebo rozpustný. Rozpouštědlo se musí rychle odpařit při teplotě povrchu kůže, aby se vytvořil polymerní film. Tento proces musí na povrchu kůže probíhat rovnoměrně a dostatečně pomalu, aby i přes výsledné zvýšení viskozity formulace zůstaly polymerní řetězce stále dostatečně pohyblivé pro interakci a vytvoření homogenního filmu.

Rozpouštědlem první volby je ethanol, a to i přesto, že vyvolává při použití ve vysokých koncentracích podráždění kůže. V topických formulacích FDA akceptuje obsah ethanolu vyšší než 95 %. Ethanol byl také popsán jako urychlovač penetrace a není pochyb o tom, že usnadňuje počáteční rozdělení a příjem lipofilních léčiv do stratum corneum po aplikaci FFS.³⁴ Přehled rozpouštědel používaných pro filmotvorné systémy je uvedený viz. Tabulka 3.

Tabulka 3: Přehled rozpouštědel (vlastní zpracování dle ¹¹)

| Kategorie | Příklady |
|-------------------|---|
| Glykoly | Propylenglykoly Polyethylenglykoly |
| Alkoholy | Benzylalkohol Butanol Ethanol Isopropanol |
| Jiná rozpouštědla | Ethylacetát Isopropyl-myristát Voda Aceton |

1.2.5 Další pomocné látky

Začlenění urychlovačů transdermální penetrace do FFS může zvýšit flux léčiva, a tím se ve stratum corneum vytvoří rezervoár.³⁵ Rozsah účinku enhancerů závisí na řadě faktorů (včetně koncentrace), přičemž binární směsi mohou vyvolat synergické účinky. Při použití zesilovačů vždy existuje riziko podráždění kůže. Ukázalo se, že začlenění lipidových excipientů do FFS, jako jsou triglyceridy se středně dlouhým řetězcem (MCT), vede k vytvoření strukturovaného, dvoufázového polymerního filmu. Měkčí inkluze obohacené o lipidy poskytují prostředí, ve kterém je solubilizované léčivo v počáteční fázi uvolňováno rychle a poté následuje fáze prodlouženého uvolňování.³⁶

1.3 Testování FFS

V lékopisech není stanoveno žádné specifické testování FFS. Filmotvorné systémy spadají do článku Tekuté přípravky pro kožní aplikaci (Liquida cutanea). Zde však

nejsou pokyny pro kontrolu kvality finálních filmů. Základní vlastnosti FFS a *in situ* filmů a metody jejich testování jsou prezentovány v literatuře.

Mezi jeden z důležitých parametrů FFS patří doba schnutí. Pro posouzení doby schnutí byla formulace aplikována na vnitřní stranu předloktí dobrovolníka, který se účastnil studie na základě informovaného souhlasu. Po 5 minutách bylo na film umístěno sklíčko bez použití tlaku. Pokud po vyjmutí nebyly na sklíčku viditelné žádné zbytky kapaliny, byl film považován za suchý.⁴¹

Důležitou vlastností *in situ* filmu, kterou lze použít k hodnocení odolnosti vůči namáhání způsobenému pohyby kůže, odolnosti proti oděru a hodnocení pružnosti, je pevnost v tahu. K měření se nejčastěji používají analyzátory textury. Jsou vybaveny sondou nebo upínacím zařízením, které kontrolovanou silou působí na film a měří se výsledná deformace. Z výsledné křivky závislosti síla/dráha lze určit napětí potřebné k přetržení filmu. Křivka síla/dráha vykazuje lineární oblast elastické deformace následovanou nelineární oblasti plastické deformace vedoucí k bodu porušení nebo prasknutí.^{42,43}

Důležitým a snadno měřitelným parametrem je tloušťka filmu, daná místem aplikace a množstvím aplikovaného FFS. Polymerní filmy se nanosou na teflonovou desku a nechá se odpařit rozpouštědlo. Suché filmy jsou řezány pomocí skalpelu. Tloušťka filmu se měří digitálním mikrometrem.^{27,43}

Lepivost vytvořeného filmu se zjišťuje přitlačení vaty nízkým tlakem na suchý film. V závislosti na množství bavlněných vláken zadržovaných fólií je lepivost hodnocena jako vysoká (na fólii hustá akumulace vláken), střední (tenká vrstva vláken), a nízká (občasná nebo žádná přilnavost vláken). Tento parametr hodnocení je zásadní, protože přípravek by měl být nelepivý, aby se zabránilo přilnutí k oděvu pacientů.²⁷

Propustnost vodní páry je definována jako množství vody procházející jednotkovou plochou filmu za jednotku času. Údaj o propustnosti vodní páry je důležitý při určování permeačních charakteristik filmu. Má rovněž vliv na vlastnosti pokožky, jako je hydratace stratum corneum, průtok krve a teplota kůže. Vzorčky tenkých filmů definované plochy se vloží do vytárovaných vial naplněných vodou a umístí se do exikátoru. Jsou udržovány při konstantní teplotě po danou dobu a v předem stanovených časových intervalech jsou zváženy. Propustnost vodní páry (WVP) je vypočtena z úbytku hmotnosti:⁴¹

$$WVP = \frac{w}{A \cdot t} \quad (1)$$

kde

W úbytek hmotnosti obsahu v lahvičce [g]

A plocha povrchu [cm²]

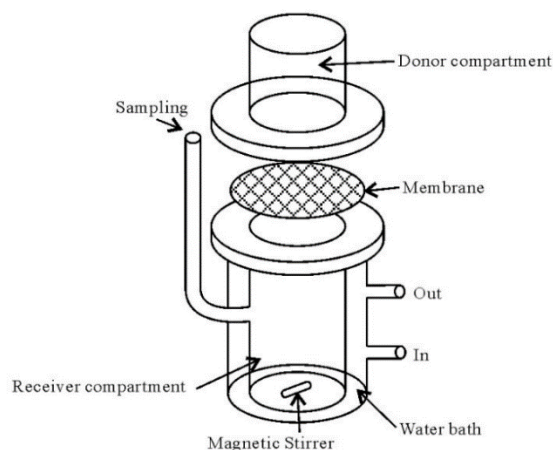
t čas [h]

Test odolnosti proti vodě se používá většinou pro laky určené k léčbě onemocnění nehtů. Provádí se nanesením laku na nehet nebo zvolený modelový podklad a po zaschnutí se na definovanou dobu ponoří do vody. Kvantifikuje se množství filmu odstraněného z podkladu.⁴⁴

Pro termickou analýzu FFS se používají dvě metody: diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrická analýza (TGA). Při DSC se měří množství tepla absorbované materiálem ve srovnání s referenčním vzorkem v průběhu definovaného teplotního režimu. Metoda umožňuje posouzení parametrů, jako je teplota skelného přechodu (T_g) nebo teplota tání (T_m).⁴⁵ Často se používá ke stanovení účinnosti plastifikátorů, jejichž primární funkcí je snížení T_g.⁴⁶ TGA měří změnu hmotnosti daná degradací vzorku s rostoucí teplotou a používá se k popisu tepelné stability materiálů.⁴⁵

Strukturu filmů lze monitorovat pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM)⁴³ nebo mikroskopie atomárních sil (AFM).⁴⁷ Obě metody umožňují zachytit strukturu filmů, umožňují popis povrchu filmu a výskyt dalších strukturních znaků, jako jsou póry.

Pro studium kožní permeace léčiva slouží Franzova difúzní cela a její modifikace.⁷ Franzova difúzní cela (Obrázek 5) obsahuje dva oddíly, donorový a akceptorový, mezi kterými je ukotvena difúzní membrána z různých materiálů (nylon⁴³, silikon⁴⁸ nebo celulosa⁴⁹). Akceptorová komora je naplněna médiem, které je temperováno na definovanou teplotu. V předem stanovených intervalech se odebírají vzorky média a nahrazují se stejný objem. Vhodnou analytickou metodou (např. HPLC, spektrofotometricky) se stanoví obsah léčiva.⁴¹



Obrázek 5: Schéma difúzní cely používané pro testování permeace léčiva *in vitro* ⁴¹

K popisu reologického chování FFS se používají rotační a oscilační testy. Rotačními testy se stanoví tokové chování kapalných FFS, zatímco oscilační testy umožňují stanovení viskoelastického chování filmů ve stadiu evaporace rozpouštědla.

1.4 Komerční filmotvorné systémy

V současné době je na trhu několik přípravků ve formě FFS. Nejčastěji se tato aplikační forma využívá pro péči o rány. Pomocí náplasti ve spreji lze rány zcela uzavřít a současně chránit proti infekci dezinfekčními látkami obsaženými ve FFS. Rovněž některé léčivé přípravky získaly povolení k uvedení na trh a jsou uvedeny v Tabulce 4. Příkladem je Lamisil Once[®] pro jednorázovou léčbu mykózy nohou. Terbinafin-hydrochlorid se z filmu uvolňuje po dobu až 13 dnů po aplikaci.¹¹ Jedná se o film forming systém obsahující hydroxypropylcelulosu, kopolymer akryloyldimethylaurát, hydroxid sodný, benzylalkohol, sorbitan-stearát, cetyl-palmitát, cetylalkohol, stearylalkohol, polysorbát 60, isopropyl-myristát, ethanol a čištěnou vodu. Používá se k léčbě plísňových onemocnění kůže, jako je například tinea pedis (atletická noha), tinea cruris (svědění), tinea corporis (kožní onemocnění). Lamisil Once se snadno nanáší, rychle zasychá, obecně je bezpečný a dobře snášený přípravek. Axiron[®] představuje první filmotvornou formulaci pro transdermální aplikaci testosteronu a může být použit jako alternativa k hormonálním náplastem.

Tabulka 4: Příklady FFS na trhu ^{5,11}

| Produkt | API/ polymer | Společnost | Typ formulace |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|---------------|
| Lamisil Once® | Terbinafin hydrochlorid | GlaxoSmithKlineConsumer Healthcare | Roztok |
| Axiron® | Testosteron | Eli Lilly USA | Sprej |
| Medspray® | Terbinafin hydrochlorid | MedPharm | Sprej |
| PharmaDur® | Hydrochinon | Polyterapeutica | Emulzní gen |
| Akutol® | Akrylát | AVEFLOR | Tekutý obvaz |
| Flint® | Poly(butylmetakrylát) | Togal Germany | Tekutý obvaz |
| BandAid® | Celulóza acetát | Ethicon GmbH, Germany | Tekutý obvaz |
| Opside®Spray | Poly(methylkrylát) | Smith Nephew GmbH Germany | Filmové krytí |

1.5 Bioadheze

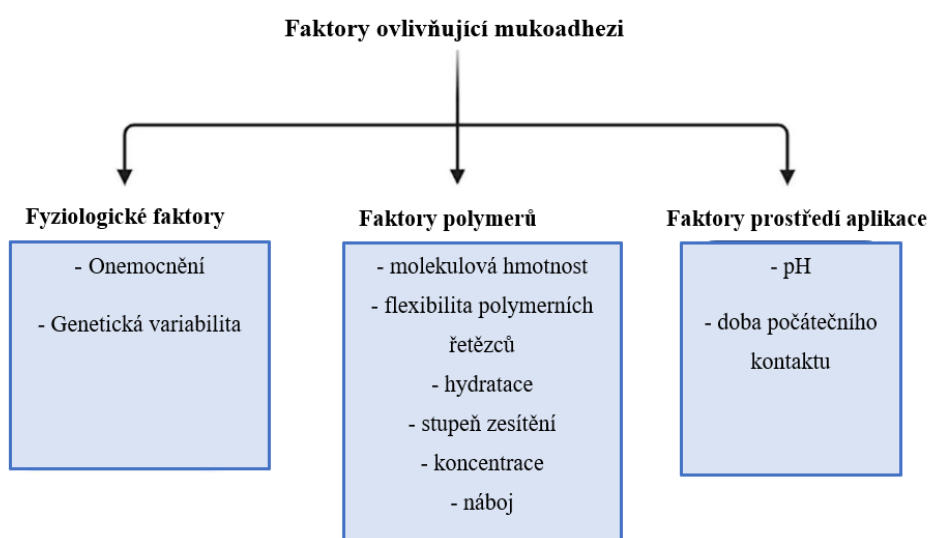
Adheze může být definována jako tendence odlišných částic nebo povrchů k sobě přilnout prostřednictvím fyzikálních nebo chemických vazeb. Adheze mezi dvěma materiály, kde alespoň jeden z materiálů je biologického původu, se nazývá bioadheze.⁵⁰ Mukoadheze je typ bioadheze, kdy formulace interaguje s vrstvou hlenu, který pokrývá slizniční tkáň. V praxi se tyto dva pojmy často zaměňují.⁵¹ Bioadhezivní terapeutické systémy zajistí prodloužený kontakt v místě aplikace nebo adsorpce, a tím zlepšení biologické dostupnosti léčiva. Mezi další výhody patří vyloučení first-pass efektu, ovlivnění permeability membrán a zlepšení compliance pacienta tím, že se sníží frekvence dávkování.

Mukoadheze je dvoustupňový proces. První fáze je fáze kontaktu a zvlhčování. Zahrnuje těsné spojení mezi bioadhezivem a substrátem. To může být zajištěno dostatečným smáčením nebo bobtnáním bioadhezivního materiálu. K vytvoření silného adhezivního spoje přispívá prodloužení počáteční doby kontaktu. Tato fáze je důležitá, protože určuje, zda k adhezi dojde či nikoli. Následuje fáze konsolidace, kdy bioadhezivum proniká do tkáně (interdifúze, interpenetrace) nebo se řetězce molekuly bioadheziva zapletou s řetězci hlenu (entanglement).⁵²

1.5.1 Faktory ovlivňující bioadhezi

Bioadhezivní nosič musí být netoxický a biokompatibilní, výhodou je biologická odbouratelnost. Dobrá adheze bude dosažena, pokud má polymerní nosič vysokou molární hmotnost, flexibilní řetězce a obsahuje hydrofilní skupiny (karboxylové, hydroxylové, aminoskupiny), které podporují tvorbu vodíkových vazeb.⁵³

Vytvoření adhezivního spoje závisí na mnoha faktorech, jak je přehledně uvádí Obrázek 6.



Obrázek 6: Faktory ovlivňující mukoadhezi

Jednotlivé faktory můžeme rozdělit do tří skupin⁵⁴:

- fyziologické faktory organismu
- faktory místa aplikace
- vlastnosti polymerní látky

A. Fyziologické faktory organismu

Fyzikálně-chemické vlastnosti hlenu nebo farmakokinetiku aktivní farmaceutické substance může měnit onemocnění (př. nachlazení, bakteriální infekce, záněty aj). Biologická dostupnost a metabolismus léčiva se může u jednotlivců lišit v důsledku genetické variability. Dalším faktorem je obměna vrstvy hlenu, která limituje dobu setrvání bioadhezivního materiálu na mukózní membráně. Přítomnost potravy významně ovlivňuje dobu obměny vrstvy hlenu v GIT.

B. Faktory týkající se místa aplikace

pH může ovlivnit náboj na povrchu hleny a ionizovatelnost funkčních skupin bioadhezivních polymerů. Hlen má v závislosti na pH různou hustotu náboje v důsledku rozdílu v disociaci funkčních skupin na sacharidové části a aminokyselinách polypeptidového řetězce. Robinson a kol. ve svém experimentu stanovili, že hodnota pH média je důležitá pro hydrataci kopolymerů kyseliny polyakrylové. Maximální hodnota adheze byla při pH 5-6, minimální při pH 7. Toto chování je přisuzováno rozdílu v hustotě náboje při různých hodnotách pH. Hustota náboje hleny i polymerů je tedy ovlivněna pH, což dále ovlivňuje bioadhezi.^{53,55}

Doba kontaktu mezi bioadhezivní a slizovou vrstvou určuje rozsah bobtnání a vzájemného pronikání bioadhezivních polymerních řetězců. Kromě toho se bioadhezivní síla zvyšuje se zvyšující se dobou kontaktu.⁵⁶

C. Faktory týkající se polymerní látky

Důležitým faktorem pro adhezi je molekulová hmotnost polymeru. Jednotlivé polymery vykazují optimální bioadhezi při určité hodnotě M_w . Obecně se předpokládá, že dobrou adhezi mají polymery s vysokou molekulovou hmotností, a to alespoň 100 000.⁵³

Flexibilita polymerních řetězců je určena koncentrací, typem a stupněm zesílení polymeru. Pro interpenetraci je nezbytná dostatečná flexibilita. Každý polymer má určitou koncentraci ve formulaci, která je optimální pro dostatečnou tvorbu hydratační vrstvy. Při vysokých koncentracích polymeru řetězce ztrácejí pružnost a snižuje se jejich schopnost interpenetrace. Naopak při nízkých koncentracích není k dispozici dostatek řetězců pro interakce.⁵⁷ Pro adhezi je nutná optimální hydratace polymeru. Čím je hydratace vyšší, tím víc se snižuje adheze.⁵⁸ Stupeň zesílení polymeru ovlivňuje, jak snadno přilne k membráně. Čím více příčných vazeb, tím méně vody může polymer přijmout a tím méně je pravděpodobné, že nabobtná. Navíc chemická struktura polymeru může ovlivnit jeho schopnost přilnout k membráně. Polymery s hydrofilními funkčními skupinami (např. hydroxylové, amino, sulfátové a karboxylové skupiny) mají lepší adhezivní vlastnosti než polymery bez nich. Hustota náboje má také významný vliv na adhezi. Aniontové polymery mají ve srovnání s kationtovými lepší bioadhezivní vlastnosti a jsou méně toxické, proto se používají častěji.⁵⁹

1.5.2 Metody testování bioadheze

Při formulaci mukoadhezivních systémů se testují adhezivní vlastnosti polymerů, aby byla zajištěna efektivita *in situ* filmů.⁵⁰ Výsledky různých experimentů nelze přímo porovnávat, protože dosud není k dispozici standardní, např. lékopisná metoda.⁶⁰ Metody testování bioadhezivních formulací můžeme rozdělit na metody *in vivo*, *ex vivo* a *in vitro*.

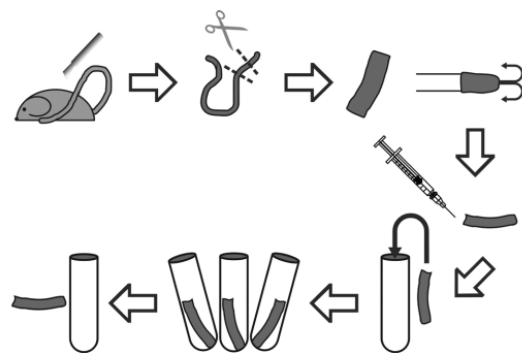
A. *In vivo* metody

In vivo testovací metody zahrnují podávání bioadheziva zvířeti nebo člověku a hodnocení jeho adhezivních vlastností ve fyziologickém prostředí. Tyto metody poskytují cenné informace o účinnosti materiálu v relevantním biologickém prostředí, ale jsou drahé, často eticky nepřijatelné a časově náročné. Existuje několik *in vivo* technik pro monitorování bioadheze: gama scintigrafie, studie s radioaktivně značenými nebo fluorescenčně vázanými léčivy.⁵⁴ Další metodou je GIT tranzit pomocí radioopákní techniky. Zahrnuje použití radioopákních markerů (např. síran barnatý), zapouzdřených v bioadhezivním systému pro stanovení účinků bioadhezivních polymerů na dobu průchodu GIT. Odběr stolice a rentgenová kontrola poskytují neinvazivní metodu monitorování celkové doby setrvání v GIT bez ovlivnění normální GI motility.⁵⁶

B. *Ex vivo* metody

Ex vivo testování probíhá na izolovaných zvířecích orgánech či tkáních nebo difuzních komorách, které modelují transport léčiva.

Technika obráceného střevního vaku je příkladem *ex vivo* metody pro hodnocení mukoadhezivních vlastností materiálů za využití střeva laboratorních zvířat, jako jsou krysy (Obrázek 7). Segment tenkého střeva byl izolován, obrácen, jeden konec se sešít a naplněn fyziologickým roztokem. Vaky byly umístěné do zkumavek obsahujících testované bioadhezivum ve známých koncentracích, míchaly se a inkubovaly. Vypočítalo se množství navázaného adheziva na segment tak, že se od výchozí hmotnosti adheziva ve zkumavce odečetla hmotnost adheziva, které se nenavázalo na střevo.⁶¹



Obrázek 7: *Ex vivo* metoda invertního střeva⁶¹

Další testovací metody se používají pro sledování doby, za kterou se bioadhezivní přípravek oddělí od sliznice. Metoda byla použita při testování náplastí přilepených na prasečí sliznici. Náplast byla na povrchu hydratována fosfátovým pufrům a poté uvedena do kontaktu s prasečí sliznicí. Přístroj posouval destičku do media, kterým byl fosfátový pufr o teplotě 37 °C tak, aby byla náplast zcela ponořena. Byla zaznamenána doba, kdy se náplast zcela oddělila od sliznice.^{62,63}

Další *ex vivo* metodou je metoda průtokové donorové komory pro difúzní cely, použitá pro testování bukálních náplastí. Byl testován vliv mukoadhezivních polymerů nebo mezoporézního oxidu křemičitého na retenci léčiva. Ve srovnání s jinými *ex vivo* metodami popsanými v literatuře pro hodnocení mukoadhezivity bukálních náplastí poskytuje tato metoda několik výhod⁶⁴:

- lépe odráží fyziologické podmínky, protože v místě aplikace lze zajistit reálný tok slin
- je všestranná, protože může být nainstalována na jakýkoli druh vertikální difúzní cely umožňující současnou detekci retence léčiva v místě podání a permeaci léčiva tkání
- umožňuje optickou kvantifikaci doby setrvání formulací pomocí zpracování obrazu

C. *In vitro* metody

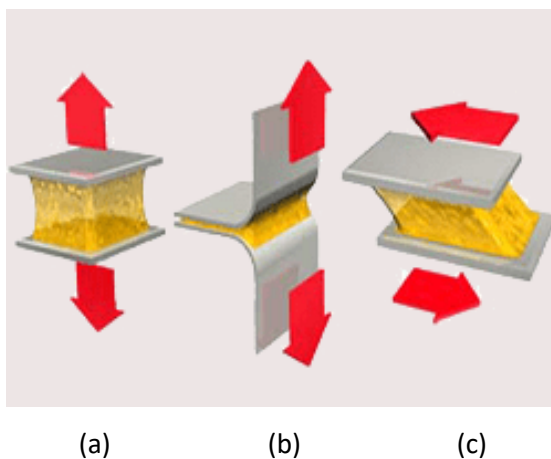
In vitro testy bioadheze jsou nejčastěji používané metody pro stanovení bioadhezivních vlastností polymerů a bioadhezivních terapeutických systémů. Těmto metodám bude věnována následující kapitola.

1.6 Testování bioadheze in vitro

Používají se zkoušky tahové, reologické a průtokové.

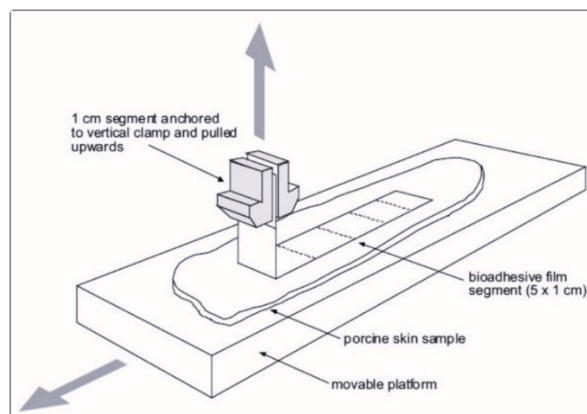
1.6.1 Zkoušky tahové

Zkoušky tahové jsou založeny na měření síly potřebné k přerušení vazby mezi modelovým substrátem a adhezivem. Síla je kategorizována jako smyková, tažná nebo odtrhávací (Obrázek 8) v závislosti na směru, ve kterém je adhezivum odděleno od substrátu.⁶⁵



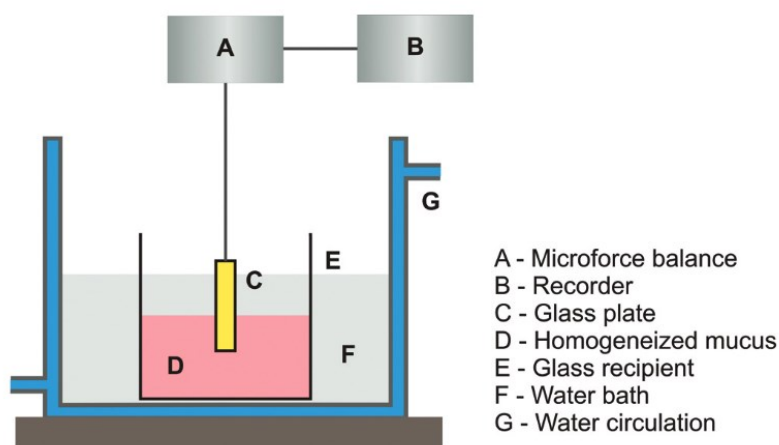
Obrázek 8: Síly působící při tahových zkouškách: tážná (a), odtrhávací (b), smyková (c) ⁶⁶

Odtrhávací test (*peel test*) má při testování bioadhezivních systémů omezené použití. Používá se hlavně u buklálních léčivých přípravků a transdermálních náplastí. Dle studie McCarron a kol.⁶⁷ byla k pohyblivé ocelové ploše přilepena prasečí kůže a byla hydratována vodou. Testovaná náplast byla konstantní silou po konstantní dobu přilepena na připravený substrát a jeden její konec uchycen do svorek. Svorcky se pohybovaly nahoru a plošina se posouvala horizontálně tak, aby mezi filmem a kůží byl úhel 90° viz. Obrázek 9.



Obrázek 9: Znárodnění průběhu *peel testu* ⁶⁷

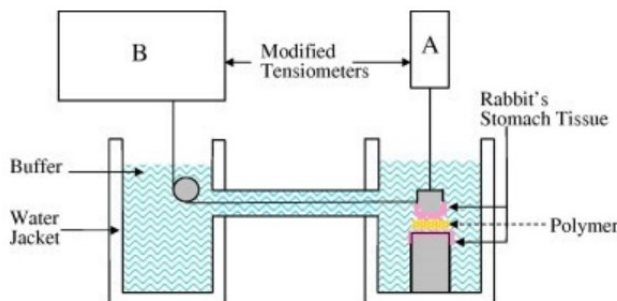
Test adheze ve smyku proměřuje sílu potřebnou k oddělení dvou paralelních skleněných sklíčků pokrytých mucinem a testovaným filmem.⁶⁸ To lze provést pomocí Wilhemova modelu (Obrázek 10). Skleněná deska (C) zavěšená na váze (A) je ponořena do mucinu (D) za konstantní teploty (F). Měří se síla potřebná k vytažení destičky.



Obrázek 10: Wilhemův model zařízení pro testování adheze ⁶¹

Pro měření adheze v tahu se obvykle používají upravené váhy. Reprezentativní příklad je demonstrován v práci Robinsona a kol.⁶⁹ Byla stanovena síla potřebná k oddělení bioadhezivního vzorku od tkáně čerstvě resekované ze žaludku králíka. V tomto experimentu (Obrázek 11) byla část tkáně, která měla odkrytou stranu hlenu, upevněna na zvážené skleněné lahvičce a ponořena do kádinky obsahující žaludeční tekutinu. Další část téže tkáně, opět s odkrytou stranou hlenu, byla umístěna přes pryžovou zátku

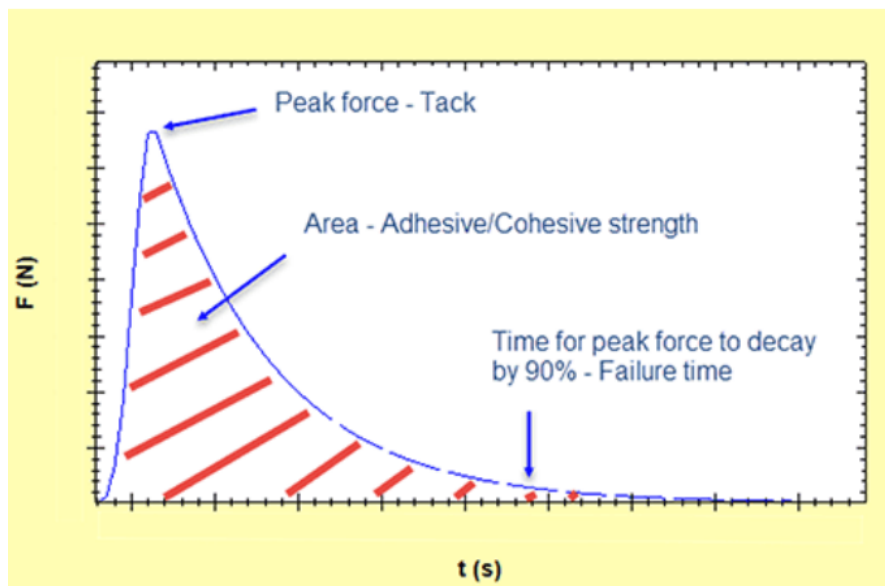
a zajištěna uzávěrem lahvičky. Malé množství testovaného bioadheziva bylo umístěno mezi povrch dvou mukózních tkání. Byla zaznamenána síla potřebná k oddělení vzorku od tkáně.



Obrázek 11: Upravený duální tenzometr dle Robinsona a kol.⁷⁰

Adhezivita může být hodnocena modifikovanými zkouškami pevnosti v tahu, které popsali Hagesaether a Sande.⁷⁰ Filtrační papíry dané plochy, umístěné na nepropustném podkladu, byly pomocí lepicí pásky připevněny k základně pohyblivé válcové sondy a ke stacionární ploše. Konstantní množství vzorku bylo rovnoměrně aplikováno na filtrační papír připojený k sondě. Na filtrační papír připojený ke stacionárnímu povrchu byl aplikován mucin v simulované střevní tekutině. Po dobu 15 minut došlo k nasáknutí filtračních papírů. Sonda byla spuštěna, dokud filtrační papír nasáklý roztokem polymeru nebyl v kontaktu s filtračním papírem nasáklým mucinem. Měření pevnosti v tahu probíhalo při konstantní síle a době kontaktu.⁷¹

Další metodou je stanovení adhezivity pomocí axiálních měření na rotačním reometru. Měření lze realizovat pomocí rotačního reometru Kinexus s Peltierovou deskou, umožňující temperaci, s použitím horní geometrie PU 20 (20mm horní deska) a standardní předkonfigurovanou sekvencí v softwaru rSpace. Testovaný vzorek konstantní hmotnosti byl umístěn do středu spodní desky bez použití tlaku a horní deska byla uvedena do kontaktu se vzorkem, dokud nebylo dosaženo definované kontaktní síly. Po uplynutí definované kontaktní doby byla horní geometrie odtržena definovanou rychlostí a byla zaznamenána normálová síla jako funkce času. Pro vyhodnocení adhezivity lze použít tři parametry viz. Obrázek 12, a to je maximální síla k odtržení filmu od podkladu (*peak force*), plocha pod křivkou (*area*) a čas poklesu síly o 90 % (*failure time*).

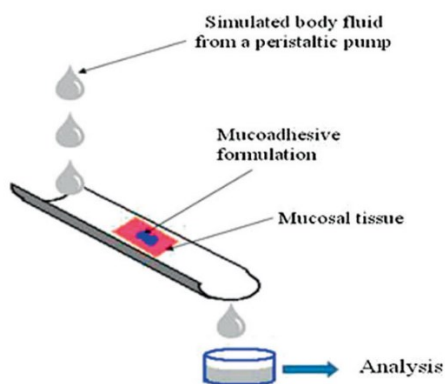


Obrázek 12: Profil normálové síly v čase ukazující klíčové parametry pro posouzení adhezivních/kohezních vlastností v tahu ⁷²

1.6.2 Průtokový test

Průtokový (smývací) test se často používá pro stanovení doby adheze, zejména u formulací aplikovaných na místa v organismu, kde je konstantní průtok biologické tekutiny. Je to výhodné při vývoji mukoadhezivních formulací pro cílené oblasti, jako je oko, kde neustálé slzení a mrkání vytlačuje aplikovaný přípravek. Testy lze také použít pro hodnocení mukoadhezivních vlastností mikro a nanočásticových a polotuhých formulací (např. gelů a krémů), které nelze snadno testovat tahovými testy. Princip průtokového testu je schematicky znázorněn na Obrázku 13. Tkáň je připevněna na povrchu skleněného kanálku a pokryta testovaným mukoadhezivem. Simulovaná tělesná tekutina je udržována při konstantním průtoku, aby smyla vzorek z povrchu tkáně. Pomocí vhodných metod se stanoví množství vymytého vzorku. Analýza může být provedena buď spektrofotometricky (UV-Vis nebo fluorescence) nebo pomocí chromatografických technik (vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo gelová permeační chromatografie). Kromě toho může být také monitorováno množství vzorku, které zůstalo adherované na podkladu. Velmi důležitý je správný výběr experimentálních podmínek a v ideálním případě by měl napodobovat

biologické prostředí při konkrétním způsobu aplikace (teplota na povrchu sliznice, vlhkost, objem simulované biologické tekutiny a rychlost průtoku).⁷³



Obrázek 13: Průběh smývacího testu⁷³

1.6.3 Reologický synergismus

Pro testování adhezivity lze využít reologické metody, které definují tok a deformaci bioadhezivních materiálů. Hassan a Galo poprvé navrhli jednoduché viskozimetrické měření pro hodnocení bioadhezivní vazby substrát-polymer.⁷⁴ Metoda je rychlá, snadná a nevyžaduje specializované vybavení ani rozsáhlou přípravu vzorku. V tomto testu simuluje směs polymeru s mucinem interpenetrační vrstvu. U polymeru se silnou mukoadhezivní schopností se očekává, že tato směs bude mít vyšší viskozitu ve srovnání se součtem viskozit polymeru a mucinu, stanovených odděleně. Výsledný účinek současně působících složek by měl být větší než souhrn účinků jednotlivých složek, což vyplývá z významu slova synergismus. Mezi mukoadhezivem a substrátem dochází ke vzniku fyzikálních a chemických interakcí, což vede ke změně reologického chování systému. Celková viskozita (η_t) systému polymer-substrát může být vyjádřena rovnicí:

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b \quad (2)$$

kde η_m je viskozita samotného substrátu, η_p odpovídá viskozitě samotného polymeru, η_b neboli tzv. komponenta bioadheze je parametr, který vyplývá z interakce mezi polymerem a mucinem. Pomocí tohoto parametru lze odvodit sílu bioadheze F:

$$F = \eta_b \cdot D \quad (3)$$

kde D je rychlostní spád.

Měření musí probíhat za definovaných podmínek (doba, koncentrace, teplota, rychlostní spád). Nevýhodou této metody je možnost destrukce struktury polymeru a substrátu vlivem vysokého namáhání v průběhu rotačních testů. Řešením je modifikace metody pro oscilační testy. Viskoelastické vlastnosti testovaného materiálu jsou analyzovány na základě hodnot elastického modulu (G'), viskózního modulu (G'') a komplexního modulu (G^*). Podle rovnic (4,5) může být stanoven parametr reologického synergismu:

$$\Delta G' = G'_{mix} - (G'_{polymer} + G'_{mucin}) \quad (4)$$

$$\Delta G'' = G''_{mix} - (G''_{polymer} + G''_{mucin}) \quad (5)$$

Touto metodou byl potvrzen reologický synergismus směsi mucinu a kyseliny polyakrylové (PAA) s různou molární hmotností a hustotou síťování v různých poměrech. Rozsah synergismu závisel na poměru mucinu na PAA, na molární hmotnosti a stupni zesílení. Z experimentu vyplývá, že adheze mezi mucinem a kyselinou polyakrylovou je dána vznikem vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí.⁷⁶ Callens a kol. použili reologickou metodu pro práškové formulace a jejich interakce s mucinem. Prášková směs byla složena ze škrobu a karbomerů. V tomto experimentu nebyl pozorován synergismus. Důvodem by mohlo být přehydratování prášku, kdy může mukoadheze vymizet nebo karbomer ve vyšší koncentraci může inhibovat proteázu, snižovat pružnost a mobilitu řetězců potřebnou pro penetraci do mukózy.⁷⁷

Nevýhodou zůstává fakt, že se výsledky jednotlivých studií nelze porovnat. To je přisuzováno používání rozdílných typů, koncentrací mucinu a různé koncentrací polymerů. Výsledky také ovlivňuje sensitivita polymeru k přítomným iontům a jejich množství. Dalším faktorem ovlivňující výsledek testu je frekvence oscilačního namáhání. Hodnoty G' a G'' u lineárního polymeru jsou přímo úměrné frekvenci, zatímco větvené polymery vykazují malou nebo žádnou závislost. Parametr, na základě kterého lze vzájemně porovnat kladné a záporné hodnoty synergismu, je $\log G'$ ratio:

$$\log G'_{ratio} = \log (G'_{mix} / G'_P) \quad (6)$$

Jestliže výsledek dosahuje hodnoty 1, znamená to, že přidání mucinu k polymeru zvýší G' směsi 10x. Pokud je roven 0, přidání mucinu nezpůsobí žádnou změnu a hodnota 1 znamená snížení G' .⁷⁸

1.6.4 Fyzikálně chemické metody

Měření kontaktního úhlu (Obrázek 14) je technika používaná k hodnocení smáčivosti povrchu a významně souvisí s adhezivitou daného materiálu. Při této metodě se sleduje samovolné rozptření mukoadhezivního materiálu překonáním mezipovrchového napětí. Jedná se o mezifázový jev ovlivněný povrchovou energií a rozptíráním:

$$S = W_a - W_c \quad (7)$$

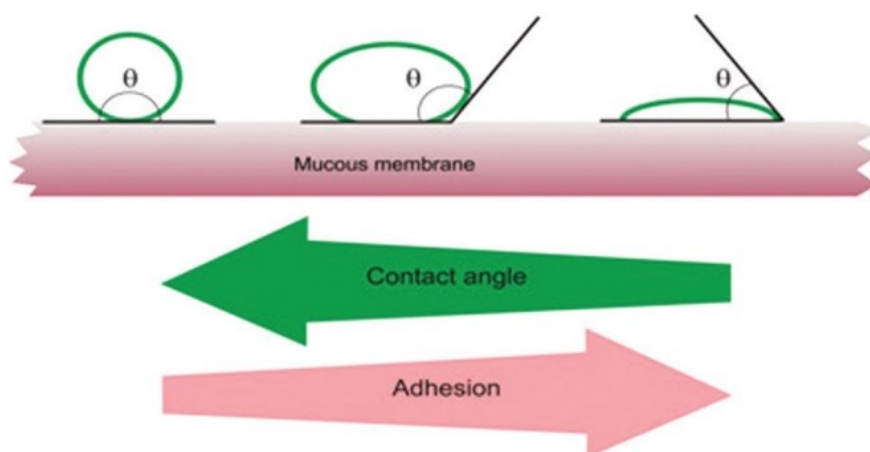
kde

S rozptírací koeficient

W_a práce adheze (síla působící mezi molekulami různých látek)

W_c práce koheze c (síla působící mezi molekulami jedné látky)

Pokud je $S > 0$, adhezivum se rozptře po substrátu. Vyšší kontaktní úhel indikuje méně smáčitelný povrch, což může mít za následek nižší přilnavost.⁸¹ Kohezivní síly uvnitř adheziva převažují nad silami adhezivními.



Obrázek 14: Vliv velikosti kontaktního úhlu na bioadhezi⁸²

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje

Analytické digitální váhy Discovery (Vitrum, Česká Republika)

Analytické digitální váhy RADWAG (Radwag, Polsko)

Digitální váhy KERN KB, max. 1200 g, d = 0,01 g (Balinge, Německo)

Digitální váhy Entris, max. 420 g, d = 0,001 g (Sartorius, Německo)

DSC 200 F3 Maia (Netzsch, Německo)

Magnetická míchačka s ohřevem IKA – WERKE (Steinberg, Německo)

Rotační reometr Kinexus Pro+ (Netzsch, Německo)

2.2 Suroviny

A2 poly(laktid-*ko*-glykolid) větvený na kys. polyakrylové 2 % ve směsi (FaF UK HK)

A4 poly(laktid-*ko*-glykolid) větvený na kys. polyakrylové 4 % ve směsi (FaF UK HK)

Aceton (PENTA, Česká Republika)

Ethyl acetát (Sigma-Aldrich, USA)

Ektoin (Sigma-Aldrich, USA)

Ethyl pyruvát (Sigma-Aldrich, USA)

Methyl-salicylát (Sigma-Aldrich, USA)

PLGA poly(laktid-*ko*-glykolid) 50:50 (FaF UK HK)

2.3 Příprava FFS

Byly připraveny FFS složené z PLGA polymeru, plastifikátoru, léčivé látky a organického rozpouštědla viz. Tabulka 5. Do vytárované vialky bylo naváženo 0,90 g polymeru, 0,10 g plastifikátoru a rozpouštědlo. Množství použitého rozpouštědla bylo ekvivalentní celkové hmotnosti ostatních složek. Po přidání všech složek směs byla udržována v uzavřených lahvičkách při teplotě místnosti na magnetickém míchadle až do úplného rozpuštění. Rovněž byly připraveny FFS s poměrem polymerní soustavy a organického rozpouštědla 1:3. Také byly připraveny roztoky FFS rozpuštěním daného množství PLGA a léčiva (CBD) v ethyl-acetátu a nakonec přidán plastifikátor.

Tabulka 5: Přehled připravených FFS

| Polymer | Plastifikátor | Rozpouštědlo | |
|---------|---|--------------|--------|
| A2 | Methyl-salicylát Ethyl-pyruvát Ektoin | Ethyl-acetát | |
| A4 | Methyl-salicylát Ethyl-pyruvát Ektoin | Ethyl-acetát | |
| PLGA | bez plastifikátoru Methyl-salicylát Ethyl-pyruvát Ektoin | Ethyl-acetát | Aceton |

2.4 DSC

Byly hodnoceny termické charakteristiky PLGA polymerů, plastifikátorů, plastifikovaných polymerů a FFS pomocí DSC (Maia 200, Netzsch). Vzorke testovaných materiálů byly naváženy do hliníkových kelímků a hermeticky uzavřeny slisováním. Pro zjištění hmotnosti vzorků byla odečtena hmotnost prázdného kelímku od hmotnosti uzavřeného kelímku obsahujícího vzorek. Množství vzorku se pohybovalo od 4,0 do 10,0 mg. Vzorek a referenční kelímek byly umístěny do přístroje na teplotní senzory a cela byla uzavřena kryty. Hmotnost prázdného kelímku, vzorku a referenčního kelímku byly zaznamenány do počítače. Použité teplotní režimy jsou

uvedeny na Obrázek 15. Termogramy byly vyhodnoceny v programu NetzschProteus. Teplota tání (T_m) byla odečtena ze skenu prvního ohřevu. Teplota skelného přechodu (T_g) byla určena v inflexním bodě druhého ohřevu.

| Step | Type | Temperature (°C) | Rate (K/min) | Duration (min) |
|------|------------|------------------|--------------|----------------|
| 1 | Dynamic | -20.0 | -10.0 | |
| 2 | Isothermal | -20.0 | | 5 |
| 3 | Dynamic | 60.0 | 10.0 | |
| 4 | Isothermal | 60.0 | | 5 |
| 5 | Dynamic | -20.0 | -20.0 | |
| 6 | Isothermal | -20.0 | | 5 |
| 7 | Dynamic | 60.0 | 10.0 | |
| 8 | Isothermal | 60.0 | | 5 |
| 9 | Dynamic | 20.0 | -10.0 | |
| 10 | Isothermal | 20.0 | | 5 |

(a) polymer, plastifikovaný polymer

| Step | Type | Temperature (°C) | Rate (K/min) | Duration (min) |
|------|------------|------------------|--------------|----------------|
| 1 | Dynamic | -20.0 | -10.0 | |
| 2 | Isothermal | -20.0 | | 5 |
| 3 | Dynamic | 250.0 | 10.0 | |
| 4 | Isothermal | 250.0 | | 5 |
| 5 | Dynamic | -20.0 | -20.0 | |
| 6 | Isothermal | -20.0 | | 5 |
| 7 | Dynamic | 250.0 | 10.0 | |
| 8 | Isothermal | 250.0 | | 5 |
| 9 | Dynamic | 20.0 | -10.0 | |
| 10 | Isothermal | 20.0 | | 5 |

(b) CBD, plastifikátory

Obrázek 15: Teplotní režimy DSC

2.5 Stanovení doby evaporace organického rozpouštědla

Byla testována doba evaporace organického rozpouštědla (ethyl-acetátu nebo acetonu) z FFS tvořených lineárním PLGA bez plastifikátoru nebo plastifikovaným 10 % MS nebo EP (Tabulka 8). Poměr polymerního systému (PLGA, plastifikátor, popř. léčivo) a těkavého organického rozpouštědla byl 1:3.

Na analytických vahách bylo vytárováno podložní sklíčko a na vyznačenou plochu 7 cm² bylo nanášeno 110 ± 10 mg testovaného FFS. V časových intervalech 1 minuta byl zaznamenáván úbytek hmotnosti systémů. Průběh evaporace rozpouštědla byl vyhodnocen jako procentuální podíl hmotnosti filmu na hmotnosti rozpouštědla.

$$E (\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_A} \cdot 100$$

E (%) evaporace rozpouštědla

m_t hmotnost filmu v čase t

m₀ hmotnost filmu v čase 0

m_A hmotnost rozpouštědla ve FFS

Tabulka 6: Složení FFS pro hodnocení evaporace rozpouštědla

| Polymer | Plastifikátor | Rozpouštědlo |
|---------|---|--------------|
| PLGA | 10 % methyl-salicylát 10 % ethyl-pyruvát bez plastifikátoru | ethyl-acetát |
| | 10 % methyl-salicylát 10 % ethyl-pyruvát bez plastifikátoru | aceton |

2.6 SEM

Rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie (SEM) byla provedena na Katedře fyziky, Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Mikrostruktura *in situ* vytvořených filmů byla zkoumána pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko) při urychlovacím napětí 15 kV. Byl testován komerční přípravek Lamisil Once, *in situ* film tvořený lineárním PLGA, 10 % CBD bez plastifikátoru nebo změkčený 10 % methyl-salicylátu, ethyl-pyruvátu nebo ektoinu.

2.7 Měření adhezivních vlastností

Měření adhezivních vlastností bylo realizováno na rotačním reometru Kinexus Pro+. Byla zvolena sekvence *rSolution_0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements*.

Pro měření byla použita horní geometrie PU20 – deska o průměru 20 mm. Před nanesením vzorku byla dolní geometrie vyhřáta na teplotu 32 °C. Byly zadány parametry testu (Tabulka 6). Dolní geometrie byla vyjmuta z přístroje, vytárována na vahách a pomocí plastového kapátka bylo do středu geometrie naváženo 0,10 g FFS. Geometrie se standardně naneseným vzorkem byla upevněna zpět do přístroje. Po předem stanovenou dobu (5 min nebo 10 min) se nechal vzorek na spodní geometrii, aby došlo k evaporaci organického rozpouštědla, potom byl spuštěn test. Horní geometrie sjela dolů, přitlačila nanesený vzorek tak, aby byla dosažena kontaktní síla 1 N působící po dobu 30 s. Následovalo odtržení horní geometrie od dolní geometrie. Po skončení testu byly obě geometrie vyčištěny acetonem. Byla zaznamenána maximální síla potřebná pro oddělení geometrií F (N), plocha pod křivkou síla-čas A (N/s) a čas potřebný k poklesu maximální síly o 90 % t (s). Byly měřeny tři nově nanesené vzorky. Byl vypočten průměr a směrodatná odchylka průměru.

Byla měřena adhezivita komerčního přípravku Lamisil® Once. Byla testována adhezivita FFS tvořených PLGA polymerem s obsahem 10 % CBD bez plastifikátoru nebo plastifikovaných 10 % MS, EP nebo ektoinu. Dále byly měřeny FFS tvořeny polymery PLGA, A2, A4 bez obsahu CBD, plastifikované 10 % methylsalicylátem, ethyl-pyruvátém nebo ektoinem Jako rozpouštědlo byl vždy použit ethyl-acetát. Poměr polymerní soustavy a organického rozpouštědla ve FFS byl 1:1 nebo 1:3. Byla zjišťovaná adhezivita po evaporaci rozpouštědla po dobu 5 min a 10 minut.

Tabulka 7: Přehled parametrů sekvence *rSolution_0019* pro měření adhezivity

| | |
|--|---------|
| Rychlost pohybu horní geometrie (<i>Gapping Speed</i>) | 10 mm/s |
| Vzdálenost horní-dolní geometrie před spuštěním testu (<i>Final Gap</i>) | 50 mm |
| Kontaktní doba (<i>Contact time</i>) | 30 s |
| Kontaktní síla (<i>Contact Force</i>) | 1 N |

3 VÝSLEDKY

3.1 DSC

Tabulka 8: Termické charakteristiky polymerů, plastifikátorů a plastifikovaných polymerů

| Materiál | T_e/T_g (°C) |
|-----------------------|---|
| Kanabidol (CBD) | 77,8 |
| Methyl-salicylát (MS) | 125,0 |
| Ethyl-pyruvát (EP) | 145,2 |
| Ektoin (ECT) | 64,9 |
| PLGA | 29,8 |
| A2 | 32,6 |
| A4 | 36,5 |
| A2 + 7,5 % MS | 24,3 |
| A2+ 7,5 % EP | 17,7 |
| A2 + 15 % EP | 13,1 |
| A2 + 10 % ECT | 50,0 |
| A2 + 10 % CBD | 19,4 |

3.2 Doba evaporace rozpouštědla

Tabulka 9: Evaporace ethyl-acetátu z FFS plastifikovaného 10 % methyl-salicylátu

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|------|
| 0 | 117,90 | - | - | - |
| | 119,02 | | | |
| | 116,08 | | | |
| 1 | 81,97 | 38,1 | 37,0 | 4,6 |
| | 88,60 | 31,9 | | |
| | 78,10 | 40,9 | | |
| 2 | 75,10 | 45,4 | 55,2 | 10,7 |
| | 68,10 | 53,5 | | |
| | 54,12 | 66,7 | | |
| 3 | 51,34 | 70,6 | 76,4 | 7,0 |
| | 48,01 | 74,6 | | |
| | 37,98 | 84,1 | | |
| 4 | 30,98 | 92,2 | 90,7 | 2,2 |
| | 35,21 | 88,0 | | |
| | 30,85 | 91,8 | | |
| 5 | 29,19 | 94,1 | 92,6 | 2,1 |
| | 33,15 | 90,2 | | |
| | 29,16 | 93,6 | | |
| 6 | 28,99 | 94,3 | 94,1 | 0,7 |
| | 30,14 | 93,3 | | |
| | 28,04 | 94,8 | | |
| 7 | 28,43 | 94,9 | 94,9 | 0,1 |
| | 28,58 | 95,0 | | |
| | 27,87 | 95,0 | | |
| 8 | 27,14 | 96,2 | 95,9 | 0,3 |
| | 28,01 | 95,6 | | |
| | 27,02 | 95,9 | | |
| 9 | 26,98 | 96,4 | 96,1 | 0,3 |
| | 27,80 | 95,8 | | |
| | 26,76 | 96,2 | | |
| 10 | 26,25 | 97,2 | 96,8 | 0,5 |
| | 27,43 | 96,2 | | |
| | 26,07 | 96,9 | | |

Tabulka 10: Evaporace ethyl-acetátu z FFS plastifikovaného 10 % ethyl-pyruvátém

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|------|
| 0 | 119,10 | - | - | - |
| | 110,52 | | | |
| | 111,87 | | | |
| 1 | 91,80 | 28,7 | 28,1 | 4,3 |
| | 89,70 | 23,5 | | |
| | 83,12 | 32,1 | | |
| 2 | 59,74 | 62,3 | 50,6 | 10,2 |
| | 71,98 | 43,6 | | |
| | 70,90 | 45,8 | | |
| 3 | 36,70 | 86,5 | 69,8 | 15,1 |
| | 60,09 | 57,0 | | |
| | 52,88 | 65,9 | | |
| 4 | 30,18 | 93,3 | 83,8 | 13,0 |
| | 31,80 | 89,0 | | |
| | 50,14 | 69,0 | | |
| 5 | 28,77 | 94,8 | 92,1 | 2,6 |
| | 29,18 | 92,0 | | |
| | 31,70 | 89,6 | | |
| 6 | 27,90 | 95,7 | 94,6 | 1,8 |
| | 28,76 | 92,5 | | |
| | 26,30 | 95,6 | | |
| 7 | 27,34 | 96,3 | 95,5 | 1,2 |
| | 27,28 | 94,1 | | |
| | 25,78 | 96,2 | | |
| 8 | 26,98 | 96,7 | 96,2 | 1,5 |
| | 26,99 | 94,5 | | |
| | 24,67 | 97,4 | | |
| 9 | 26,68 | 97,0 | 97,3 | 0,9 |
| | 25,15 | 96,6 | | |
| | 23,98 | 98,2 | | |
| 10 | 26,44 | 97,3 | 97,8 | 1,2 |
| | 24,70 | 97,1 | | |
| | 23,12 | 99,2 | | |

Tabulka 11: Evaporace ethyl-acetátu z FFS bez plastifikátoru

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|------|
| 0 | 110,62 | - | - | - |
| | 119,08 | | | |
| | 114,27 | | | |
| 1 | 70,10 | 45,8 | 38,0 | 8,6 |
| | 91,71 | 28,7 | | |
| | 78,28 | 39,4 | | |
| 2 | 43,23 | 76,2 | 68,7 | 10,9 |
| | 65,50 | 56,2 | | |
| | 46,78 | 73,8 | | |
| 3 | 29,18 | 92,0 | 87,1 | 6,6 |
| | 43,29 | 79,6 | | |
| | 32,35 | 89,6 | | |
| 4 | 27,37 | 94,1 | 91,9 | 2,5 |
| | 34,05 | 89,3 | | |
| | 29,79 | 92,4 | | |
| 5 | 26,44 | 95,1 | 93,1 | 2,1 |
| | 32,48 | 90,9 | | |
| | 28,90 | 93,4 | | |
| 6 | 26,02 | 95,6 | 93,8 | 1,8 |
| | 31,42 | 92,0 | | |
| | 28,44 | 93,9 | | |
| 7 | 25,64 | 96,0 | 94,5 | 1,9 |
| | 31,03 | 92,4 | | |
| | 27,45 | 95,0 | | |
| 8 | 25,44 | 96,3 | 95,1 | 2,0 |
| | 30,70 | 92,8 | | |
| | 26,20 | 96,3 | | |
| 9 | 25,21 | 96,5 | 95,5 | 1,8 |
| | 30,11 | 93,4 | | |
| | 26,04 | 96,5 | | |
| 10 | 25,08 | 96,7 | 95,7 | 1,7 |
| | 29,78 | 93,7 | | |
| | 25,89 | 96,7 | | |

Tabulka 12: Evaporace acetonu z FFS plastifikovaného 10 % methyl-salicylátem

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|-----|
| 0 | 120,12 | - | - | - |
| | 115,90 | | | |
| | 116,45 | | | |
| 1 | 52,10 | 70,8 | 67,2 | 6,9 |
| | 60,90 | 59,3 | | |
| | 49,80 | 71,5 | | |
| 2 | 41,89 | 81,4 | 84,4 | 2,8 |
| | 37,01 | 85,1 | | |
| | 35,56 | 86,8 | | |
| 3 | 34,76 | 88,8 | 88,5 | 0,9 |
| | 34,74 | 87,5 | | |
| | 33,32 | 89,2 | | |
| 4 | 28,74 | 95,1 | 91,4 | 3,4 |
| | 33,84 | 88,5 | | |
| | 32,04 | 90,6 | | |
| 5 | 26,15 | 97,8 | 92,7 | 4,5 |
| | 32,96 | 89,5 | | |
| | 31,86 | 90,8 | | |
| 6 | 26,02 | 97,9 | 93,1 | 4,2 |
| | 32,55 | 89,9 | | |
| | 31,12 | 91,6 | | |
| 7 | 25,78 | 98,2 | 94,0 | 3,7 |
| | 31,38 | 91,2 | | |
| | 30,09 | 92,7 | | |
| 8 | 25,46 | 98,5 | 94,4 | 3,6 |
| | 30,77 | 91,8 | | |
| | 20,99 | 92,8 | | |
| 9 | 25,22 | 98,8 | 95,2 | 3,2 |
| | 30,03 | 92,6 | | |
| | 28,70 | 94,2 | | |
| 10 | 25,10 | 98,9 | 95,4 | 3,0 |
| | 29,56 | 93,1 | | |
| | 28,56 | 94,3 | | |

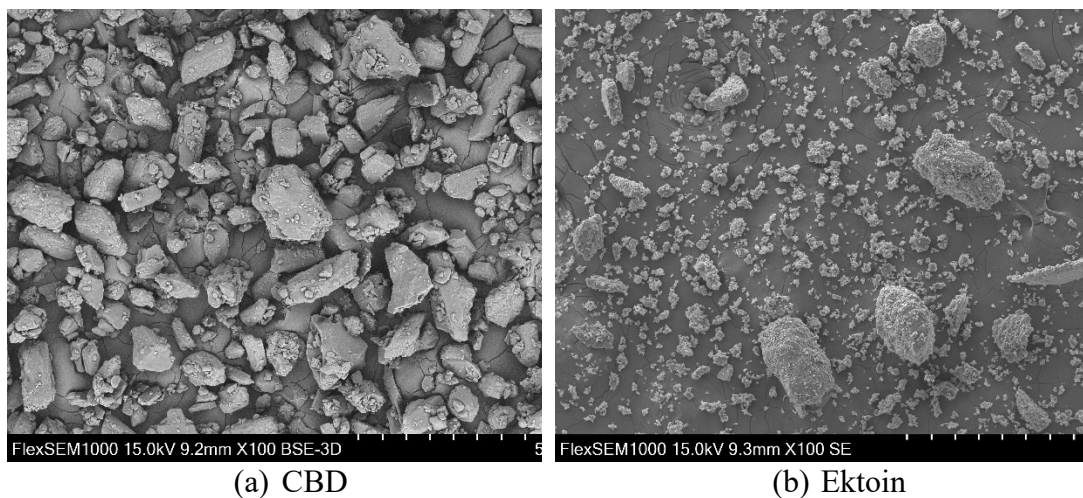
Tabulka 13: Evaporace acetonu z FFS plastifikovaného 10 % ethyl-pyruvátém

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|-----|
| 0 | 106,01 | - | - | - |
| | 112,79 | | | |
| | 119,36 | | | |
| 1 | 70,05 | 42,4 | 49,0 | 6,8 |
| | 68,97 | 48,6 | | |
| | 65,98 | 55,9 | | |
| 2 | 72,40 | 75,0 | 78,5 | 3,5 |
| | 41,81 | 78,7 | | |
| | 41,12 | 81,9 | | |
| 3 | 31,21 | 88,2 | 87,9 | 2,7 |
| | 35,99 | 85,1 | | |
| | 32,98 | 90,5 | | |
| 4 | 27,18 | 83,0 | 90,9 | 3,9 |
| | 34,77 | 86,5 | | |
| | 30,15 | 93,4 | | |
| 5 | 26,62 | 93,6 | 92,4 | 3,3 |
| | 32,85 | 88,6 | | |
| | 28,77 | 94,9 | | |
| 6 | 26,06 | 94,3 | 93,6 | 1,8 |
| | 30,11 | 91,6 | | |
| | 28,65 | 95,0 | | |
| 7 | 25,57 | 94,8 | 94,4 | 2,5 |
| | 30,09 | 91,7 | | |
| | 27,15 | 96,6 | | |
| 8 | 25,41 | 95,0 | 94,6 | 2,3 |
| | 29,67 | 92,1 | | |
| | 26,99 | 96,7 | | |
| 9 | 24,06 | 96,6 | 95,6 | 2,4 |
| | 28,99 | 92,9 | | |
| | 26,32 | 97,4 | | |
| 10 | 24,00 | 96,7 | 96,6 | 1,1 |
| | 26,65 | 95,5 | | |
| | 26,09 | 97,7 | | |

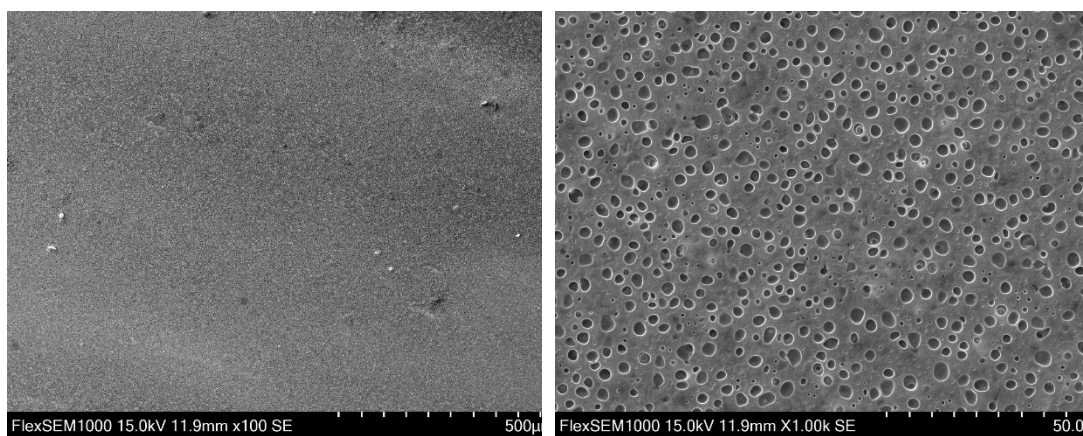
Tabulka 14: Evaporace acetonu z FFS bez plastifikátoru

| Čas (min) | Hmotnost filmu (mg) | E rozpouštědla (%) | Průměr (%) | SD |
|-----------|---------------------|--------------------|------------|-----|
| 0 | 114,56 | - | - | - |
| | 110,70 | | | |
| | 120,79 | | | |
| 1 | 62,10 | 57,2 | 56,6 | 2,2 |
| | 58,92 | 58,5 | | |
| | 68,43 | 54,2 | | |
| 2 | 31,08 | 91,1 | 87,6 | 5,3 |
| | 30,87 | 90,1 | | |
| | 41,98 | 81,6 | | |
| 3 | 29,28 | 93,1 | 91,6 | 4,1 |
| | 26,77 | 94,8 | | |
| | 36,74 | 87,0 | | |
| 4 | 28,48 | 93,9 | 94,5 | 1,1 |
| | 25,83 | 95,8 | | |
| | 30,12 | 93,8 | | |
| 5 | 28,01 | 94,4 | 95,3 | 1,8 |
| | 24,45 | 97,4 | | |
| | 29,78 | 94,2 | | |
| 6 | 27,67 | 94,8 | 95,7 | 1,9 |
| | 24,01 | 97,9 | | |
| | 29,53 | 94,4 | | |
| 7 | 27,48 | 95,0 | 96,4 | 1,6 |
| | 23,76 | 98,2 | | |
| | 28,14 | 95,9 | | |
| 8 | 27,31 | 95,2 | 96,6 | 1,7 |
| | 23,46 | 98,5 | | |
| | 28,03 | 96,0 | | |
| 9 | 27,19 | 95,3 | 96,8 | 1,8 |
| | 23,19 | 98,8 | | |
| | 27,84 | 96,2 | | |
| 10 | 27,08 | 95,5 | 97,4 | 1,8 |
| | 22,97 | 99,1 | | |
| | 26,43 | 97,6 | | |

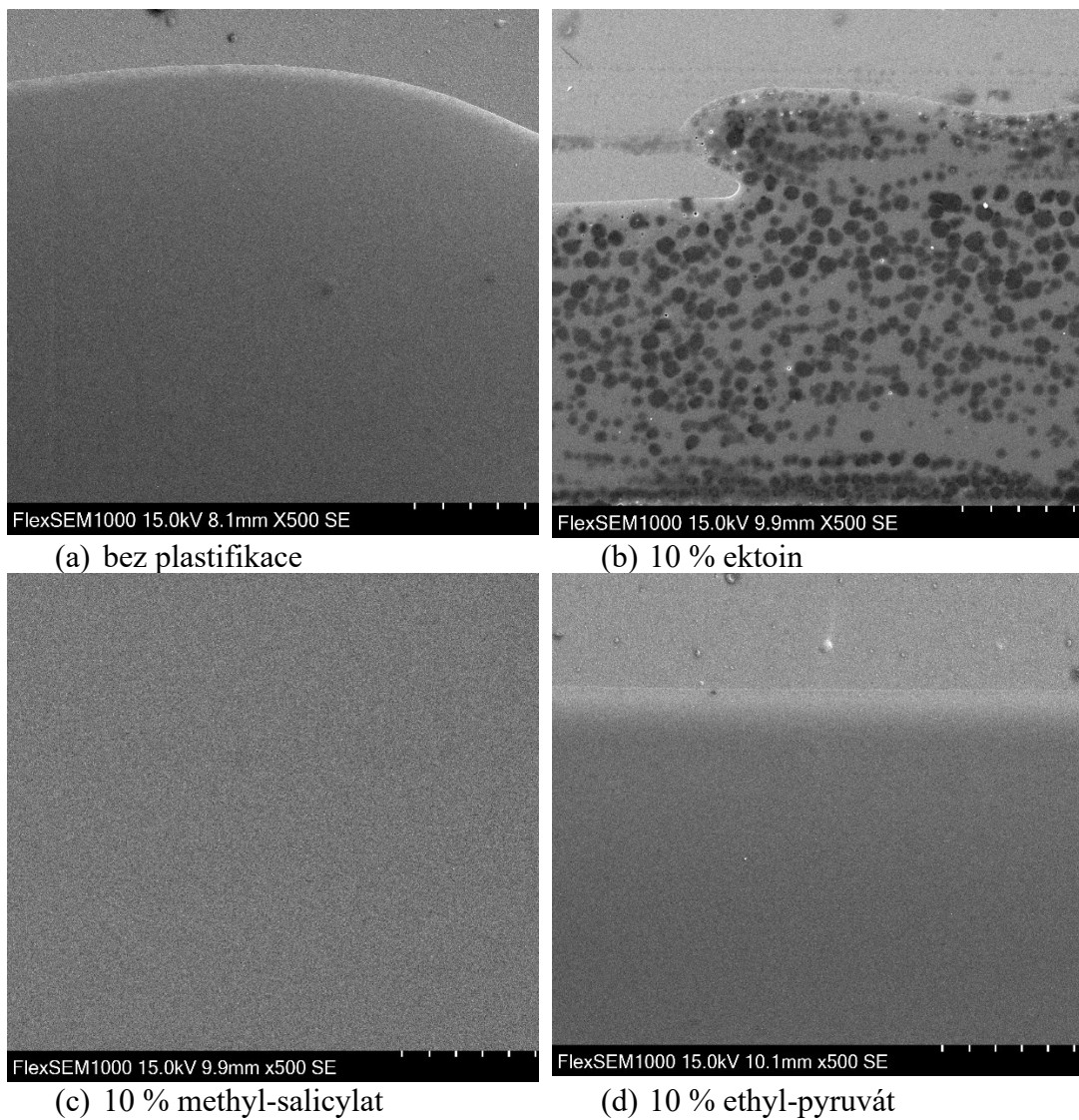
3.3 SEM



Obrázek 16: SEM snímek kanabidiolu (CBD) a ektoinu



Obrázek 17: SEM povrchu filmu Lamisilu Once



Obrázek 18: SEM snímek povrchu neplastifikovaného (a) a plastifikovaného (b-d) *in situ* filmu s obsahem 10 % CBD

3.4 Adhezivita FFS

Tabulka 15: Adhezivita komerčního přípravku Lamisil Once®

| Doba evaporace | 5 min | | | 10 min | | |
|----------------|-------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 6,274 | 0,4626 | 1,353 | 4,760 | 0,4592 | 0,966 |
| 2 | 6,229 | 0,4602 | 1,274 | 4,259 | 0,4332 | 0,842 |
| 3 | 4,869 | 0,4425 | 0,974 | 3,703 | 0,5085 | 0,901 |
| průměr | 5,791 | 0,455 | 1,2002 | 4,241 | 0,467 | 0,9028 |
| SD | 0,799 | 0,011 | 0,2002 | 0,529 | 0,038 | 0,0624 |

3.4.1 Adhezivita FFS obsahujících CBD

Tabulka 16: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, methyl-salicylátem a ethyl-acetátem

| Doba evaporace | 5 min | | | 10 min | | |
|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 12,71 | 0,4608 | 3,239 | 10,23 | 0,5496 | 2,345 |
| 2 | 12,22 | 0,5446 | 2,982 | 12,49 | 0,5665 | 3,148 |
| 3 | 11,52 | 0,5328 | 2,669 | 11,40 | 0,5267 | 2,723 |
| průměr | 12,150 | 0,513 | 2,9633 | 11,373 | 0,548 | 2,7387 |
| SD | 0,598 | 0,045 | 0,2855 | 1,130 | 0,020 | 0,4017 |

Tabulka 17: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, ethyl-pyruvátém a ethyl-acetátem

| Doba evaporace | 5 min | | | 10 min | | |
|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 15,30 | 0,6348 | 4,775 | 13,12 | 0,2673 | 3,562 |
| 2 | 12,94 | 0,6110 | 3,529 | 15,17 | 0,6271 | 4,709 |
| 3 | 13,09 | 0,6209 | 3,670 | 14,35 | 0,1665 | 4,162 |
| průměr | 13,777 | 0,622 | 3,9913 | 14,213 | 0,354 | 4,1443 |
| SD | 1,321 | 0,012 | 0,6823 | 1,032 | 0,242 | 0,5737 |

Tabulka 18: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, ektoinem a ethyl-acetátem

| Doba evaporace | 5 min | | | 10 min | | |
|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 11,49 | 0,5479 | 2,726 | 11,22 | 0,5714 | 2,733 |
| 2 | 10,21 | 0,5039 | 2,275 | 14,45 | 0,6134 | 4,209 |
| 3 | 14,09 | 0,6222 | 3,981 | 12,19 | 0,5381 | 2,956 |
| průměr | 11,930 | 0,558 | 2,9940 | 12,620 | 0,574 | 3,2993 |
| SD | 1,977 | 0,060 | 0,8840 | 1,657 | 0,038 | 0,7956 |

Tabulka 19: Adhezivita FFS tvořeného PLGA a ethyl-acetátem

| Doba evaporace | 5 min | | | 10 min | | |
|----------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 12,26 | 0,5430 | 3,044 | 13,33 | 0,5576 | 3,529 |
| 2 | 12,95 | 0,5619 | 3,385 | 11,54 | 0,5956 | 2,897 |
| 3 | 14,75 | 0,6183 | 4,561 | 12,73 | 0,5589 | 3,321 |
| průměr | 13,320 | 0,574 | 3,6633 | 12,533 | 0,571 | 3,2490 |
| SD | 1,286 | 0,039 | 0,7959 | 0,911 | 0,022 | 0,3221 |

3.4.2 Adhezivita FFS bez léčiva

Tabulka 20: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, methyl-salicylátem a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 11,71 | 0,5948 | 3,064 | 18,16 | 0,8083 | 8,279 |
| 2 | 13,29 | 0,6325 | 3,764 | 11,83 | 0,5591 | 3,006 |
| 3 | 13,97 | 0,5842 | 3,916 | 2,75 | 0,4734 | 0,642 |
| průměr | 12,990 | 0,604 | 3,5813 | 10,914 | 0,614 | 3,9756 |
| SD | 1,159 | 0,025 | 0,4544 | 7,744 | 0,174 | 3,9098 |

Tabulka 21: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, ethyl-pyruvátém a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 14,89 | 0,6648 | 4,665 | 17,27 | 0,7694 | 6,950 |
| 2 | 15,68 | 0,6758 | 5,110 | 13,68 | 0,5766 | 3,908 |
| 3 | 14,71 | 0,5226 | 4,376 | 0,96 | 0,4571 | 0,243 |
| průměr | 15,093 | 0,621 | 4,7170 | 10,638 | 0,601 | 3,7004 |
| SD | 0,516 | 0,085 | 0,3698 | 8,568 | 0,158 | 3,3582 |

Tabulka 22: Adhezivita FFS tvořeného PLGA, ektoinem a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|-------|--------|---------|-------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 5,08 | 0,4560 | 1,048 | 0,30 | 0,5634 | 0,174 |
| 2 | 5,09 | 0,4530 | 1,024 | 5,30 | 0,4474 | 1,195 |
| 3 | 7,70 | 0,4527 | 0,571 | 0,01 | 1,8360 | 0,263 |
| průměr | 5,956 | 0,454 | 0,8810 | 1,870 | 0,949 | 0,5440 |
| SD | 1,510 | 0,002 | 0,2687 | 2,976 | 0,770 | 0,5655 |

Tabulka 23: Adhezivita FFS tvořeného A2, methyl-salicylátem a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 10,90 | 0,5838 | 2,700 | 17,82 | 0,8168 | 7,906 |
| 2 | 10,14 | 0,5626 | 2,483 | 16,41 | 0,6971 | 5,713 |
| 3 | 11,62 | 0,5122 | 2,789 | 12,08 | 0,5570 | 2,995 |
| průměr | 10,887 | 0,553 | 2,6573 | 15,437 | 0,691 | 5,5380 |
| SD | 0,740 | 0,037 | 0,1574 | 2,991 | 0,130 | 2,4602 |

Tabulka 24: Adhezivita FFS tvořeného A2, ethyl-pyruvátém a ethyl-acetátém po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 11,66 | 0,5377 | 3,082 | 19,37 | 1,1160 | 14,000 |
| 2 | 13,71 | 0,6028 | 3,966 | 18,62 | 0,9195 | 10,400 |
| 3 | 13,42 | 0,5819 | 3,624 | 18,97 | 1,0260 | 11,760 |
| průměr | 12,930 | 0,574 | 3,5573 | 18,987 | 1,021 | 12,0533 |
| SD | 1,109 | 0,033 | 0,4458 | 0,375 | 0,098 | 1,8178 |

Tabulka 25: Adhezivita FFS tvořeného A2, ektoinem a ethyl-acetátém po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|-------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 9,39 | 0,4958 | 2,058 | 15,73 | 0,6671 | 5,291 |
| 2 | 10,69 | 0,5091 | 2,350 | 15,63 | 0,6471 | 5,375 |
| 3 | 9,78 | 0,4755 | 2,055 | 13,13 | 0,5714 | 3,616 |
| průměr | 9,955 | 0,493 | 2,1543 | 14,830 | 0,629 | 4,7607 |
| SD | 0,666 | 0,017 | 0,1695 | 1,473 | 0,050 | 0,9922 |

Tabulka 26: Adhezivita FFS tvořeného A4, ethyl-pyruvátém a methyl-salicylátém po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 14,29 | 0,6722 | 4,588 | 17,97 | 0,8246 | 8,254 |
| 2 | 13,12 | 0,5581 | 3,573 | 17,20 | 0,7454 | 6,603 |
| 3 | 13,08 | 0,6082 | 3,630 | 18,27 | 0,8246 | 8,331 |
| průměr | 13,497 | 0,613 | 3,9303 | 17,813 | 0,798 | 7,7293 |
| SD | 0,687 | 0,057 | 0,5703 | 0,552 | 0,046 | 0,9762 |

Tabulka 27: Adhezivita FFS tvořeného A4, ethyl-pyruvátém a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 15,40 | 0,6556 | 5,228 | 18,34 | 0,8760 | 9,202 |
| 2 | 13,42 | 0,6033 | 3,743 | 15,08 | 0,6137 | 4,814 |
| 3 | 14,40 | 0,6171 | 4,487 | 6,52 | 0,4957 | 1,345 |
| průměr | 14,407 | 0,625 | 4,4860 | 13,312 | 0,662 | 5,1203 |
| SD | 0,990 | 0,027 | 0,7425 | 6,108 | 0,195 | 3,9374 |

Tabulka 28: Adhezivita FFS tvořeného A4, ektoinem a ethyl-acetátem po 10 min evaporace

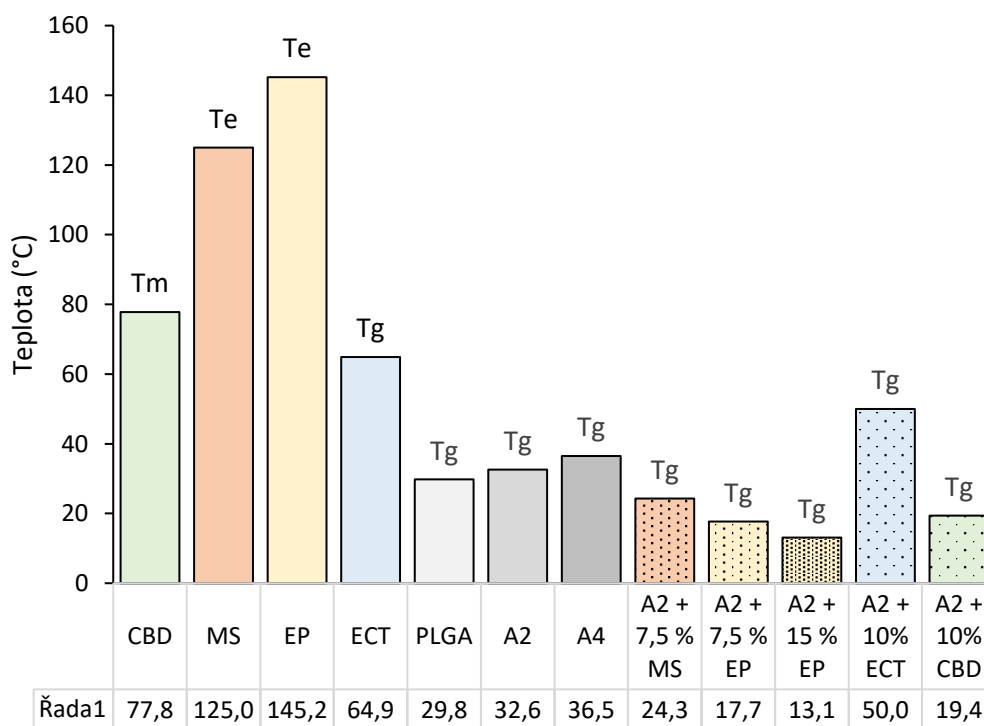
| Zředění | 1:1 | | | 1:3 | | |
|---------|-------|--------|---------|-------|--------|---------|
| Měření | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 4,74 | 0,5131 | 1,249 | 7,76 | 0,5161 | 1,672 |
| 2 | 9,13 | 0,4863 | 1,892 | 7,81 | 0,4756 | 1,669 |
| 3 | 8,31 | 0,5544 | 2,045 | 8,99 | 0,5263 | 2,028 |
| průměr | 7,394 | 0,518 | 1,7287 | 8,184 | 0,506 | 1,7897 |
| SD | 2,332 | 0,034 | 0,4224 | 0,695 | 0,027 | 0,2064 |

4 DISKUZE

V předložené diplomové práci byly testovány adhezivní vlastnosti FFS tvořených poly(mléčnou-*ko*-glykolovou) kyselinou (PLGA) lineární nebo větvené struktury. Nosiče byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie a mají různý stupeň větvení, různou molární hmotnost a z toho vyplývající odlišnou hydrofilitu, stupeň bobtnání a eroze. Polymery byly plastifikovány třemi různými plastifikátory, a to ethyl-pyruvát, methyl-salicylát nebo ektoinen. Jako rozpouštědlo polymerního systému byl testován zejména aceton a ethyl-acetát. Studovány byly i vlastnosti filmů obsahujících kanabidiol (CBD) a vlastnosti komerčního přípravku Lamisil Once®.

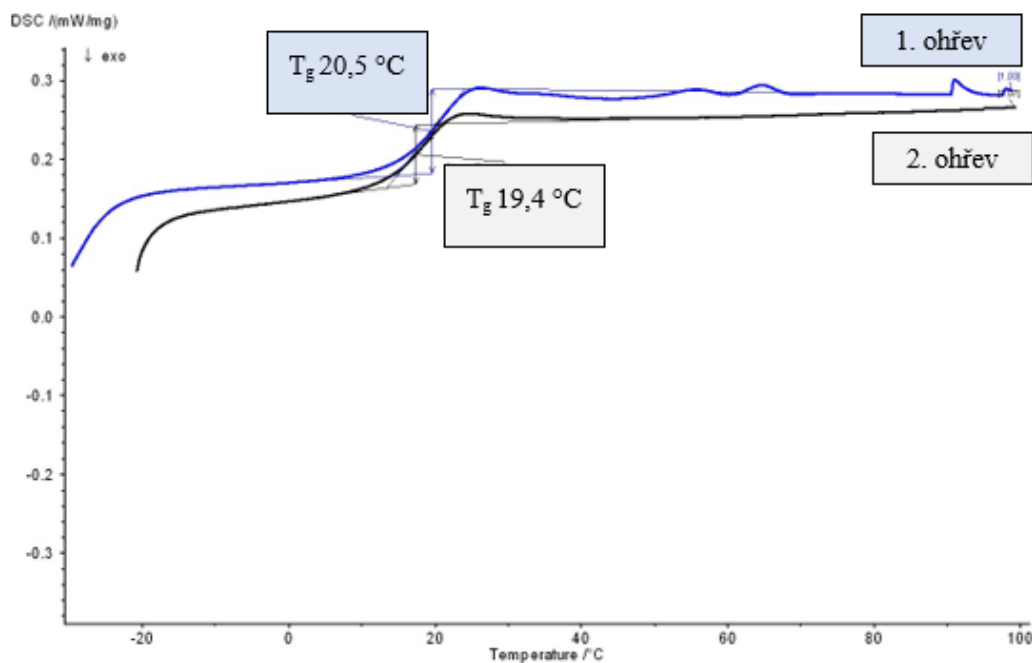
4.1 DSC

Byly studovány termické vlastnosti CBD, plastifikátorů, polymerů, plastifikovaných polymerů a *in situ* filmů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (Obrázek 19). Byl zvolen teplotní režim -20 °C až 60 °C, resp. 250 °C a rychlost ohřevu 10 K/min (viz. Obrázek 15). Teplota tání (T_m) byla odečtena z prvního ohřevu, teplota skelného přechodu (T_g) z druhého ohřevu v inflexním bodě.



Obrázek 19: Termické charakteristiky komponent FFS

CBD je krystalický prášek, experimentálně zjištěná T_m byla $77,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. U polymerů použitých pro formulaci FFS byly hodnoty T_g v rozmezí $29,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledky ukázaly, že T_g lineárního PLGA byla v porovnání s větvenými polymery nižší. Je to dáno zejména nejnižší molární hmotností. Nejvyšší teplotu skelného přechodu vykazoval větvený polymer A4 s nejvyšší molární hmotností a stupněm větvení (viz. Tabulka 2). Experimentálně stanovená teplota evaporace methyl-salicylátu byla nižší než u ethyl-pyruvátu. Byl studován vliv plastifikátorů (MS, EP, ECT) a léčiva (CBD) na termické chování filmů. Bylo zjištěno, že EP je účinnější plastifikátor než MS a s rostoucí koncentrací plastifikátoru se T_g snižuje. Při použití ektoinu ovšem došlo ke zvýšení T_g . Ektoin má antiplastifikační účinek z důvodu jeho omezené mísitelnosti s polymerem (viz. Obrázek 18b). Na DSC záznamu filmu s inkorporovaným CBD (Obrázek 20) není patrný pík krystalické fáze, ale skelný přechod amorfní fáze CBD. Na křivce druhého ohřevu byl zaznamenán jen jeden skelný přechod, a to při nižší teplotě než je T_g polymeru. CBD působí ve filmu jako plastifikátor.

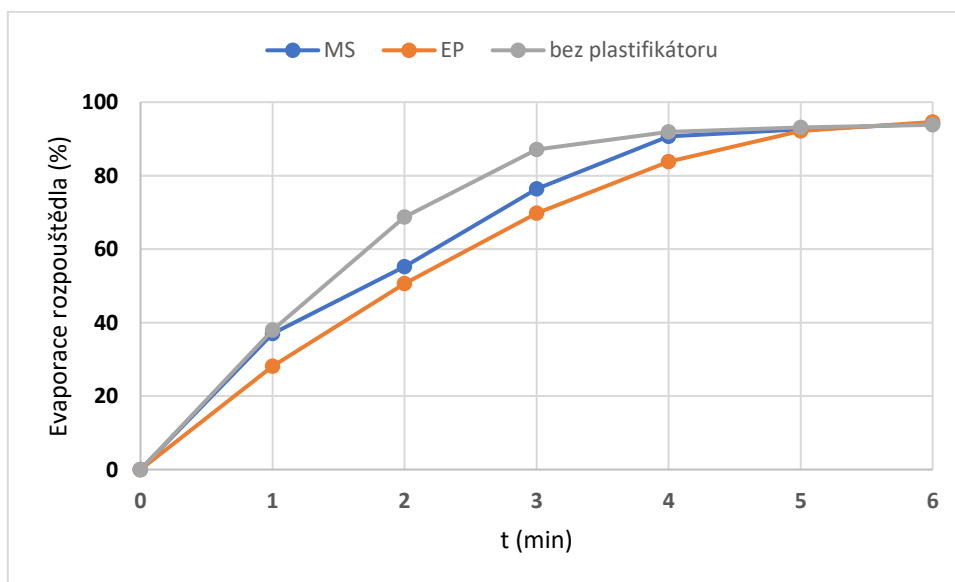


Obrázek 20: DSC sken filmu s CBD

4.2 Evaporace organického rozpouštědla

Byla zjišťována doba evaporace organického rozpouštědla z tenkého filmu definované plochy po aplikaci FFS na podložní sklíčko. Evaporace byla testována pouze u filmů tvořených lineárním PLGA, protože se nepředpokládá výrazný vliv typu polymeru na dobu evaporace. Byla testována evaporace z neplastifikovaného filmu nebo z filmu plastifikovaného 10 % methyl-salicylátu nebo ethyl-pyruvátu. Poměr polymerní soustavy a organického rozpouštědla byl 1:3.

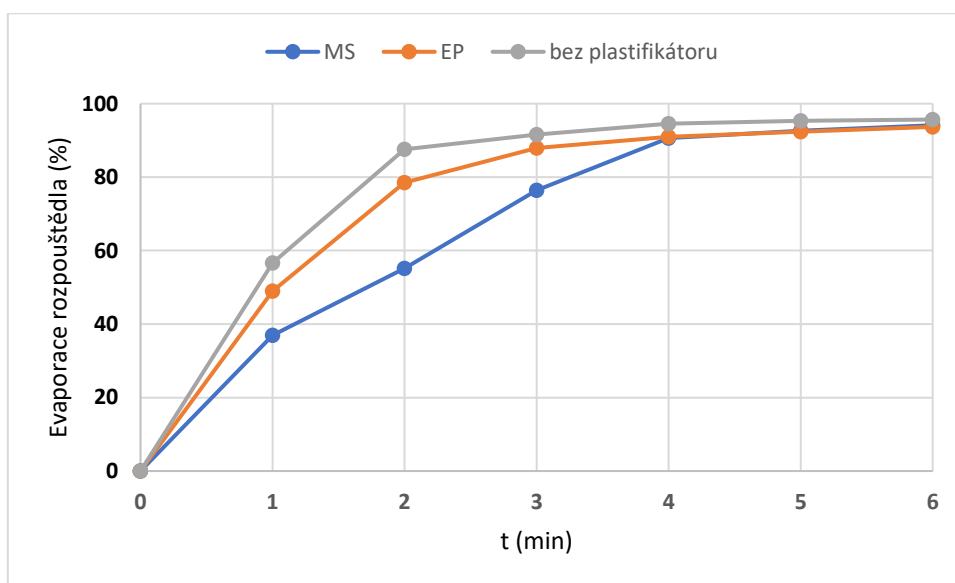
Průběh evaporace ethyl-acetátu (EA) uvádí Obrázek 21. Z grafu je patrné, že po jedné minutě se nejméně EA, a to 28 %, se odpařilo z filmu plastifikovaného EP. Z neplastifikovaného filmu a filmu plastifikovaného methyl-salicylátem se odpařilo 38 %. Od druhé minuty je již viditelný rozdíl v evaporaci EA z neplastifikovaného filmu a filmů plastifikovaných. Ve čtvrté minutě byla evaporace z filmu bez plastifikátoru a z filmu plastifikovaného methyl-salicylátem stejná (92 %), u filmu plastifikovaného ethyl-pyruvátem byla 84 %. V páté minutě došlo k evaporaci 93 % organického rozpouštědla ve všech FFS. Evaporace filmu bez plastifikátoru a filmu plastifikovaného ethyl-pyruvátem měla přibližně lineární průběh.



Obrázek 21: Evaporace ethyl-acetátu z polymerního nosiče PLGA

Průběh evaporace acetonu uvádí Obrázek 22. Z grafu je patrné, že po jedné minutě se z filmu plastifikovaného methyl-salicylátem odpařilo nejméně organického rozpouštědla 37 %, z filmu plastifikovaného ethyl-pyruvátém 49 % a z filmu bez plastifikátoru se odpařilo nejvíce 57 %. Ve druhé minutě se z filmu plastifikovaného methyl-salicylátem se odpařilo jen 55 %, a z filmu plastifikovaného ethyl-pyruvátém a neplastifikovaného 79-88 %. V paté minutě došlo k evaporaci 90-95 % organického rozpouštědla u všech testovaných filmů. Evaporace filmu bez plastifikátoru a filmu plastifikovaného ethyl-pyruvátém měla téměř lineární průběh.

U evaporace z filmu plastifikovaného methyl-salicylátem pozorujeme výkyvy v průběhu evaporace jak u organického rozpouštědla acetonu, tak i ethyl-acetátu.



Obrázek 22: Evaporace acetonu z polymerního nosiče PLGA

Z Obrázků 21 a 22 vyplývá, že evaporace organického rozpouštědla z filmu bez plastifikátoru byla rychlejší než u filmu plastifikovaných methyl-salicylátem nebo ethyl-pyruvátém. Během 5 minut u všech filmu dochází k evaporaci více než 90 % organického rozpouštědla.

4.3 SEM

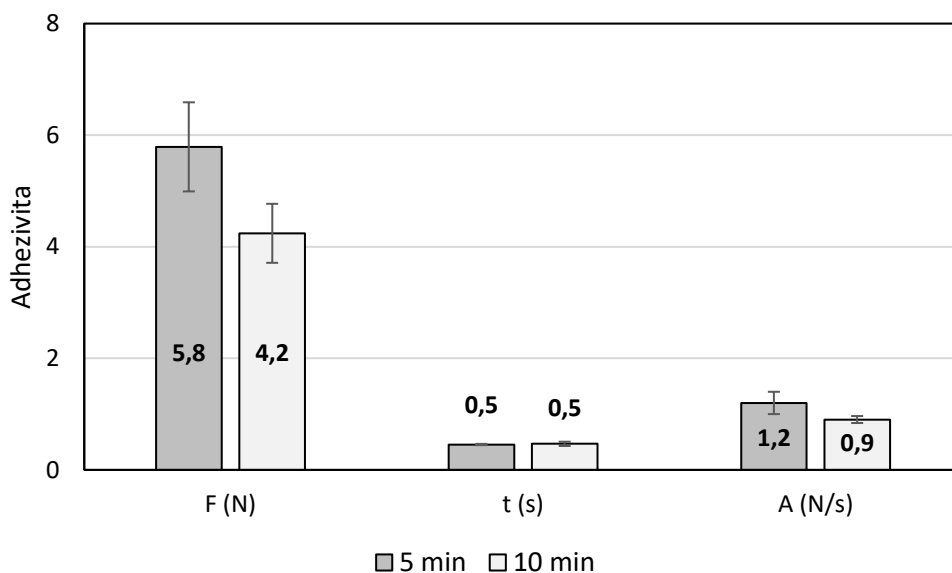
Na Obrázku 16 je snímek částic kanabidiolu (a) a ektoinu (b). Jedná se o pevné částice nepravidelného tvaru a různé velikosti. Byla provedena SEM povrchu filmů komerčního přípravku Lamisil Once při různém zvětšení a výsledné snímky jsou uvedeny na Obrázku 17. Při zvětšení 500 μ m je patrně, že Lamisil® once tvoří film s hladkým povrchem, bez prasklin. Při zvětšení x1000 jsou viditelné krátery, které se vytvořily evaporací organického rozpouštědla z viskózního FFS. Dále byla provedena SEM povrchu PLGA filmů s obsahem 10 % CBD bez plastifikátoru nebo s 10 % plastifikátoru (ektoin, methyl-salicylát, ethyl-pyruvát). Snímky jsou uvedeny na Obrázku 18. Neplastifikovaný film a filmy plastifikované MS nebo ES mají homogenní strukturu a hladký povrch bez pórů a strukturálních defektů, což potvrzuje mísitelnost plastifikátorů s PLGA a rozpuštění CBD. Filmu plastifikovaný ektoinem není homogenní, protože hydrofilní ektoin není s hydrofobním PLGA mísitelný. Homogenní dispergaci ektoinu do PLGA bude nutno zajistit odděleným rozpuštěním PLGA a ektoinu ve vhodných, navzájem mísitelných rozpouštědlech.

4.4 Adhezivní vlastnosti

Adhezivita *in situ* filmů byla testována na absolutním rotačním reometru testem *rSolution_0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements*. Pro vyhodnocení byla zvolena síla F (N) potřebná k odtržení vzorku od dolní geometrie. Dále plocha A (N/s) pod křivkou síla/čas, vyjadřující poměr adhezivních a kohezivních sil, a čas t (s) jako míra eliminace adhezivních sil. Testy adheze byly realizovány s konstantní hmotností vzorku, při teplotě 25 °C, kontaktní době 30 s, kontaktní síle 1 N a rychlosti odtržení vzorku od podkladu 10 mm/s. Konstantní nastavení všech těchto parametrů a důležité pro standardní provedení testů, jejich validaci a možnosti porovnání získaných výsledků.

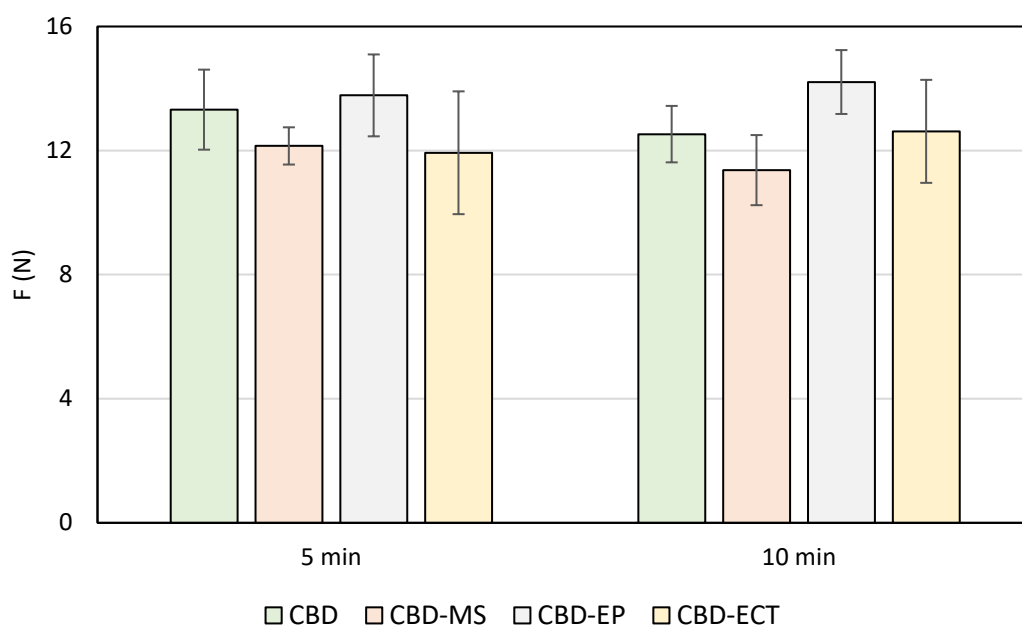
Byla testována adhezivita komerčního přípravku Lamisil® Once, který byl zvolen jako referenční přípravek pro porovnání s formulovanými PLGA *in situ* filmy. Léčivý přípravek obsahuje terbinafin hydrochlorid, kopolymer akryloyldimethyltaurat a ethanol.

Na Obrázku 23 je porovnána adhezivita Lamisilu® Once po 5 minutách a po 10 minutách evaporace ethanolu. Adhezivita vyjádřená jako maximální síla F (N) a plocha A (N/s) s dobou evaporace klesaly. Vliv doby evaporace na eliminaci adhezivních sil nebyl zjištěn. Další testy adheze byly vyhodnoceny pouze pomocí maximální síly F .



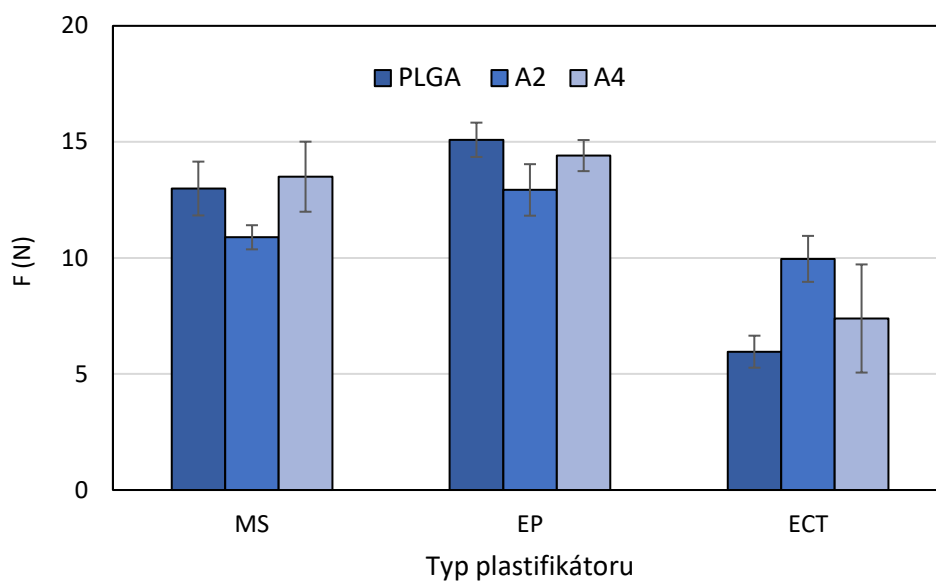
Obrázek 23: Vliv doby evaporace ethanolu na adhezivitu Lamisilu Once

Byla hodnocena adhezivita *in situ* filmů tvořených plastifikovaným nebo neplastifikovaným lineárním PLGA s inkorporovaným kanabidiolem po 5 minutách a po 10 minutách evaporace rozpouštědla. Jak je vidět na Obrázku 24, vyšší adhezivitu vykazoval neplastifikovaný film a film plastifikovaný EP, a to po 5 minutách i po 10 minutách od aplikace FFS. Zjištění je v souladu s výsledky DSC, které prokázaly vyšší plastifikaci PLGA filmů při použití BBD a EP. Z toho lze dedukovat, že adhezivita je vyšší u filmů, které jsou více plastifikovány, a to pravděpodobně díky jejich nižší viskozitě a lepšímu rozprostření soustavy po evaporaci organického rozpouštědla. Jelikož nebyl prokázán rozdíl v adhezivitě *in situ* filmů po 5 min a po 10 min od aplikace, což potvrzují i výsledky testů doby evaporace organického rozpouštědla, v dalších testech byla adhezivita testována už jen v čase 5 min po nanesení vzorku. Za tuto dobu se vypaří více než 90 % organického rozpouštědla a kapalný FFS se transformuje na elastický tenký film, pevně adherující k podkladu.



Obrázek 24: Vliv plastifikace a doby evaporace na adhezivitu PLGA filmů s CBD

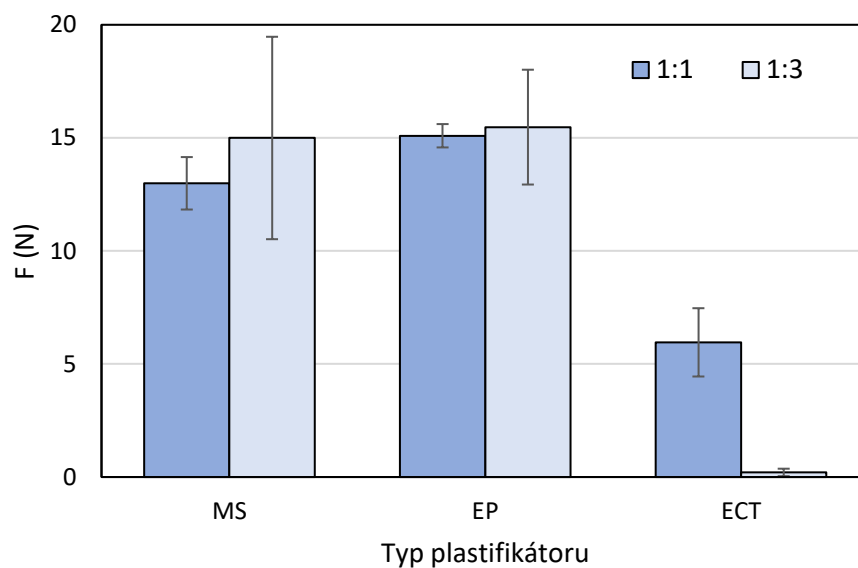
Na Obrázku 25 je porovnána adhezivita *in situ* filmů tvořených různým typem polymeru. Byla zjištěna nižší adhezivita filmů tvořených polymerem A2 než filmů tvořených lineárním PLGA a polymerem A4. Důvodem je nižší molární hmotnost v kombinaci s větvenou konstitucí polymeru (viz. Tabulka 2). Významněji než typ polymeru ovlivňuje adhezivitu typ plastifikátoru. Nejnížší adheze byla pozorována u polymerů plastifikovaných ektoinem. Mohlo by to být vysvětleno tím, že ektoin je hydrofilní a není homogenně dispergován v systému a nedostatečně plastifikuje polymer.



Obrázek 25: Vliv typu polymeru na adhezivitu FFS

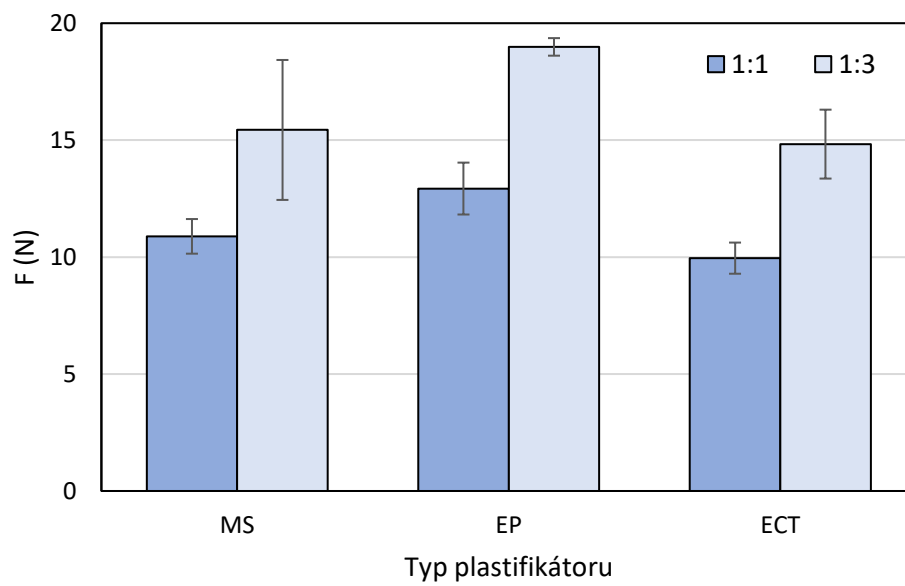
Dále byl testován vliv koncentrace FFS, tedy poměru polymerní soustavy (polymer, plastifikátor, léčivo) a organického rozpouštědla na adhezivní vlastnosti *in situ* filmů. Při vyšším zředění je viskozita FFS nižší. Po aplikaci konstantního množství FFS na definovanou plochu a evaporaci organického rozpouštědla se vytvořený tenčí film, což by se mělo projet v jeho adhezivitě.

Jak je vidět na Obrázku 26, u filmů tvořených lineárním PLGA byla nejnižší adhezivita pozorována při plastifikaci ektoinem. Ve zředění 1:3 systém téměř nevykazoval žádné adhezivní vlastnosti. PLGA filmy plastifikované MS a EP vykazovaly srovnatelnou adhezivitu při ředění 1:1 i 1:3.

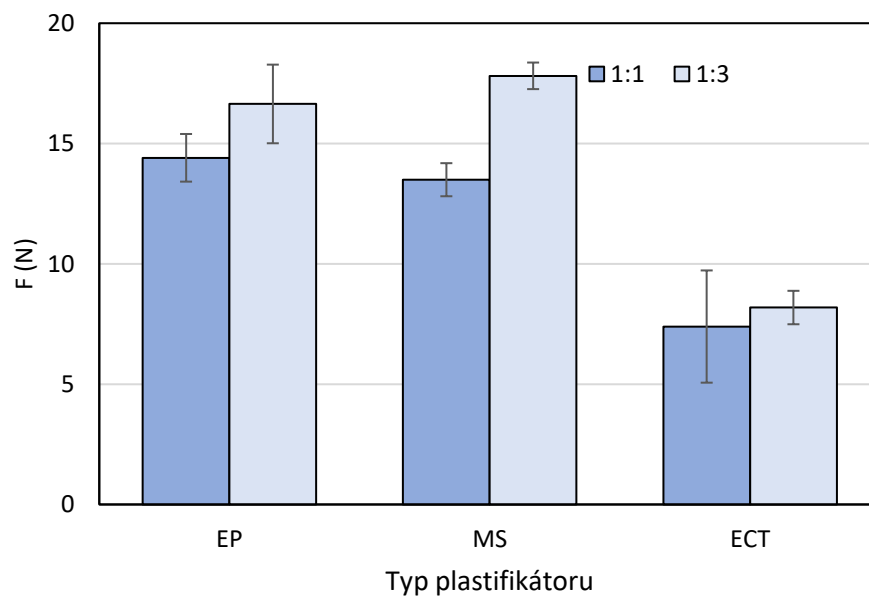


Obrázek 26: Vliv poměru polymerní soustavy a organického rozpouštědla na adhezivitu FFS tvořeného polymerem PLGA

Jinak tomu bylo u filmů tvořených polymerem polymery A2 (Obrázek 27) a A4 (Obrázek 28). Polymer A4 má vyšší molární hmotnost a vyšší stupeň větvení (Tabulka 2), předpokládá se tedy vyšší počet koncových karboxylových skupin a z toho plynoucí nižší hydrofobicita. Byl prokázán vliv koncentrace FFS na adhezivitu in situ filmů tvořených polymerem A2 i A4. Při zředění 1:3 všechny filmy vykazovaly větší adhezivitu.



Obrázek 27: Vliv poměru polymerní soustavy a organického rozpouštědla na adhezivitu FFS tvořeného polymerem A2



Obrázek 28: Vliv poměru polymerní soustavy a organického rozpouštědla na adhezivitu FFS tvořeného polymerem A4

ZÁVĚRY

Byly úspěšně formulovány kapalně systémy pro tvorbu filmů *in situ* (FFS) tvořené PLGA deriváty lineární a větvené struktury, plastifikované methyl-salicylátem nebo ethyl-pyruvát, určené pro lokální aplikaci kanabidolu. Účinnější plastikaci poskytuje ethyl-pyruvát. Ektoin má antiplastifikační vlastnosti z důvodu omezené mísitelnosti s PLGA. Doba evaporace organického rozpouštědla z FFS je ovlivněna použitým organickým rozpouštědlem a typem plastifikátoru. U neplastifikovaných polymeru dochází k rychlejší evaporaci organického rozpouštědla. Evaporace více než 90 % rozpouštědla nastane za dobu 5 minut. Byla validována metodika testování adhezivní *in situ* filmů na absolutním rotačním reometru pomocí modifikovaného tahového testu. Mezi významné faktory ovlivňující adhezivní vlastnosti patří zředění FFS a typ a koncentrace plastifikátoru. Homogenní struktura *in situ* filmů, hladký povrch bez pórů a strukturálních defektů byly prokázány pomocí SEM. DSC potvrdila, že inkorporovaný kanabidiol je v PLGA filmu rozpuštěný.

LITERATURA

1. Věříš A. H. *Characterization of PLGA-Based Film Forming Systems*. Rigorózní práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.; 2021.
2. Rychterová G. *Plastifikované polymerní soustavy s kyselinou salicylovou*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2016.
3. Soukupová J. *Adhezivní vlastnosti tenkých filmů na bázi plastifikovaných polyesterů*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlová, Farmaceutická fakulta; 2019.
4. Kodytková S. *Dissolution of a drug from thin films based on plasticized PLGA derivatives*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlová, Farmaceutická fakulta.
5. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2017;12(6):487-497. doi:10.1016/j.ajps.2017.07.004
6. McAuley WJ, Caserta F. Film-Forming and Heated Systems. In: *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015:97-124. doi:10.1002/9781118734506.ch5
7. Tran TTD, Tran PHL. Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery: The Potential for Efficient Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(6):290. doi:10.3390/pharmaceutics11060290
8. Kovács A, Kis N, Budai-Szücs M, et al. QbD-Based Investigation of Dermal Semisolid in situ Film-Forming Systems for Local Anaesthesia. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:5059-5076. doi:10.2147/DDDT.S279727
9. Wang J, Sun H, Jia W, et al. Construction of Imatinib Controlled Release Film-Forming System Based on Drug Ion-Pair and Oligomeric Ionic Liquids for the Long Local Therapy of Cutaneous Melanoma. *AAPS PharmSciTech*. 2023;24(4):87. doi:10.1208/s12249-023-02546-3
10. Moeller BC, Sams RA, Guinjab-Cagmat J, Szabo NJ, Colahan P, Stanley SD. An interlaboratory study of the pharmacokinetics of testosterone following intramuscular administration to Thoroughbred horses: Interlaboratory study of the pharmacokinetics of testosterone. *J Vet Pharm and Ther*. 2011;34(6):588-593. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01277.x
11. Pünnel LC, Lunter DJ. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):932. doi:10.3390/pharmaceutics13070932
12. Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8870. doi:10.3390/ijms21228870

13. Carlini EA, Santos M, Claussen U, Bieniek D, Korte F. Structure activity relationship of four tetrahydrocannabinols and the pharmacological activity of five semi-purified extracts of *Cannabis sativa*. *Psychopharmacologia*. 1970;18(1):82-93. doi:10.1007/BF00402387
14. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8268-8273.
15. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses*. 2006;66(2):234-246. doi:10.1016/j.mehy.2005.08.026
16. Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9561-9566. doi:10.1073/pnas.160105897
17. Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem*. 2004;89(1):134-141. doi:10.1111/j.1471-4159.2003.02327.x
18. Venderová K, Růžicka E, Voríšek V, Visnovský P. Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Mov Disord*. 2004;19(9):1102-1106. doi:10.1002/mds.20111
19. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;150(5):613-623. doi:10.1038/sj.bjp.0707133
20. PubChem. Cannabidiol. Accessed March 24, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/644019>
21. MATERIAL SAFETY DATA SHEET (MSDS). Published online January 11, 2021.
22. Palmieri B, Laurino B, Vadalà M. A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars. *Clin Ter*. 2019;(2):93-99. doi:10.7417/CT.2019.2116
23. Marie, Willekens B, Delvaux V, et al. Sativex® (nabiximols) cannabinoid oromucosal spray in patients with resistant multiple sclerosis spasticity: the Belgian experience. *BMC Neurol*. 2021;21:227. doi:10.1186/s12883-021-02246-0
24. Snejdrova E, Podzimek S, Martiska J, Holas O, Dittrich M. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharm*. 2020;70(1):63-75. doi:10.2478/acph-2020-0011

25. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-2490. doi:10.1016/s0142-9612(00)00115-0
26. Chemical structure of the poly (D,L -lactide-co-glycolide) (PLGA). Accessed April 9, 2023. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-the-poly-D-L-lactide-co-glycolide-PLGA-co-polymer_fig1_332236629
27. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery - ScienceDirect. Accessed March 18, 2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087617301538>
28. PubChem. Methyl Salicylate. Accessed March 30, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4133>
29. PubChem. Ethyl pyruvate. Accessed March 30, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12041>
30. PubChem. Ectoine. Accessed March 30, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126041>
31. Methyl salicylate. Accessed March 30, 2023. <https://go.drugbank.com/drugs/DB09543>
32. Yang R, Han X, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol-induced liver injury and inflammation in mice. *J Lab Clin Med*. 2003;142(5):322-331. doi:10.1016/S0022-2143(03)00138-0
33. Schroeder IZ. Film forming polymeric solutions as drug delivery systems for the skin. Published online January 1, 2007.
34. Gennari CGM, Selmin F, Minghetti P, Cilurzo F. Medicated Foams and Film Forming Dosage Forms as Tools to Improve the Thermodynamic Activity of Drugs to be Administered Through the Skin. *Curr Drug Deliv*. 2019;16(5):461-471. doi:10.2174/1567201816666190118124439
35. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(5):603-618. doi:10.1016/j.addr.2003.10.025
36. Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13(3):349-360. doi:10.1517/17425247.2016.1124412
37. Guo R, Du X, Zhang R, Deng L, Dong A, Zhang J. Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. *Eur J Pharm Sci*. 2011;79(3):574-583. doi:10.1016/j.ejpb.2011.06.006
38. Chemate SZ, Anbhule RM. Formulation and evaluation of terbinafine hydrochloride film forming emulgel. 2016;6:11.

39. Lunter D, Daniels R. In vitro Skin Permeation and Penetration of Nonivamide from Novel Film-Forming Emulsions. *SPP*. 2013;26(3):139-146. doi:10.1159/000348464
40. Lunter DJ, Daniels R. New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;82(2):291.
41. Zurdo Schroeder I, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(1):111-121. doi:10.1016/j.ejpb.2006.07.015
42. Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2016;11(5):559-574. doi:10.1016/j.ajps.2016.05.004
43. Monica LL, Jordi G, Francisco FC. In situ bioadhesive film-forming system for topical delivery of mometasone furoate: Characterization and biopharmaceutical properties. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;59:101852. doi:10.1016/j.jddst.2020.101852
44. Murdan S, Kerai L, Hossin B. To what extent do in vitro tests correctly predict the in vivo residence of nail lacquers on the nail plate? *J Drug Deliv Sci Technol*. 2015;25:23-28. doi:10.1016/j.jddst.2014.11.002
45. Wu Y, Qin Y, Yuan M, et al. Characterization of an antimicrobial poly(lactic acid) film prepared with poly(caprolactone) and thymol for active packaging. *Polym Adv Technol*. 2014;25(9):948-954. doi:10.1002/pat.3332
46. Jadhav N, Gaikwad V, Nair K, Kadam H. Glass transition temperature: Basics and application in pharmaceutical sector. *Asian J Pharm*. 2009;3(2):82. doi:10.4103/0973-8398.55043
47. Garvie-Cook H, Frederiksen K, Petersson K, Guy RH, Gordeev S. Characterization of Topical Film-Forming Systems Using Atomic Force Microscopy and Raman Microspectroscopy. *Mol Pharmaceutics*. 2015;12(3):751-757. doi:10.1021/mp500582j
48. Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;91:9-15. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.002
49. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):148. doi:10.3390/pharmaceutics10030148
50. Peppas NA, Buri PA. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Controlled Release*. 1985;2:257-275. doi:10.1016/0168-3659(85)90050-1

51. Leung SHS, Robinson JR. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. *J Controlled Release*. 1990;12(3):187-194. doi:10.1016/0168-3659(90)90099-F
52. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1556-1568. doi:10.1016/j.addr.2005.07.001
53. Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm*. 2003;255(1-2):13-32. doi:10.1016/S0378-5173(03)00087-5
54. Lee JW, Park JH, Robinson JR. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J Pharm Sci*. 2000;89(7):850-866. doi:10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G
55. Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008;34(11):1246-1266. doi:10.1080/03639040802026012
56. Roy S, Prabhakar B. Bioadhesive polymeric platforms for transmucosal drug delivery systems – a review. *Trop J Pharm Res*. 2010;9(1). Accessed March 16, 2023.
https://www.academia.edu/18310376/Bioadhesive_polymeric_platforms_for_transmucosal_drug_delivery_systems_a_review
57. Solomonidou D, Cremer K, Krumme M, Kreuter J. Effect of carbomer concentration and degree of neutralization on the mucoadhesive properties of polymer films. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12(11):1191-1205. doi:10.1163/156856201753395743
58. Edsman K, Hägerström H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(1):3-22. doi:10.1211/0022357055227
59. Flory PJ. *Principles of Polymer Chemistry*. 1st ed. Springer New York, NY; 1953. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-2212-9>
60. Amorós-Galicia L, Nardi-Ricart A, Verdugo-González C, et al. Development of a Standardized Method for Measuring Bioadhesion and Mucoadhesion That Is Applicable to Various Pharmaceutical Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):1995. doi:10.3390/pharmaceutics14101995
61. Shaikh R, Raj Singh T, Garland M, Woolfson Ad, Donnelly R. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioall Sci*. 2011;3(1):89. doi:10.4103/0975-7406.76478
62. Kaur A, Kaur G. Mucoadhesive buccal patches based on interpolymer complexes of chitosan–pectin for delivery of carvedilol. *SPJ*. 2012;20:21-27. doi:10.1016/j.jsps.2011.04.005

63. Müller L, Rosenbaum C, Krause J, Weitschies W. Characterization of an In Vitro/Ex Vivo Mucoadhesiveness Measurement Method of PVA Films. *Polymers*. 2022;14(23):5146. doi:10.3390/polym14235146
64. Gidvall S, Björklund S, Feiler A, et al. A novel versatile flow-donor chamber as biorelevant ex-vivo test assessing oral mucoadhesive formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2021;166:105983. doi:10.1016/j.ejps.2021.105983
65. Bromberg L, Temchenko M, Alakhov V, Hatton TA. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. *Int J Pharm*. 2004;282(1-2):45-60. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.030
66. Why Peel Strength Tester is Backbone of E-commerce Packaging. Accessed March 15, 2023. <https://www.prestogroup.com/blog/why-peel-strength-tester-is-backbone-of-e-commerce-packaging/>
67. McCarron PA, Donnelly RF, Zawislak A, Woolfson AD, Price JH, McClelland R. Evaluation of a water-soluble bioadhesive patch for photodynamic therapy of vulval lesions. *Int J Pharm*. 2005;293(1-2):11-23. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.035
68. Chowdary KPR, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(11):1717-1724. doi:10.1248/bpb.27.1717
69. Park H, Robinson JR. Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion. *J Control Release*. 1985;2:47-57. doi:10.1016/0168-3659(85)90032-X
70. Hagesaether E, Sande SA. In Vitro Measurements of Mucoadhesive Properties of Six Types of Pectin. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(4):417-425. doi:10.1080/03639040600920630
71. Ivarsson D, Wahlgren M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;92:353-359. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.020
72. Salazar C. APPLICATION NOTE Malvern Instruments Worldwide Sales and service centres in over 65 countries Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements on a rotational rheometer RHEOLOGY AND VISCOSITY. Accessed April 30, 2023. https://www.academia.edu/33371163/APPLICATION_NOTE_Malvern_Instruments_Worldwide_Sales_and_service_centres_in_over_65_countries_Determination_of_pressure_sensitive_tack_and_adhesion_using_axial_measurements_on_a_rotational_rheometer_RHEOLOGY_AND_VISCOSITY
73. Khutoryanskiy VV. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers: Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol Biosci*. 2011;11(6):748-764. doi:10.1002/mabi.201000388

74. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength - PubMed. Accessed March 16, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1694990/>
75. Madsen F, Eberth K, Smart JD. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. *J Control Release*. 1998;50(1-3):167-178. doi:10.1016/s0168-3659(97)00138-7
76. Riley RG, Smart JD, Tsibouklis J, et al. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesised and characterised poly(acrylic acid)s. *Int J Pharm*. 2001;217(1-2):87-100. doi:10.1016/s0378-5173(01)00592-0
77. Callens C, Ceulemans J, Ludwig A, Foreman P, Remon JP. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003;55(3):323-328. doi:10.1016/s0939-6411(03)00024-9
78. Tiwari D, Goldman D, Sause R, Madan PL. Evaluation of polyoxyethylene homopolymers for buccal bioadhesive drug delivery device formulations. *AAPS PharmSci*. 1999;1(3):E13. doi:10.1208/ps010313
79. Shear Rheometry - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed March 16, 2023. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/shear-rheometry>
80. Boonyai P, Bhandari B, Howes T. Stickiness measurement techniques for food powders: a review. *Powder Technology*. 2004;145(1):34-46. doi:10.1016/j.powtec.2004.04.039
81. Wang M, Abeykoon GA, Argüelles-Vivas FJ, Okuno R. Ketone solvent as a wettability modifier for improved oil recovery from oil-wet porous media. *Fuel*. 2019;258:116195. doi:10.1016/j.fuel.2019.116195
82. Lohani A. Mucoadhesive Microspheres: A Novel Approach to Increase Gastroretention. *Chronicles of Young Scientists*. 2012;3:121-128. doi:10.4103/2229-5186.98684