

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
*Katedra farmaceutickej technológie*



*In situ PLGA filmy pre topickú aplikáciu salicylátov*  
DIPLOMOVÁ PRÁCA

Hradec Králové 2024

Hana Hnatová

Vyhlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a iné zdroje, z ktorých som pri tejto práci čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a riadne citované v práci. Táto práca nebola použitá na získanie iných titulov alebo rovnakého titulu. Zároveň chcem srdečne poďakovať svojej školiteľke PharmDr. Eve Šnejdrovej, Ph.D. za jej odbornú pomoc, trpezlivosť, cenné rady a usmernenia pri spracovávaní mojej diplomovej práce. Taktiež moja vďaka patrí pánovi Mgr. Janovi Loskotovi, Ph.D. za vytvorenie prezentovaných SEM snímok.

Máj 2024

Hana Hnatová

# ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Autorka: Hana Hnatová

Názov diplomovej práce *In situ PLGA filmy pre topickú aplikáciu salicylátov*

Školiteľka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cieľom práce bolo formulovať a charakterizovať filmotvorné systémy (FFS) na báze vetveného PLGA pre lokálnu aplikáciu salicylátov. Tenké filmy sa pripravili rozpustením PLGA, kyseliny salicylovej (SA) a metylsalicylátu (MS) v acetóne. Po jeho odparení sa vytvorili filmy *in situ*. MS má funkciu plastifikátoru a prekursoru terapeuticky účinnej SA. Boli hodnotené termické vlastnosti filmov pomocou DSC, pričom sa ukázalo, že SA je molekulárne dispergována v polyméri a má plastifikačný účinok. SEM ukázala relatívne hladký povrch filmov bez trhlín. Boli hodnotené tokové a adhezívne vlastnosti filmov *in situ* pri teplote 32 °C ťahovým testom na rotačnom reometri. Filmy vykazovali newtonovské správanie a výbornú adhezivitu ovplyvnenú koncentráciou plastifikátoru. Uvoľňovanie SA z filmov sa testovalo pri teplote 32 °C vo fosfátovom pufre s pH 7,4. Počiatočný burst efekt bol približne 20 % po 24 hodinách, po ktorom nasledovalo predĺžené uvoľňovanie počas šiestich dní ovplyvnené koncentráciou SA a MS.

**Kľúčové slová:** *in situ* film, PLGA, kyselina salicylová, metylsalicylát, bioadhézia

# ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Name of the student: Hana Hnatová

Title of diploma thesis: *In situ PLGA films for topical delivery of salicylates*

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D

The aim of this work was to formulate and characterize film-forming systems (FFS) based on branched PLGA for topical application of salicylates. Thin films were prepared by dissolving PLGA, salicylic acid (SA) and methyl salicylate (MS) in acetone. After its evaporation, the films were formed *in situ*. MS has the function of plasticizer and precursor of therapeutically active SA. The thermal properties of the films were evaluated by DSC, showing that SA is molecularly dispersed in the polymer. SEM showed a relatively smooth surface of the films without cracks. The flow and adhesive properties of the *in situ* films were evaluated at 32°C by a tensile test on a rotational rheometer. The films exhibited Newtonian behavior and excellent adhesiveness influenced by the plasticizer concentration. The release of SA from the films was tested at 32 °C in phosphate buffer pH 7.4. The initial burst release was approximately 20% at 24 hours, followed by a prolonged release over 6 days influenced by SA and MS concentration.

**Key words:** *in situ* film, PLGA, salicylic acid, methylsalicylate, bioadhesion

# OBSAH

Abstrakt .....	3
Abstract.....	4
Obsah.....	5
Zoznam skratiek a značiek.....	7
Ciele práce .....	8
Úvod .....	9
1 Teoretická časť .....	10
1.1 Muskuloskeletálna bolesť a jej terapia.....	10
1.1.1 Salicyláty .....	12
1.1.2 Topické liekové formy s obsahom salicylátov .....	16
1.2 FFS a jeho komponenty .....	19
1.2.1 Polymérny nosič.....	21
1.2.2 Plastifikátor.....	23
1.2.3 Liečivo.....	25
1.2.4 Rozpúšťadlo.....	25
1.3 Metódy charakterizácie FFS a tenkých filmov.....	26
1.3.1 Diferenciálna skenovacia kalorimetria.....	26
1.3.2 Adhezivita, tokové vlastnosti a ich testovanie in vitro.....	29
1.3.3 Disolúcia.....	32
2 Experimentálna časť .....	34
2.1 Suroviny .....	34
2.2 Prístroje .....	34
2.3 Príprava pufrov .....	35
2.4 Príprava FFS.....	35

2.5	Degradácia PLGA.....	35
2.6	Tokové a adhézne vlastnosti.....	36
2.7	DSC.....	37
2.8	SEM.....	38
2.9	Disolúcia.....	38
3	Výsledky.....	40
3.1	Degradácia PLGA.....	40
3.2	Tokové vlastnosti.....	43
3.3	Adhézne vlastnosti.....	44
3.4	DSC.....	45
3.5	SEM.....	48
3.6	Disolúcia.....	50
4	Diskusia.....	53
4.1	Degradácia PLGA.....	53
4.2	Tokové vlastnosti.....	54
4.3	Adhézne vlastnosti.....	56
4.4	DSC.....	58
4.5	SEM.....	60
4.6	Disolúcia.....	61
5	Záver.....	64
6	Literatúra.....	65

## ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

ASA	–	kyselina acetylsalicylová
AUC	–	plocha pod krivkou
DSC	–	diferenciálna skenovacia kalorimetria
EMA	–	European Medicines Agency
FDA	–	Food and Drug Administration
FFS	–	film forming system, filmotvorný systém
GA	–	kyselina glykolová
LA	–	kyselina mliečna
MS	–	metylsalicylát
NSAID	–	nesteroidné antiflogistiká
PLGA	–	kyselina poly(mliečna-ko-glykolová)
PLGA/A	–	kyselina poly(mliečna-ko-glykolová) vetvená na kyseline polyakrylovej 4 % v zmesi
SA	–	kyselina salicylová
SEM	–	skenovacia elektrónová mikroskopia
WHO	–	World health organization

## CIELE PRÁCE

Cieľom tejto práce bolo formulovať a charakterizovať systémy pre tvorbu filmov *in situ* pre topickú aplikáciu na báze kyseliny poly(mliečnej-ko-glykolovej) (PLGA) s obsahom kyseliny salicylovej (SA) a multifunkčného plastifikátora metylsalicylátu (MS).

Jednotlivé úlohy práce možno konkretizovať do týchto krokov:

1. Stručný prehľad z dostupných zdrojov o použitých komponentoch FFS a ich vplyvu na vyvíjanú LF.
2. Štúdium degradácie lineárneho polyméru PLGA a derivátu PLGA rozvetveného na polyakrylovej kyseline (PLGA/A).
3. Príprava FFS filmov *in situ*.
4. Testovanie vplyvu MS ako plastifikátora na reologické a adhézne vlastnosti PLGA/A.
5. Testovanie termických vlastností metódou DSC jednotlivých zložiek FFS a ich *in situ* filmov.
6. Charakterizácia vplyvu plastifikátora a množstva organického rozpúšťadla na povrch filmov *in situ* SEM metódou.
7. Testovanie uvoľňovania SA z filmov obsahujúcich SA a MS s využitím spektrofotometrického stanovenia SA.



## ÚVOD

Polymérne filmotvorné systémy (FFS) predstavujú alternatívnu liekovú formu ku konvenčným topickým liekovým formám s potenciálom prekonať niektoré ich obmedzenia, ako sú ľahká zmývateľnosť a stierateľnosť, lepkavý a mastný povrch, nepríjemné organoleptické vlastnosti (napr. vzhľad, zápach), ktoré môžu viesť k slabej kompliancii pacienta. Základom FFS je filmotvorný polymér a prchavé rozpúšťadlo, prípadne liečivo a plastifikátor. Po aplikácii na kožu je výsledkom tenký, priehľadný, pružný a kozmeticky elegantný film. Cieľom vývoja FFS je účinne dodať požadované množstvo terapeutickkej látky na cieľové miesto v koži počas dlhšieho časového obdobia. Návrh účinných tenkých filmov si vyžaduje komplexné znalosti o vlastnostiach liečiv a polymérov spolu s vhodným výberom výrobných postupov. FFS možno považovať za relatívne novú liekovú formu, čo sa odráža v absencii štandardizovaných metód testovania hotového produktu. Táto práca sa zameriava na vývoj vhodnej formulácie FFS na báze kyseliny poly(mliečne-ko-glykolovej) s rozvetvenou architektúrou a s obsahom salicylátov. FFS a ich filmy *in situ* boli podrobené testovaniu a hodnoteniu degradácie, tepelných vlastností, reologických vlastností, adhézných vlastností a disolúcie.

Táto diplomová práca je pokračovaním série odborných, diplomových a rigorózných prác zaoberajúcich sa charakterizáciou vlastností filmotvorných systémov na základe derivátov PLGA, a sleduje ďalšie možné obmeny formulácie FFS.

# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Muskuloskeletálna bolesť a jej terapia

U zdravého jedinca možno bolesť definovať ako komplexnú zmyslovú skúsenosť spojenú so skutočným alebo potenciálnym poškodením tkaniva [1]. Bolesť ako dôsledok muskuloskeletálnych problémov je čoraz častejšou príčinou zhoršenej kvality života a zvýšených nárokov na zdravotnú starostlivosť [2]. Muskuloskeletálna bolesť je spôsobená aktiváciou nociceptorov vo svaloch, v šľachách alebo kĺbových puzdrách. Zahŕňa široké spektrum porúch pohybového aparátu, ako sú: jednoduché väzivové poranenia, vnútrokĺbové poruchy, syndrómy svalovej bolesti a rôzne ochorenia súvisiace s chrbticou [3]. Tento typ bolesti býva dôsledkom zranenia, chybného držania tela (statické poruchy), hypermobility, nesprávneho zaťažovania pohybového aparátu, nedostatku pohybu, opotrebovania, zápalu, vrodených chýb alebo degeneratívnych procesov [4].

V prvej línii liečby porúch generujúcich periférnu bolesť sú nefarmakologické opatrenia (úmerná fyzická aktivita, kognitívno-behaviorálna terapia, kognitívno-pedagogický prístup). Následne sa pristupuje ku farmakologickým opatreniam [5]. Súčasná farmakoterapia vychádza z trojstupňového analgetického rebríčka daného Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO). Analgetikami prvého stupňa sú neopioidné analgetiká a nesteroidné antiflogistiká (NSAID), druhý stupeň je tvorený slabými opioidmi a tretí zahŕňa silné opioidy. Na prípadnú podporu analgetického účinku je vo všetkých stupňoch možné využiť koanalgetiká (kortikosteroidy, antikonvulzíva, antidepresíva atď.) [6,7].

Rizika systémového užívania NSAID a súčasne pretrvávajúce obavy z používania opioidov, nasmerovali zvýšenú pozornosť na nesytemové lokálne analgetiká. V dôsledku toho dochádza v súčasnosti k prehodnocovaniu bezpečnosti a účinnosti jednej z najstarších ciest podávania liečiv, a teda kožnej aplikácie s topickými účinkami. Tento druh aplikácie je možné využiť ako potencionálny terapeutický prístup pri niektorých typoch bolesti pohybového aparátu [3,8]. Topická aplikácia nie je synonymom transdermálnej aplikácie pre ich významový rozdiel. Transdermálnymi metódami sa podávajú lieky prostredníctvom perkutánnej absorpcie s cieľom dosiahnuť terapeutické systémové hladiny aktívneho liečiva. Miestami účinku

topických prípravkov sú mäkké tkanivá a periférne nervy v okolí miesta aplikácie, kde je snaha dosiahnuť vyššiu účinnosť ako po perorálnej aplikácii, avšak s minimálnou systémovou hladinou liečiva, a teda s nižším rizikom orgánovej alebo tkanivovej toxicity [9]. Ďalšie výhody a obmedzenia topickej analgézie sú uvedené v nasledujúcom prehľade (Tabuľka 1).

Variabilita terapeutického účinku topickej aplikovaného liečiva je pravdepodobne odvodená z ich schopnosti prekonať stratum corneum [10]. V ideálnom prípade má liečivo: nízku molekulovú hmotnosť (< 500 Da), je bez náboja a hodnota  $\log P(\text{oktanol/voda})$  by sa mala pohybovať v rozmedzí 1 až 3, aby liečivo bolo schopné preniknúť cez rohovinovú vrstvu kože až do epidermis [10–14]. Okrem toho štúdie *ex vivo* na ľudskom kožnom tkanive naznačujú, že nefyziologické pH nosiča môže znížiť penetráciu látky do kože, zatiaľ čo oklúzia povrchu kože môže mať priaznivý vplyv na podávanie liečiva [14].

#### Tabuľka 1 Výhody a nevýhody topickej aplikácie

##### Výhody:

- terapeutické koncentrácie bez first-pass efektu alebo ovplyvnenia premennými súvisiacimi s tráviacim traktom (pH, čas vyprázdňovania žalúdka) [15]
- zníženie vedľajších účinkov a minimalizácia vrcholov a poklesov koncentrácie liečiva v krvi [16,17]
- jednoduché ukončenie terapie v prípade potreby [15,18]
- jednoduchá, neinvazívna, bezbolestná aplikácia vhodná aj v domácom prostredí môže prispievať ku vyššej adherencii pacientov k terapii [19,20]

##### Limitácie:

- difúzia cez rohovú vrstvu len pri nízkej molekulovej hmotnosti liečiva < 500 Da [10]
- potrebná rozpustnosť vo vode aj v lipidoch,  $\log P(\text{oktanol/voda}) \sim 1-3$  [11,12,14]
- rôzna účinnosť v dôsledku intraindividuálnej, interindividuálnej variability v priepustnosti kože a rozdielu medzi zdravou a chorou kožou [21,22]
- zníženie účinnosti liečiva metabolizáciou kožnými enzýmami [23]
- časté lokalizované podráždenie kože, napr. erytém [24–26]

### 1.1.1 Salicyláty

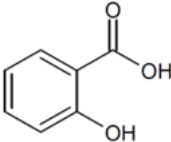
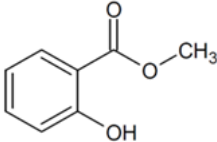
Napriek tomu, že kyselina salicylová (SA) je už dávno objavenou účinnou látkou, aj v súčasnosti nachádza uplatnenie pre svoje antiflogistické a analgetické účinky. Z chemického hľadiska je SA monohydroxybenzoová kyselina. Má dve funkčné skupiny, karboxylovú a hydroxylovú, ktoré možno využiť pri tvorbe jej derivátov. Pri acetylácii hydroxylovej skupiny vzniká kyselina acetylsalicylová (ASA), ktorá je využívaná ako systémové analgetikum, antipyretikum a antitrombotikum.

Salicyláty, čiže estery a soli SA, vznikajú reakciami s jej karboxylovou skupinou, ktoré sú zdrojmi aktívneho metabolitu používaného na liečbu lokálnej bolesti alebo zápalu. Patria sem napríklad metylsalicylát, etylsalicylát, diethylamínsalicylát, glykolsalicylát, triethanolamínsalicylát, diethylamínsalicylát [27,28]. V porovnaní s SA majú estery a soli kyseliny salicylovej lepšiu rozpustnosť a sú schopné lepšie penetrovať do kože a sliznice [29]. V roku 1971 bol Vane a kol. opísaný mechanizmus systémového protizápalového účinku salicylátov, ktorý spočíva v inhibícii enzymatickej aktivity cyklooxygenáz (COX), a teda i v inhibícii tvorby zápalových prostaglandínov [30]. Izoforma COX-1 je v organizme prítomná za fyziologických podmienok a zaisťuje syntézu prostaglandínov, ktoré ovplyvňujú radu fyziologických funkcií. Jej blokáda môže viesť k manifestácií nežiadúcich účinkov salicylátov [31]. Príležitostné používanie obvyklých dávok všeobecne spôsobuje málo nežiaducich účinkov. ASA je významne spájaná s krvácaním do hornej časti gastrointestinálneho traktu pri podávaní dlhodobo alebo pri podávaní vysokých dávok [32]. Okrem toho, systémovo podané salicyláty môžu mať nežiadúci vplyv aj na renálnu, hepatálnu, hematologickú, sluchovú a vestibulárnu funkciu, môžu zapríčiniť hypersenzitívnu reakciu alebo Reyov syndróm. Uvádza sa, že salicyláty majú široké spektrum liekových interakcií, ale relatívne málo z nich sa zdá byť klinicky dôležitých. K liekovým skupinám, o ktorých sa predpokladá, že spôsobujú najvýznamnejšie interakcie, možno zaradiť antikoagulanciá a trombolýtiká, urikozuriká, kortikosteroidy, metotrexát a hypoglykemické liečivá na bázi sulfonylmočoviny [33]. Pri topickej aplikácii salicylátov tieto pôsobia ako lokálne rubifaciens. Využitie týchto účinkov je možné napríklad vo farmakoterapii zranení mäkkých tkanív. Umožňujú zvládať cvičenie počas rehabilitácie a tým napomáhajú obnove normálnej funkcie svalov a predchádzajú ďalšiemu možnému zraneniu [34]. Taktiež je potrebné

zmieniť pôsobenie salicylátov na keratinizáciu využívanú v kožnom lekárstve a kozmetike. Okyslením vrstvy stratum corneum spôsobia deskvamáciu korneocytov a odstránenie medzibunkových lipidov. To má za následok oslabenie bariérovej vlastnosti kože, zníženie sekrécie kožného mazu a zabránenie hyperplastickému pôsobeniu na epidermis [35–37].

Priamy prienik lokálne aplikovaného salicylátu do základných tkanív s následným rozsiahlym metabolizmom na kyselinu salicylovú, boli publikované v 90. rokoch 20. storočia. Presný mechanizmus účinku lokálnych salicylových látok je stále nejasný [38]. V mieste aplikácie prenikajú salicyláty do tkanív až na úroveň svalov. Množstvo penetrovaných salicylátov sa zvyšuje cvičením, zvýšením teploty, narušením kože alebo pri prekrytí obvazom po aplikácii prípravku. Salicyláty sa môžu absorbovať do krvi, avšak plazmatické koncentrácie odhadnuté na základe koeficientov permeability sú nízke, a je teda nepravdepodobné, že by vyvolali skutočný systémový účinok. Účinnosť dermálnej aplikácie prípravkov s obsahom salicylátov v liekovej terapii je preto nepochybne obmedzená predovšetkým na ich lokálny účinok. Porovnaním nameraných tkanivových a plazmatických koncentrácií po perorálnej aplikácii ASA s koncentraciami po podaní krému s obsahom trietanolamínsalicylátu sa ukázalo, že pri topickom podaní boli vo svaloch, šľachách, chrupkách a synovii dosiahnuté vyššie lokálne koncentrácie SA. Naopak, koncentrácie SA boli v synoviálnej tekutine nižšie oproti koncentraciám po systémovom podaní [38]. Údaje z randomizovaných klinických štúdií, opisujúcich účinnosť lokálne aplikovaných salicylátov na zmiernenie bolesti, vykazovali významne lepšie tlmenie bolesti ako placebo, pričom nežiaduce účinky v mieste aplikácie sa vyskytli len u 2 % subjektov [29,39]. Estery kyseliny salicylovej prenikali do tkaniva dokonca lepšie ako jej soli. Pri ich aplikáciách boli pozorované vyššie koncentrácie v derme, podkožnom tkanive a hornom svale. Koncentrácie v hlbšie položených tkanivách (hlboké svaly a tuk) boli nižšie ako koncentrácie v plazme [29]. Predložená diplomová práca sa zaoberá metylsalicylátom a kyselinou salicylovou ako potencionálnymi nositeľmi farmakologického účinku vyvíjanej liekovej formy. Obe látky spĺňajú základné požiadavky vhodných kandidátov na podanie do kože, vrátane molekulovej hmotnosti  $< 500 \text{ Da}$  a  $\log P \sim 1$  až 3 (Tabuľka 2) [40].

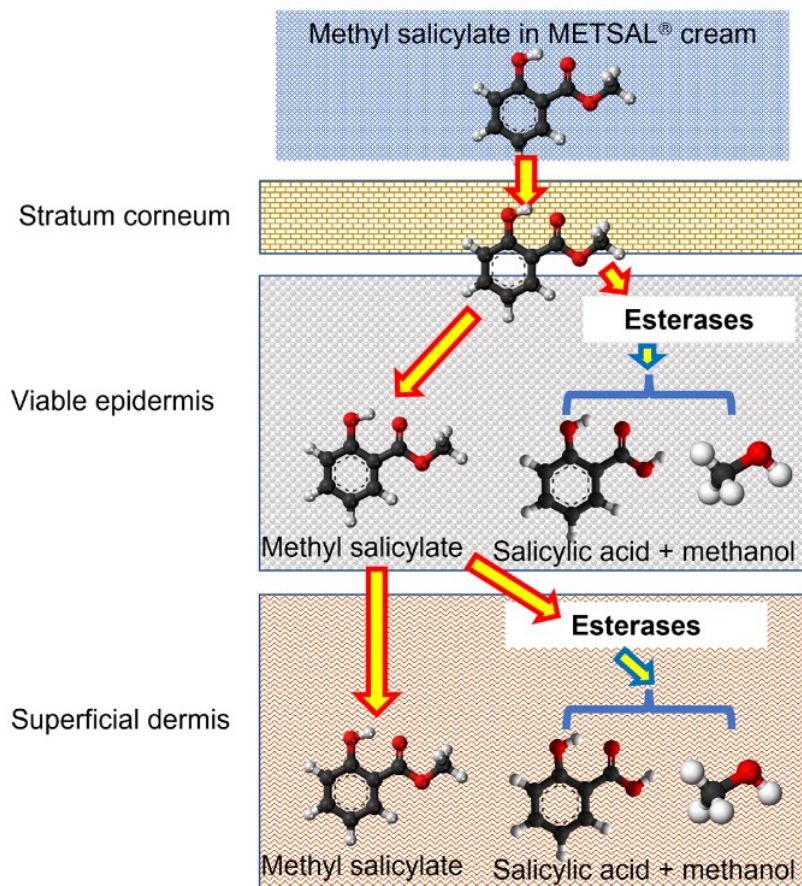
Tabuľka 2 Fyzikálno-chemické vlastnosti SA a MS [41–43]

Fyzikálno-chemické vlastnosti	Kyselina salicylová <i>Acidum salicylicum</i>	Metylsalicylát <i>Methylis salicylas</i>
Štruktúra		
Systematický názov	Kyselina 2-hydroxybenzeová	Methyl-2-hydroxybenzoát
Molárna hmotnosť (g/mol)	138,12	152,15
Teplota topenia (°C)	158 °C až 161 °C	-8°C
Rozpustnosť vo vode	Ťažko rozpustná	Veľmi ťažko rozpustná
log <i>P</i>	1,2	2,36
p <i>K</i> <sub>a</sub>	2,97	9,8

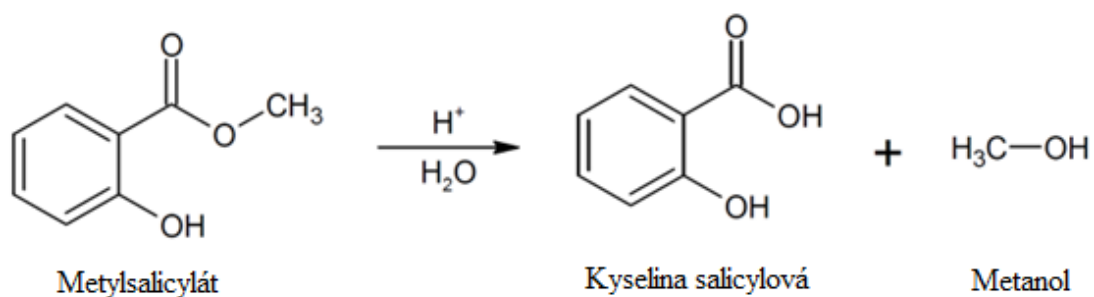
*Metylsalicylát (CAS: 119-36-8)*

Jedná sa o metylester kyseliny salicylovej, bežne známy ako esenciálny olej “Wintergreen“ pre jeho výrazný charakteristický zápach. Je bezfarebný alebo svetložlto zafarbený, veľmi ťažko rozpustný vo vode, miesiteľný s etanolom, masnými olejmi a silicami. Pôvodne bol získavaný destiláciou z listov *Gaultheria procumbens* (*Ericaceae*) a kôry *Betula lenta* (*Betulaceae*). V súčasnosti sa syntetizuje esterifikáciou kyseliny salicylovej s metanolom [41,44,45]. Topická aplikácia MS je indikovaná na protizápalové a analgetické účely, zvyčajne v koncentrácii 10 – 30 % [44,46,47]. MS je dostatočne lipofilný, aby difúziou prenikol do hlbších tkanív. Pri prechode kožou sa rýchlo hydrolyzuje esterázami na aktívnu SA, ktorá pôsobí analgeticky (Obrázok 1) [46]. Bolesť zmierňuje protidráždivým efektom, ktorý pôsobí na nervové zakončenia vo svaloch a kĺboch [48,49]. Pre vyšší výskyt nešpecifických esteráz je rozsah metabolizmu väčší v dermis a podkožnom tkanive než v hlbších tkanivách (svaloch) [29,50]. Pri pH > 7 môže MS i chemicky hydrolyzovať na SA a metanol (Obrázok 2) [51]. Po 10 hodinách po aplikácii je schopné sa absorbovať do systémového obehu približne 12 až 20 % množstva salicylátu aplikovaného na pokožku [52]. Tkanivové hladiny SA z MS boli približne 30-krát vyššie ako

koncentrácia v plazme [39]. Okrem toho sa MS vo veľmi nízkej koncentrácii (0,0001 – 0,6 %) môže používať aj ako denaturant a korigencium chuti [53].



Obrázok 1 Metabolizmus MS na SA v dermis [54]



Obrázok 2 Hydrolýza MS

### *Kyselina salicylová (CAS 69-72-7)*

Kyselina 2-hydroxybenzeová, známa pod triviálnym názvom kyselina salicylová, je biely alebo bezfarebný kryštalický prášok, ťažko rozpustný vo vode, mierne rozpustný v dichlormetáne a ľahko rozpustný v 96 % etanole a v éteri [41]. Zlúčenina bola prvotne izolovaná z vrbovej kôry (*Salix alba*). Disponuje analgetickými, antipyretickými a protizápalovými účinkami. V súčasnosti sa používa predovšetkým ako lokálne keratomodulačné činidlo v dermatológii [35,55]. SA môže mať, v závislosti na jej lokálnej koncentrácii na neporušenej koži [19], keroplastický alebo kerolytický účinok [56]. Pri koncentrácii SA nižšej ako 3 % dochádza ku keroplastickému pôsobeniu (deskvamácii korneocytov), nad 3 % je účinok keratolytický (zhrubnutie keratínovej vrstvy) [57]. Vysoké koncentrácie SA (40 – 50 %) sú indikované pri terapii bradavíc, otlakov, aktinickej keratózy a pigmentových léziách, zatiaľ čo nižšie koncentrácie sa používajú na povrchový chemický peeling tváre (20 – 30 %), hyperkeratické poruchy, napr. psoriáza (3 – 6 %) a akné (0,5 – 10 %). V nižších koncentráciách sa SA bežne používa v širokom spektre kozmetických produktov, avšak iba prípravky s obsahom SA nižším ako je 3 % smú ostať na aplikovaných miestach bez oplachu [58,59].

#### **1.1.2 Topické liekové formy s obsahom salicylátov**

Súčasný trh disponuje širokou škálou prípravkov obsahujúcich deriváty kyseliny salicylovej. V nasledujúcom prehľade (Tabuľka 3) sú uvedené príklady komerčných produktov v rôznych liekových formách (LF), pričom sa jedná o registrované liečivé prípravky v aspoň jednom z členských štátov Európskej únie s indikáciou k terapii bolesti svalov a kĺbov (ATC kód: M02AC).

Každá z týchto LF je spojená s rôznymi výhodami i obmedzeniami. Výhodou konvenčných tekutých a polotuhých liekových foriem sa javí byť ich jednoduchá aplikácia na kožu a sliznice, s prípadnou možnosťou úpravy dávky. Zároveň sú tieto LF pomerne nenáročné na prípravu [60]. U tekutých liekových foriem býva problémom nízka stabilita, najmä v prípadoch, ak formulácia obsahuje vodu [61]. Nevýhodou bežných topických prípravkov je ich ľahká zmývateľnosť a stierateľnosť. Tieto vlastnosti spôsobujú, že účinná látka nie je v epiderme prítomná v dostatočnom a stálom množstve, preto je liečba častokrát nedostatočná a je nutné aplikáciu



opakovať. Použitie vyššej koncentrácie liečiva nie je riešením tohto nedostatku, pretože by spôsobila kolísanie koncentrácie a zvýšila by pravdepodobnosť preniknutia účinnej látky do systému [62]. Okrem toho, v niektorých prípadoch, polotuhé LF zanechávajú v mieste aplikácie lepkavý pocit, pocit mastnoty alebo majú nepríjemné organoleptické vlastnosti (napr. vzhľad, zápach). Tie môžu viesť k slabšej kompliancii pacienta [60,63]. Formulácie vykazujúce vysokú substantivitu poskytujú elegantnejšie riešenie tohto problému.

Substantivita je definovaná ako schopnosť účinnej látky udržať sa v mieste pôsobenia na povrchu alebo vytvárať zásobník v stratum corneum [62]. Dermálne náplasti splňujú túto požiadavku a sú schopné znížiť potrebu frekvencie aplikácie, prípadne poskytnúť predĺžené uvoľňovanie liečiva. Princípom je vytvorenie fyzickej bariéry medzi prípravkom a prostredím, ktorá eliminuje mastný pocit a zároveň chráni prípravok pred nechceným odstránením. Táto fyzikálna bariéra však môže viesť ku oklúzii kože, čo prináša nekomfort pri nosení naplaste. Spolu s nevábnyim estetickým vzhľadom nepriaznivo ovplyvňuje compliance pacienta. Ďalším problémom môže byť alergická reakcia na matricové lepidlá. Vo väčšine prípadov sa náplasti nedajú strihať na požadované veľkosti, čo ich častokrát robí nevhodnými na individuálnu liečbu. Pri strhávaní náplastí môže dôjsť k poškodeniu kože, a teda nie sú vhodné na použitie pri ochoreniach s narušenou kožnou bariérou [64]. Z týchto dôvodov sa vývoj topických liekových foriem snaží smerovať k novým, klinicky účinným, priemyselne spracovateľným a terapeuticky bezpečným formuláciám, ktoré spĺňajú cieľový profil výrobku [65]. To v praxi znamená fyzikálnu a chemickú stabilitu, primeranú trvanlivosť, uvoľňovanie liečiva z formulácie a jeho dodávanie do kože podľa požiadaviek na cieľovú indikáciu. Taktiež ide o to, aby dané formulácie obsahovali len tie pomocné látky, ktoré sú potrebné, schválené alebo prijateľné z hľadiska regulácie štátnymi autoritami ako aj z hľadiska daného ochorenia. V neposlednom rade ide o kozmetickú elegantnosť a prijateľnosť pre pacientov, výslednú ľahkú aplikáciu a kompatibilitu s požadovaným obalom [66].

Tabuľka 3 Prehľad komerčných prípravkov ATC skupiny M02AC

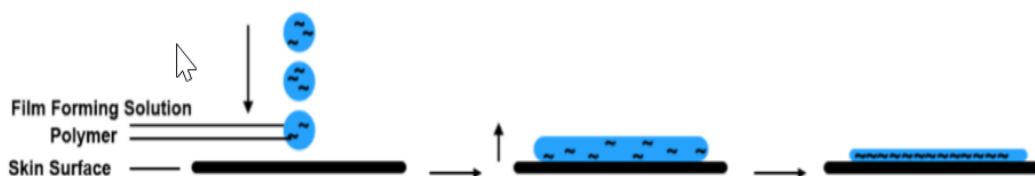
Produkt	LF	Zdroj salicylátov	Zloženie
Algesal Activado® [67]	masť	dietylamín-salicylát (10 % w/w)	myrtekaínu (1 % w/w), cetylalkoholu (7,5 % w/w), ricinooleát glycerolu (4,3 % w/w), levanduľová silica (0,5 % w/w), ktorá obsahuje: linalool, kumarín, d-limonén, citronelol, terpenické deriváty, amylcinnamaldehyd,
Deep Heat Rub® [68]	krém	metylsalicylát (12,8 % w/w)	mentol (5,91 % w/w), eukalyptový esenciálny olej (1,97 % w/w), terpentínový olej (1,47 % w/w) butylhydroxytoluén, cetostearylsulfát sodný, cetylalkohol, stearylalkohol, propylénglykol, lanolín, parafín, čistená voda
Mobilat® dermálny gél [69]	gél	kyselina salicylová (2 % w/w)	100 g dermálneho gélu obsahuje: Glykozaminoglykán polysulfát (0,2 % w/w), extrakt z kôry nadobličiek (1,0 % w/w), propylénglykolu (E 1520), dihydrát edetan disodný, rozmarínová silica, olamín, kyselina polyakrylová, propylénglykol, izopropylalkohol, čistená voda
Reflex Spray® [70]	roztok	metylsalicylát (25 mg/ml)	terpentínový olej (65 mg/ml), gáfor (40 mg/ml), mentol (40 mg/ml), dimetylsulfoxid, benzylalkohol, isopropilalkohol, pohonyplyn: oxid uhličitý
Algesal® kožná pena [71]	pena	dietylamín-salicylát (10% w/w)	laurylsíranu myrtekaínu (1 % w/w), cetylalkohol (4 % w/w), levanduľová silica (0,4 % w/w obsahujúca linalool, kumarín, d-limonén, citronelol, amylcinnamaldehyd, terpenické deriváty, edetát disodný, polysorbát 60, triglycerid kaprylový/kapricový, tekutý parafín, sorbitan monostearát, cetylalkohol, čistená voda, propel-45 (propan + isobutan)
Remy Stick® kožná tyčinka [72]	tyčinka	etylsalicylát (1,16% w/w)	Gáfor (5 % w/w), mentol (2,2 % w/w), Oleorezín z papariky titrovaný na 0,5 % kapsaicínu (2 % w/w), stearín, cetylalkohol, etylénglykol, propylénglykol, etanol
Salonpas Flessibile® [73]	náplast'	dimetylsalicylát (10% w/w)	levomentol (3 % w/w), nasýtená alicyklická uhľovodíková živica, tekutý parafín, poly-izobutylén blokový kopolymér styren-izoprén-styren, syntetický kremičitan hlinitý, nosná matrica, plastová fólia

Novo vyvíjanou LF, ktorá získava na popularite a akceptácii vo farmácií, sú systémy tvoriace filmy *in situ* (*Film forming system* – FFS). Predstavujú alternatívny prístup popri konvenčných topických ale aj orálnych liekových formách [74]. Zámerom vývoja je vyvinúť prípravky so zvýšenou substantivitou voči mechanickým a vodným vplyvom a zlepšenie kozmetických vlastností, a tým aj compliance pacientov [62,75]. Filmy možno definovať ako tenkú a flexibilnú vrstvu polyméru. Tvoria medzistupeň medzi dermálnymi náplastami a polotuhými liekovými formami [76]. Vykazujú tak výhody oboch systémov, ako sú nízka frekvencia dávkovania, ľahká úprava dávky prípadne predĺženie uvoľňovania liečiva, sú bez mastného a lepkavého pocitu a zároveň majú vyššiu priľnavosť, elasticitu, a teda prispôsobivosť k povrchu. [77]. Vďaka týmto vlastnostiam môžu byť vnímané ako menej obťažujúce a pre pacienta prijateľnejšie. Použitie tenkých filmov je však obmedzované nízkou nosnou kapacitou liečiva. Menej účinné liečivá, ktoré je potrebné podávať vo vysokých koncentráciách, sú preto problémom [78]. Zároveň je potrebné prijať špeciálne opatrenia týkajúce sa ich uchovávaní, keďže filmy majú zvyčajne hygroskopickú povahu [79].

V súčasnosti možno v literatúre nájsť značné množstvo pôvodných prác a patentov týkajúcich sa uvedenej liekovej formy, avšak pre optimalizáciu FFS a ich filmov *in situ* je stále potrebné vykonať adekvátne štúdie. Z farmaceuticko-technologického hľadiska sa nedostatok informácií prejavuje hlavne v usmerneniach pre výrobu a kontrolu kvality FFS a ich filmov [74].

## 1.2 FFS a jeho komponenty

FFS je definovaný ako polotuhá alebo tekutá lieková forma, ktorá vytvára film *in situ*, t. z. po aplikácii na kožu alebo sliznicu. Systém je zložený z prchavého rozpúšťadla, filmotvornej látky, účinnej látky a zvyčajne aj z plastifikátora a/alebo látky podporujúcu penetráciu. Proces formovania filmu (Obrázok 3) spočíva v rovnomernom nanesení FFS na cieľový povrch, kde po aplikácii dochádza k odpareniu rozpúšťadla, alebo jeho penetrovaniu do kože, a vzájomnému interagovaniu filmotvorného polyméru, za vzniku tenkého transparentného a bioadhezívneho filmu. Vytvorený film má charakter homogénneho zásobníka účinnej látky s vysokou substantivitou, z ktorého sa liečivo následne uvoľňuje [77,80].



Obrázok 3 Mechanizmus tvorby filmu in situ

Na liekovom trhu je v súčasnosti možné dohľadať rôzne filmotvorné prípravky na topickú aplikáciu. Príklady komerčných produktov sú uvedené v nasledujúcom prehľade (Tabuľka 4). Obsiahlejšie zoznamy prípravkov je možné dohľadať v týchto prácach [62,74]. Žiaden z uvedených registrovaných prípravkov však neobsahuje NSAID alebo iné liečivo určené na lokálnu terapiu bolesti.

Tabuľka 4 Prehľad filmotvorných komerčných produktov

Produkt	Zloženie	Indikácia
Lamisil Once [81], (LP); Aplikácia: z tuby;	Terbinafin hydrochloridum (1 % w/w), poly(akrylamid-co-izoktylakrylát), hydroxypropylcelulóza, triglyceridy so stredne dlhým reťazcom; etanol 96 %;	<ul style="list-style-type: none"> <li>• liečba tinea pedis;</li> </ul>
Urgo FILMOGEL Poškodené nechty [82], (ZP); Aplikácia: štetcom;	Hydroxypropylchitosan, etanol, čistená voda, procton olamin (Octopirox 0,5 %);	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stabilizovanie štruktúry nechta, zastavenie postupu poškodenia;</li> <li>• podpora rastu zdravých regenerovaných nechto;</li> </ul>
Akuto1™ sprej [83], (ZP); Aplikácia: sprejovo;	Denaturovaný etanol, dimetyléter, kopolymér akrylát, dioxacyklopentánium;	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ošetrovanie odrenín a drobných povrchových zranení;</li> </ul>

Vysvetlivky: LP – liečivý prípravok, ZP – zdravotnícky prostriedok

Formulácia účinných filmov si vyžaduje komplexné znalosti o farmakologických a technologických vlastnostiach liečiva a polymérov, spolu s výberom vhodného výrobného procesu [74]. Ak liečivo spĺňa požiadavky na vstup do kože alebo cez kožu, výber polyméru a iných pomocných látok sa riadi ich vzájomnou

kompatibilitou a rozpustnosťou [84]. Ideálne tenké filmy musia vykazovať požadované vlastnosti, ako sú dostatočná kapacita liečiva, dlhá doba zotrvania v mieste podania a prijateľná stabilita formulácie. Zároveň zložky systému musia byť netoxické, biokompatibilné a biodegradovateľné [85,86].

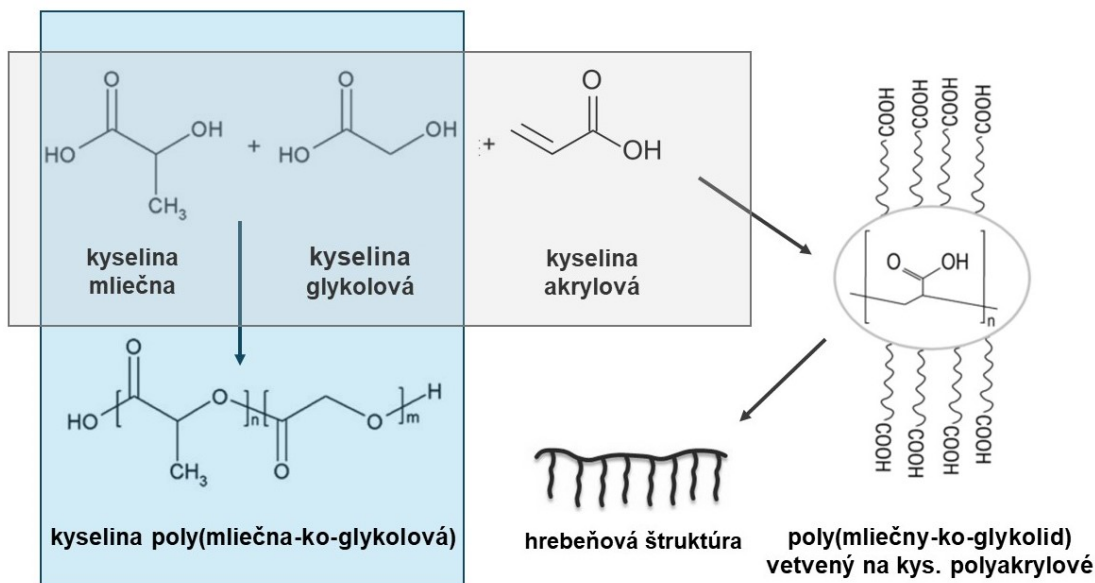
### 1.2.1 Polymérny nosič

Polyméry sú základom pre FFS a ich filmy *in situ*. Viaceré publikačné výstupy [74,77] obsahujú spracované prehľady polymérov vhodných na tvorbu filmov. Mnohé z týchto polymérov sú však hydrofilné, a teda nemuseli by zabezpečiť dostatočnú odolnosť voči vode pri bežných každodenných činnostiach, čo predstavuje prekážku pri ich dermálnej aplikácii [87]. FFS pripravené z hydrofóbných polymérov by mohli tento nedostatok eliminovať a zároveň by mohli umožniť dosiahnuť vyššiu kožnú substantivitu [75].

#### *Kyselina poly(mliečna-ko-glykolová) a jej deriváty*

Kyselina poly(mliečna-ko-glykolová) (PLGA) bola nami zvolená ako polymérny nosič vo formulácii FFS kvôli biokompatibilite a biodegradabilite, nedráždivým a hypoalergénnym vlastnostiam, s možnosťou modifikovať uvoľňovanie liečiv a bioadhezivitu [87]. V prospech zvoleného polyméru ďalej svedčia skutočnosti ako sú (1) schválenie autoritami (FDA a EMA) vo farmaceutickom sektore, (2) dobre známy spôsob výroby, (3) formulovanie prípravkov s obsahom hydrofilných i hydrofóbných aktívnych látok, (4) schopnosť ochrániť liečivá pred degradáciou alebo predĺžiť ich uvoľňovanie [88,89]. Využitie PLGA pri formulácii FFS prezentuje niekoľko štúdií [84,90–93]. Pri našich experimentoch sa pracovalo s originálne nesyntetizovanými a exaktne charakterizovanými derivátmi PLGA [94].

PLGA je kopolymér kyseliny mliečnej (LA) a kyseliny glykolovej (GA), ktorý vytvára lineárnu štruktúru. Polymér PLGA bol syntetizovaný jednoduchou priamou polykondenzáciou taveniny bez prídavku katalyzátora s pomerom 1:1 monomérov GA a D,L-LA [94]. Pri syntéze vetveného derivátu testovaného pre formuláciu FFS sa ako vetviace činidlo použila kyselina akrylová v množstve 4 % (PLGA/A) (Obrázok 4) [94]. Základné parametre nesyntetizovaných polymérov PLGA a PLGA/A sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 5).



Obrázok 4 Schematické znázornenie syntézy PLGA a PLGA/A

Tabuľka 5 Priemerná molárna hmotnosť, vnútorná viskozita a pomer vetvenia polyméru pre formuláciu FFS [94]

Typ	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$[\eta]_w$ [ml/g]	$g'$ ( $M_w$ )
PLGA 50:50	1700	2400	5,9	1
PLGA/A (4%)	10900	18700	8,0	0,42

Vysvetlivky: PLGA: lineárny polyester (kyselina glykolová a kyselina DL-mliečna v pomere 1:1); PLGA/A: polyester rozvetvený na kyseline polyakrylovej;  $M_n$ : Priemerná molárna hmotnosť;  $M_w$ : Priemerná hmotnostná molárna hmotnosť;  $[\eta]_w$ : Vlastná viskozita;  $g'$ : Pomer vetvenia

Hlavnými mechanizmami uvoľňovania liečiva z polyméru PLGA sú difúzia, ktorá prebieha z nedegradovaného alebo nabobtnaného polyméru, erózia a degradácia [95]. Najdôležitejším faktorom ovplyvňujúcim rýchlosť degradácie je molárna hmotnosť. Množstvo jednotky GA je kritickým parametrom na riadenie jeho hydrofilnosti [96]. Vhodným pomerom monomérov je možné optimalizovať parametre, ako je kapacita náplne liečiva, stabilita v biologických podmienkach alebo profil uvoľňovania liečiva [97]. Rozvetvenie prirodzene znásobuje počet prítomných voľných karboxylových skupín dostupných na viazanie vody, čo spôsobuje zníženie hydrofobicity polyméru PLGA/A [98].

Ďalšou dôležitou vlastnosťou polymérnej matrice, ktoré závisí od zloženia kopolyméru, a morálnej hmotnosti je teplota skelného prechodu ( $T_g$ ), ktorá má

nepriamy vplyv na rýchlosť degradácie polyméru. Teplota skelného prechodu je teplota, pri ktorej polymér prechádza z tvrdej, sklovitej formy na formu mäkkú, kaučukovitú. [96]. Nasyntetizované polyméry PLGA a PLGA/A majú teplotu skelného prechodu v hodnotách od 12 °C do 36 °C, čo je výhodou pri zamýšľanej dermálnej aplikácii [94].

Degradácia týchto polymérov je taktiež citlivá na stresové prostredie. PLGA stráca svoje mechanické vlastnosti pri vysokom namáhaní, čo vedie k rýchlejšej degradácii. Preto sú pevnosť v ťahu (maximálne napätie, ktoré materiál vydrží, kým sa pretrhne), percentuálne predĺženie (percentuálna zmena dĺžky materiálu pred zlomením) a modul pružnosti (meraná tuhosť materiálu, t. j. pomer medzi prírastkom aplikovaného napätia a prírastkom deformácie) polyméru PLGA dôležité na zachovanie mechanickej pevnosti, pružnosti a celkovej biostability. Aj v tomto prípade vplýva molárna hmotnosť na mechanickú pevnosť, ktorú možno charakterizovať z hľadiska vnútornej viskozity ( $[\eta]_w$ ) [99,100]. Konkrétne hodnoty tejto veličiny pre jednotlivé polyméry sú uvedené vo vyššie uvedenej tabuľke (Tabuľka 5).

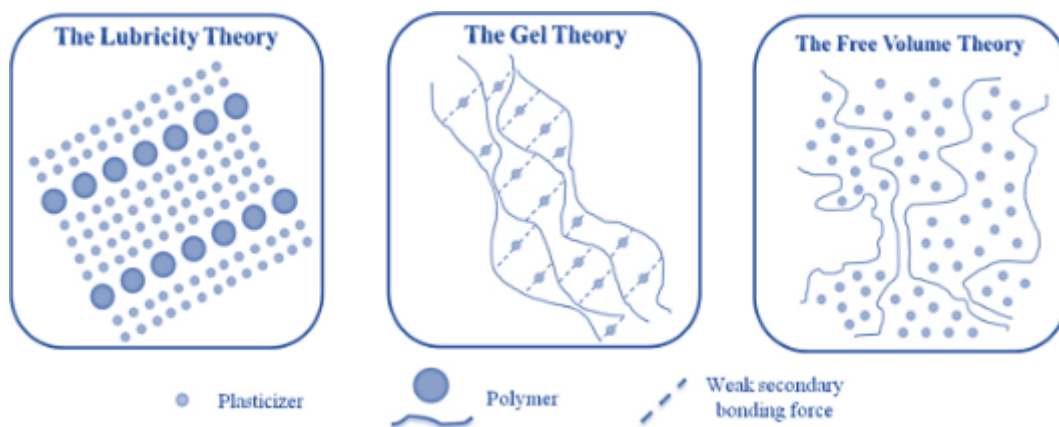
PLGA polyméry a ich deriváty PLGA/A prirodzene podliehajú degradácii vo vodnom prostredí v priebehu niekoľkých hodín alebo dní, v dôsledku hydrolyzy esterových väzieb [94,101]. Predpokladá sa, že degradácia PLGA prebieha v nasledujúcich krokoch: hydratácia, počiatková erózia, degradácia a solubilizácia. Hydratácia polyméru zahŕňa penetráciu vody do polyméru cez amorfnú oblasť, narušenie van der Waalsových síl a vodíkových väzieb. Pri počiatkovej erózii dochádza ku štiepeniu kovalentných väzieb a poklesu molárnej hmotnosti polyméru. Polymér stráca svoju mechanickú pevnosť, ale zachováva si svoju integritu. Hydrolytické štiepenie pokračuje a vytvára kyslý vedľajší produkt, ktorý je schopný následne autokatalyzovať reakciu, čo vedie k masívnemu štiepeniu a strate integrity polyméru. Posledný krok vedie k štiepeniu fragmentov polyméru za vzniku vo vode rozpustného laktátu a glykolátu. [102,103]. Vzniknuté oligomérené zlúčeniny by mali byť schopné uniknúť z matrice hneď, ako sa stanú rozpustnými [96].

### 1.2.2 Plastifikátor

Pri vývoji filmtvorných prípravkov je hlavným problémom krehkosť mnohých polymérnych filmov, vrátane polymérov PLGA a PLGA/A. Ak je film príliš krehký,

nemôže dôsledne kopírovať pohyby kože [104]. Tento problém je riešiteľný pridaním plastifikátora do FFS. Plastifikátory sú nízkomolekulové látky, ktoré sú schopné začleniť sa medzi reťazce polyméru a plastifikovať ho. Tento jav je vysvetľovaný teóriou voľného objemu, teóriou lubrikovateľnosti alebo gélovou teóriou (Obrázok 5) [105]. Plastifikácia polyméru sa prejavuje znížením teploty skelného prechodu ( $T_g$ ). Pri dermálnej aplikácii by ideálna  $T_g$  mala byť nižšia ako 32°C [106,107]. Okrem toho plastifikátory zlepšujú vzhľad filmu, zabraňujú jeho praskaniu, zvyšujú jeho pružnosť a dodávajú mu požadované mechanické vlastnosti. Optimalizáciou koncentrácie plastifikátora vo formulácii je možné ovplyvniť rýchlosť uvoľňovania liečiva [91,108]. Nízke koncentrácie plastifikátorov často vedú k zvýšeniu tuhosti polyméru namiesto očakávaného zmäkčenia [109]. V štúdiách sa považuje za optimálnu koncentráciu plastifikátora vo FFS 5 až 20 % z celkovej hmotnosti neprchavých látok [110,111]. Plastifikátory vhodné pre deriváty PLGA sú prezentované v prácach [112,113].

V tejto práci bol ako multifunkčný plastifikátor polymérov PLGA a PLGA/A zvolený MS. Potenciál MS spočíva v jeho schopnosti plastifikovať polymér, pričom by sa zároveň mohol stať sekundárnym zdrojom SA, a teda podporiť terapeutický účinok. Samotný mechanizmus premeny MS ako aj jej fyzikálno-chemické vlastnosti sú podrobnejšie rozobraté v kapitole 1.1.1 tejto práce.



Obrázok 5 Teórie plastifikácie [105]



### 1.2.3 Liečivo

Kritéria pre liečivo FFS pozostávajú, okrem požiadaviek na dermálnu penetráciu uvedených v kapitole 1.1 tejto práce, aj z požiadaviek na rozpustnosť. Liečivá látka musí byť rozpustná v nosnom rozpúšťadle systému. Počas procesu odparovania nesmie liečivo kryštalizovať, preto je rovnako dôležitá aj dostatočná rozpustnosť liečiva v neprchavých zložkách formulácie [62]. Koncentrácia a charakter samotného liečiva má vplyv na degradáciu polyméru. Kyslé liečivá sú schopné podporiť autokatalýzu polyméru, čím uvoľňovanie urýchlia [114]. V prípade zásaditých liečiv rozhoduje o modifikácii prítomnosť určitých funkčných skupín (napr. terciárny amín) alebo nukleofilné jadro. Tieto podporujú katalýzu degradácie matrice. Iné zásadité liečivá naopak negujú autokatalytické reakcie neutralizáciou kyslých foriem, a teda spomaľujú samotnú degradáciu polyméru [115,116]. Pri aplikácii na kožu, ktorá má pH približne 5,5 by sa malo rozmedzie pH systému s rozpusteným liečivom pohybovať medzi hodnotami 4 až 10. Tým je tento parameter optimalizovaný tak, aby ponúkal čo najlepší kompromis medzi požadovanou priepustnosťou cez pokožku a kožnou znášanlivosťou [117,118].

Kyselina salicylová bola inkorporovaná do nami vytvoreného FFS ako primárny zdroj farmakologicky účinnej látky. Zvolená bola taktiež z dôvodu, že predstavuje modelové hydrofóbne liečivo a je bezproblémovo stanoviteľná. Jej charakteristika ako aj fyzikálno-chemické vlastnosti sú bližšie uvedené v kapitole 1.1.1 tejto práce.

### 1.2.4 Rozpúšťadlo

Dôležitú zložku FFS tvorí rozpúšťadlo, ktoré musí byť schopné rozpustiť neprchavé zložky systému. Okrem toho má taktiež vplyv na permeáciu liečiva [119]. Keďže cieľom FFS je vytvoriť polymérny film v priebehu niekoľkých minút po aplikácii prípravku, rozpúšťadlo musí byť schopné dostatočne rýchlo sa evaporovať už pri teplote povrchu kože. Tým by sa mal minimalizovať diskomfort pre užívateľa. Rozpúšťadlo zároveň musí vyprchať rovnomerne a dostatočne pomaly, aby napriek výslednému zvýšeniu viskozity prípravku boli polyméry stále dostatočne schopné interagovať a vytvoriť homogénny film [62]. Pri evaporácii rozpúšťadla dochádza k zvyšovaniu koncentrácie liečiva v neprchavej časti systému. Pre túto prácu bol acetón zvolený ako spoločné rozpúšťadlo všetkých zložiek FFS.

Acetón (propan-2-on) je polárne aprotické rozpúšťadlo. Ide o číru, bezfarebnú kvapalinu s charakteristickým zápachom. Je prchavý a jeho výpary sú horľavé [41,121]. Podľa usmernenia Európskej liekovej agentúry (EMA) o *zvýškových rozpúšťadlách v liekoch pre bezpečnosť pacienta* je acetón zaradený do III. triedy rozpúšťadiel, t. z. majú nízky toxický potenciál a sú bezpečné pre ľudí [122]. Podľa FDA (*Food and drug administration*) a jeho zoznamu *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products* je acetón schválený na použitie v topických prípravkoch [123]. Výhodou použitia tohto rozpúšťadla pri dermálnej aplikácii je, že spôsobuje úbytok tuku na povrchu pokožky, ktorý následne nepôsobí na perkutánnu absorpciu testovaných zlúčenín [124].

### **1.3 Metódy charakterizácie FFS a tenkých filmov**

#### **1.3.1 Diferenciálna skenovacia kalorimetria**

Diferenciálna skenovacia kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC) je metóda termickej analýzy. Termická analýza sa zameriava na určovanie závislosti zmien fyzikálnych vlastností látky od teploty [41]. DSC je základnou a najčastejšie využívanou metódou pri vývoji vo farmaceutickej oblasti, pretože prispieva ku formulácií stabilného a vhodného liečivého prípravku [125,126]. Táto metóda ponúka možnosť získavať kvalitatívne a kvantitatívne informácie o endotermických a exotermických procesoch. Taktiež poskytuje informácie o zmenách v tepelnej kapacite, ktoré sa vyskytujú v dôsledku prebiehajúcich chemických alebo fyzikálnych zmien. Pod pojmom fyzikálne zmeny rozumieme: topenie, sublimáciu, vyparovanie (endotermický proces), kryštalizáciu (exotermický proces) a skelný prechod. Pod pojmom chemické zmeny rozumieme: dehydratáciu (endotermický proces), degradáciu (endotermický/exotermický proces), vytvrdnutie, zosieťovanie, oxidačnú degradáciu a polymerizáciu (exotermický proces) [127].

Podľa technického zostavenia prístrojov rozlišujeme DSC s tepelným tokom (heat flux DSC, hf-DSC) a DSC s kompenzáciou príkonu (power-compesated DSC, skr. pc-DSC). Štandardný teplotný rozsah prístrojov DSC je od  $-100$  až do  $600^{\circ}\text{C}$  a možno ich použiť pre pevné látky, polotuhé látky a kvapaliny. Literatúra často poukazuje na

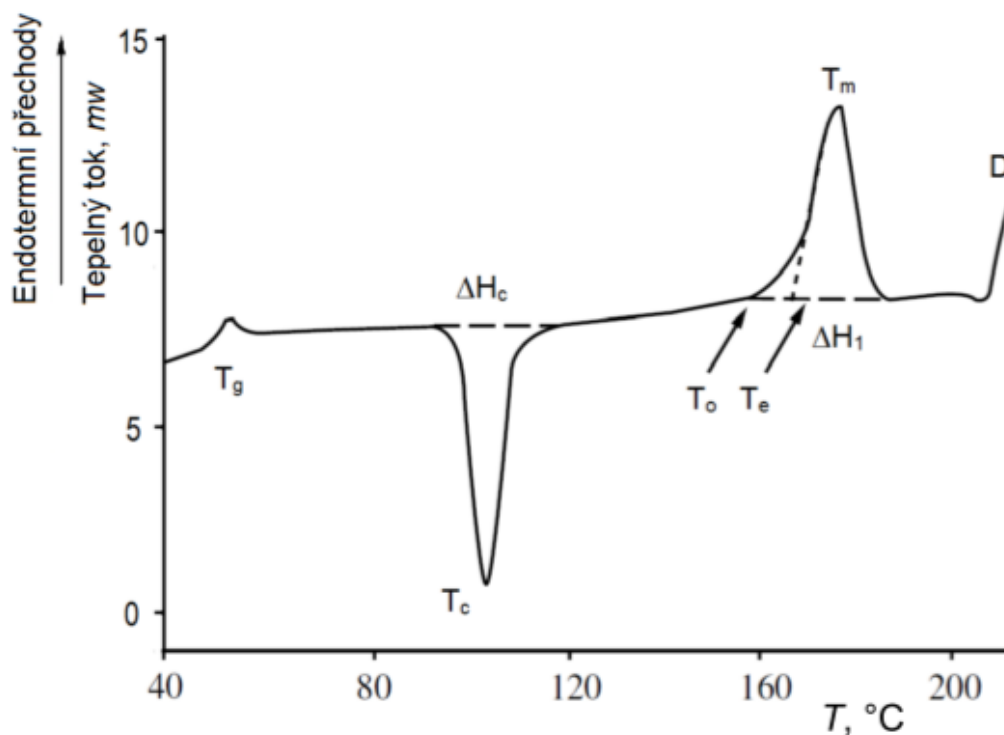
technické rozdiely, výhody, resp. nevýhody jednotlivých konštrukčných typov DSC, avšak pre konečného užívateľa sú tieto rozdiely zanedbateľné [128].

Princíp DSC spočíva v podrobení malého množstva vzorky nastavenému teplotnému režimu. Vzorka je navážená do panvičky a následne hermeticky uzavretá viečkom. Viečko sa prepichuje. Takto pripravená panvička sa vkladá do cely prístroja spolu s referenčnou vzorkou. Referenčná vzorka obvykle býva prázdna panvička. Cela je počas celého merania premývaná inertným plynom, napríklad dusíkom, aby bolo zabránené reakcii vzorky so vzduchom. Ohrievanie alebo chladenie prebieha konštantnou rýchlosťou alebo skokovo. Meranou veličinou je rozdiel tepla alebo energie, ktorú je potrebné dodať, aby boli udržané izotermické podmienky. Obvykle testovací model heat/cool/heat spočíva v nastavení dvoch ohrevných cyklov a riadeného chladenia medzi nimi. Maximálna teplota ohrevu sa volí aspoň o 10 až 15 °C vyššia ako je teplota skelného prechodu alebo teplota topenia vzorky a zároveň nižšia ako je teplota rozkladu daného materiálu. Prvá krivka ohrevu popisuje správanie sa materiálu v jeho pôvodnom stave, keď zachytáva všetky vplyvy tepelnej histórie. Chladenie poskytuje informácie o resolidifikácii materiálu a vymazáva už známu tepelnú históriu. Druhá krivka ohrevu súvisí so skutočnými vnútornými zmenami prebiehajúcimi v materiáli [129].

DSC dáta sú typicky vyjadrené ako závislosť energie na teplote. V súčasnosti neexistuje žiadna konvencia o spôsobe prezentovania výsledkov, preto je smer endotermických a exotermických procesov (nahor alebo nadol od nulovej čiary) ponechaný na preferenciách výskumníka [128]. Na termograme (Obrázok 6) sa pred fyzikálnou alebo chemickou zmenou materiálu zobrazuje základná línia, ktorá udáva tepelný tok, resp. príkon potrebný na zvýšenie teploty vzorky tak, aby sa dodržal program ohrevu. Ide o funkciu tepelnej kapacity vzorky. Tento parameter predstavuje energiu potrebnú na zvýšenie teploty vzorky o 1 K [130].

Nasledujúci obrázok (Obrázok 6) znázorňuje termickú krivku, ktorá má definované konkrétne charakteristiky. Šírka piku vypovedá o čistote vzorky. Pri znečistených substancích teplota topenia klesá a charakteristická endoterma sa rozširuje a znižuje. Pri každom zázname piku sa určuje teplota počiatku (*onset temperature*  $T_o$ ), teplota extrapolovaného piku (*extrapolated temperature*  $T_m$ ) a entalpia topenia, ktorá je úmerná ploche piku ( $\Delta H$ ) [125,131]. Pre termické chovanie amorfných látok je

charakteristický endotermný skelný prechod (*glass transition*) [132,133]. Prejavuje sa na úrovni mechanických vlastností (krehkosť pod teplotou prechodu a pružnosť nad teplotou prechodu) a na úrovni zmeny tepelnej kapacity. Pre meranie teploty skelného prechodu sa využíva rýchlosť ohrevu 10 K/min. Amorfne látky bývajú častokrát hygroskopické, a preto je doporučené merať skelný prechod na jednej vzorke opakovane vo viacerých cykloch. Zamedzuje sa tým skresleniu v dôsledku vplyvu vody naabsorbovanej na povrchu vzorky, ktorá môže posunúť hodnotu  $T_g$  k nižším hodnotám. Preto sa za výslednú teplotu skelného prechodu považuje hodnota inflexného bodu z krivky druhého ohrevu [132,134].



Obrázok 6 DSC záznam [131] ( $T_g$  - skelného prechod,  $T_c$  - teplota rekryštalizácie,  $\Delta H_c$  - entalpia rekryštalizácie,  $T_o$  - teplota onsetu (počiatočná teplota topenia),  $T_e$  - extrapolovaná teplota onsetu topenia,  $\Delta H_1$  - entalpia topenia,  $T_m$  - pik teploty topenia a  $D$  - degradácia)

Samotná interpretácia výsledkov je častokrát náročná, avšak informácie o podstate a chovaní látok umožňujú optimalizovať vývoj liekovej formy s výhodnejšími vlastnosťami. Napriek tomu, že DSC má oproti iným metódam niekoľko nesporných výhod (malé množstvo vzorky, citlivosť), neuvádza priamu informáciu o štruktúre látky, ani nie je schopná rozlišovať medzi vzorkami, ktoré majú podobný bod

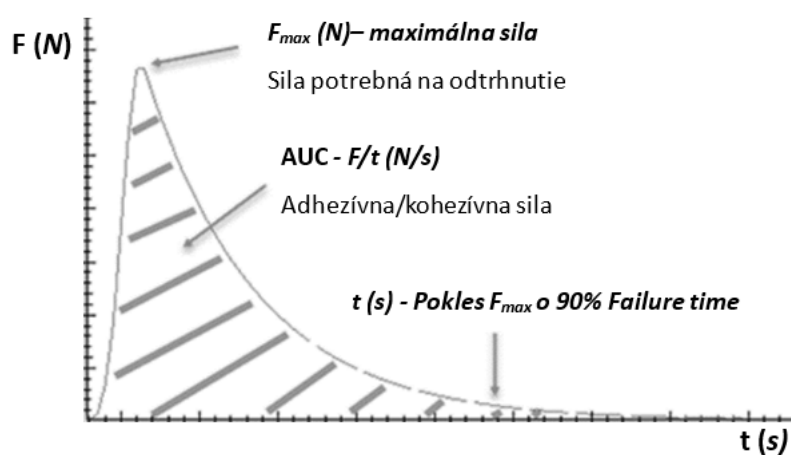
topenia/prechodu. Ďalším obmedzením je skutočnosť, že táto metóda je deštruktívna a vyžaduje nulovú interakciu medzi panvičkou a skúmanou látkou. Oblasť odberu vzoriek nemusí byť reprezentatívna pre materiál ako celok a ak dôjde ku chemickým reakciám súčasne s fázovým prechodom, spoľahlivosť DSC klesá [135,136].

### 1.3.2 Adhezivita, tokové vlastnosti a ich testovanie *in vitro*

Adhézia je jedným z kritických parametrov FFS, keďže film vytvorený *in situ* je samoadhezívna LF určená k podávaniu liečiva po aplikácií na kožu. Adhézne vlastnosti vznikajú na základe medziatómových a medzimolekulových príťažlivých síl, ktoré sa vytvoria na rozhraní film/koža za predpokladu, že dôjde k ich kontaktu. Film by mal vykazovať dostatočnú elasticitu, aby sa prispôboval povrchovej nerovnosti a relaxácii. Pre konzistentné podávanie a penetráciu liečiva do kože je nevyhnutný úplný kontakt kože s celým povrchom filmu počas daného terapeutického obdobia. Ak sa zmenší plocha kontaktu, zníži sa množstvo penetrovaného liečiva a môže dôjsť k terapeutickému zlyhaniu [137]. Zároveň by film nemal prilnúť k iným materiálom, aby sa napríklad zabránilo prilepeniu k oblečeniu [138].

Testovaním adhézných vlastností *in vitro* je možné určiť informácie ako sú lepivosť a sila potrebná na odtrhnutie od substrátu [139]. Lepivosť možno charakterizovať ako nežiadúcu povrchovú adhéziu *in situ* filmu pri nízkom kontaktnom tlaku. *Thumb tack test* je jednoduchá metóda, ktorá sa používa na popis lepivosti. Pri tomto testovaní si hodnotiaci subjekt vytvorí stupnicu pre každý pozorovaný parameter (napr. od 0 t. j. žiadna lepivosť do 5 t. j. veľmi silná lepivosť), ktorú následne využíva podľa vlastného subjektívneho vnemu. Bežne dokumentované parametre sú vzhľad filmu pred a po skúške, hrúbka a drsnosť vrstvy testovaného produktu, sila potrebná na odlepenie prstu z povrchu prípadne sila potrebná na preniknutie do vrstvy, rozsah poškodenia spôsobený priložením palca (praskanie, odlupovanie, zanechanie odtlačku) atď. Zdokumentovaním týchto parametrov je možné vytvoriť komplexný záznam výsledkov, ktoré sú však ťažko kvantifikovateľné a porovnateľné s inými testovaniami. Preto boli vyvinuté sofistikovanejšie metódy na kvantifikáciu adhézie, ku ktorým patria napríklad *rolling ball tack test*, *probe tack test*, *180° peel tack test* a *loop tack test* [139,140]. Schematické vyobrazenie týchto metód sú vedené v nasledujúcom prehľade (Obrázok 9).

V tejto práci bol na stanovenie adhézie použitý rotačný reometer Kinexus Pro+ s preddefinovaným programom pre metódu *tack test*. Pri tejto metóde geometria prichádza do kontaktu s filmom pri pevne stanovenej rýchlosti, kontaktnom tlaku a kontaktnom čase. Adhezivita sa potom zaznamená ako maximálna sila potrebná na prerušenie výsledného spojenia. V takomto prípade je možné z grafu identifikovať (a) vrchol zápornej normálovej sily/ťahu ( $F_{max}$ ) potrebnej na odtrhnutie, (b) obsah plochy pod krivkou závislosti sily na čase vyjadrujúcej vzájomný pomer adhézných, kohéznych síl a (c) určiť čas potrebný na pokles maximálnej sily o 90 % (*Failure time*) vyjadrujúcej čas, resp. rýchlosť zlyhania adhézie (Obrázok 7) [138].

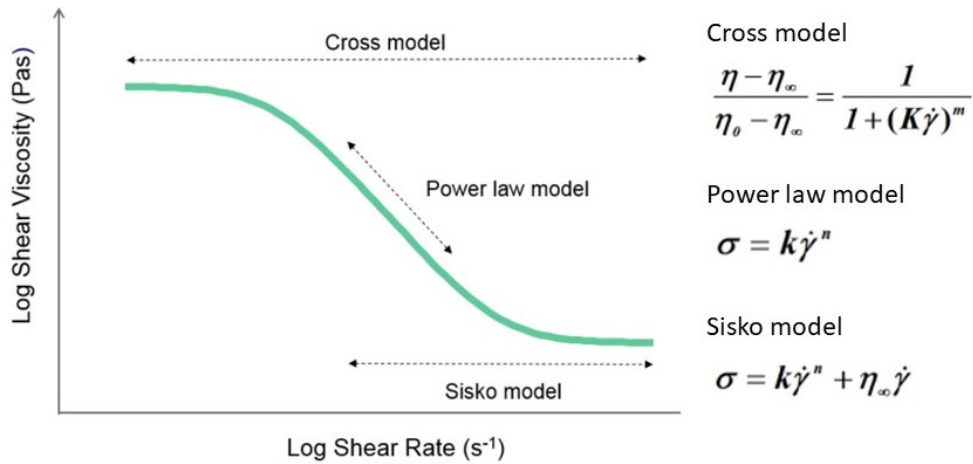


Obrázok 7 Parametre pre vyhodnotenie Pull away testu [141]

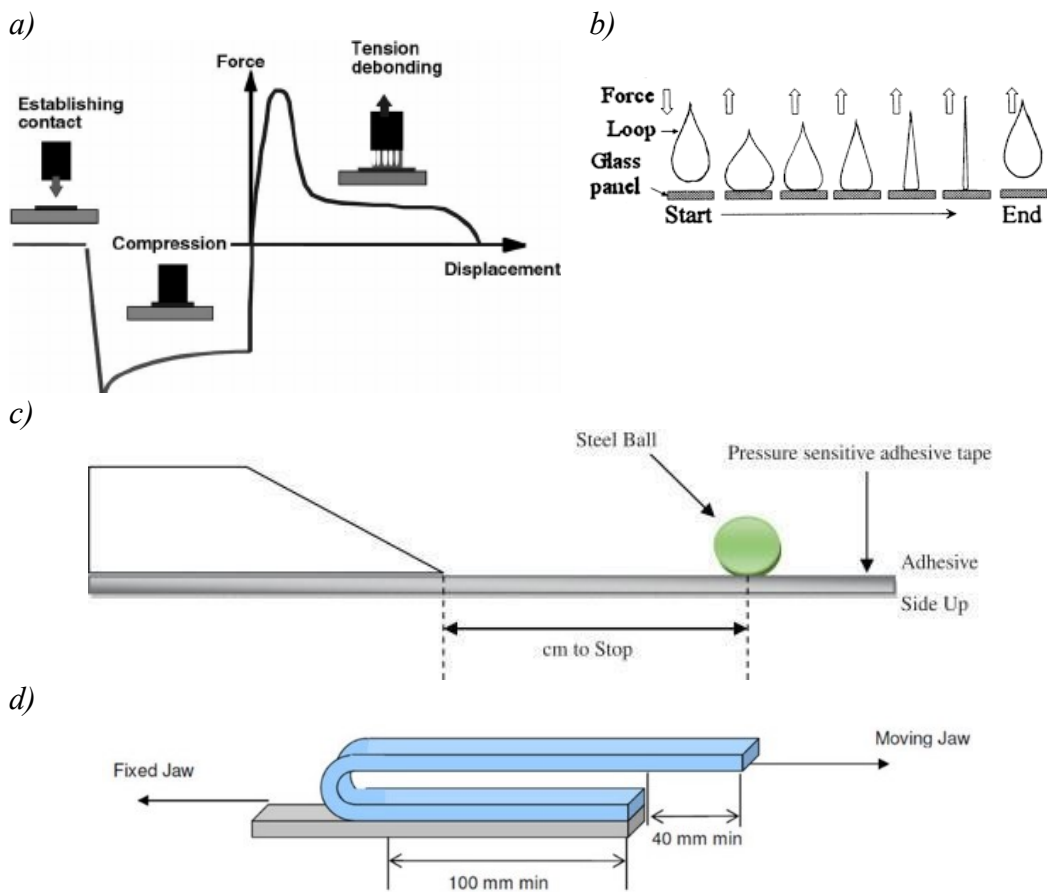
Adhezivita súvisí aj s inými reologickými vlastnosťami ako sú kohéznosť a viskozita pri namáhaní. Nízka viskozita naznačuje nízku súdržnosť filmu, čo ovplyvní kinetiku uvoľňovania liečiva [145]. Viskozita ( $\eta$ ) je reologická charakteristika popisujúca odpor voči prúdeniu, definovaná ako vnútorné trenie, ku ktorému dochádza v kvapalinách počas šmykového napätia ( $\tau$ ). Závislosť viskozity od rýchlostného spádu ( $D$ ) vynesená do grafu sa nazýva viskozitná krivka, zatiaľ čo toková krivka je grafickým zobrazením závislosti medzi šmykovým napätím a rýchlostným spádom. Na grafe (Obrázok 8) je znázornený ideálny priebeh viskozitnej krivky a modely jej popisu (Crossov model, Power-law model a Siskov model). Vhodnosť modelu je možné následne vyjadriť korelačným koeficientom. Lineárna časť log-log grafu reflektuje rozpad štruktúry materiálu vplyvom aplikovaného napätia. [146].

V tejto práci bol na stanovenie tokových vlastností použitý absolútny rotačný reometer Kinexus Pro+ s preddefinovaným programom. Bol testovaný účinok definovaného

rýchlostného spádu v rozsahu od 0,01 do 10,0 s<sup>-1</sup>, pri teplote 32 °C. Zvolené boli relatívne nízke hodnoty rýchlostného spádu predstavujúce mierne namáhanie filmu v mieste aplikácie.



Obrázok 8 Viskozitná krivka a príslušné modely na opis jej priebehu



Obrázok 9 Schématická ilustrácia a) probe tack test [141], b) loop tack test [142], c) rolling ball tack test [143] a d) 180° peel adhesion test [144]

### 1.3.3 Disolúcia

Hlavnou úlohou disolučných testov je biofarmaceutická charakterizácia lieku, zabezpečenie konzistentnej kvality produktu a predpovedanie biologickej dostupnosti liečiva *in vivo* pri štandardizovaných podmienkach. Konkrétne slúži na zisťovanie množstva aktívnej látky uvoľňovanej z rôznych LF s použitím známeho objemu disolučného média a stanoveného času.

Testovacie disolučné metódy boli pôvodne vyvinuté pre pevné LF [147]. Neskôr sa rozšírili na iné, nové LF, ktoré častokrát musia prejsť dezintegráciou, pričom dezintegrovaná hmota by sa nemala voľne pohybovať s pohybujúcou sa tekutinou [148]. Aj to je jeden z dôvodov potreby modifikácie pôvodných liekopisných metód [147]. Český liekopis v súčasnosti definuje skúšky pre transdermálne prípravky, ktorými sa stanovuje rýchlosť disolúcie liečivých transdermálnych náplastí. Opisuje metódy skúšania ako sú disková metóda, metóda s extrakčnou celou a metóda rotujúceho valca. Taktiež definuje (1) zloženie, objem a teplotu disolučného média, ktoré by malo odrážať fyziologické podmienky kože, (2) rýchlosť otáčania alebo prietoku média celou, ktorá ovplyvňuje rýchlosť disolúcie a zároveň udržiava rovnomernú koncentráciu v celom objeme média, (3) podmienky priebežného sledovania, (4) metódy analýzy a (5) kritéria prijateľnosti. Pri hodnotení disolúcie LF s predĺženým uvoľňovaním, kde spadajú i filmtvorné prípravky, je zásadné určiť intervaly uvoľnenia 20 až 30 % účinnej látky (kvôli zachyteniu prípadného rýchleho uvoľňovania), interval uvoľnenia 50 % a interval uvoľnenia 80 % účinnej látky (je považovaný za interval s dostatočným celkovým uvoľnením liečiva z LF). V špecifických prípadoch sa v databáze FDA odporúča pri nízkych dávkach liečiva znížiť objem média za účelom zvýšenia citlivosti kvantitatívneho stanovenia a získania disolučného profilu [41,149].

Zhang et al. [150] uvádzajú prehľad použitých prístrojov na disolučné testovanie komerčných tenkých filmov na dostupných na trhu USA, ktorý získali na základe informácií z US FDA Dissolution Methods Databas. Na disolučné testy boli použité rôzne prístroje, vrátane košíkového prístroja a prístroja s pádlom nad diskom. Práca uvádza, že nebola zjavná žiadna korelácia medzi parametrami prístroja, metódami disolučného testu a vlastnosťami filmu ako je obsah liečiva a miesto aplikácie. Následne práca porovnáva požiadavky na disolučné testovanie pre komerčné filmové



prípravky na trhu v Japonsku, ktoré sú v súčasnosti všetky perorálne. Na rozdiel od USA, sa v Japonsku na testovanie používa pádlový prístroj, s prípadným pridaným ponorným zariadením pre film a s rýchlosťou otáčania 50 ot./min [150]. Pre európsky liekový trh však podľa našich zistení aktuálne nie je dostupná prehľadová práca s informáciami o disolučnom testovaní tenkých filmov.

V experimente diplomové práce sa vychádzalo z liekopisnej metódy 2.9.4. *Skúška disolúcie náplastí, 2 Metóda s extrakčnou celou*, ktorá bola modifikovaná s ohľadom na spôsob aplikácie FFS a podmienkami v mieste aplikácie [151]. Keďže pokožka nedisponuje významnou prítomnosťou vodného prostredia, tato podmienka bola zohľadnená i v zmenšení objemu disolučného média na objem vialky. Ako nosič filmu bolo použité dno vialky, ktoré zaisťovalo konštantnú kontaktnú plochu filmu s disolučným médiom. Tým sa zamedzilo zmene faktoru, ktorý významne vplýva na priebeh uvoľňovania liečiva [152]. Vialka bola počas celej doby skúšania uzavretá viečkom, ktoré zabraňovalo odparovaniu média, a teda zakonzertovaniu vzorku. Miešanie média v uzavretej vialke bolo zaistené trepaním vo vytemperovanom vodnom kúpeli na 32°C.

## 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 2.1 Suroviny

Acetón p.a. (Lachema a.s., Česká republika), CAS: 67-64-1

Akutel<sup>TM</sup> (AVEFLOR, Česká republika)

Čistená voda (FaF UK HK, Česká republika), CAS: 7732-18-5

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lachema a.s., Česká republika), CAS:7778-77-0

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a (Penta Chrudim, Česká republika), CAS: 10039-32-4

Hydroxid sodný čistý (Penta Chrudim, Česká republika), CAS: 1310-73-2

Kyselina salicylová (Fagron a.s., Holandsko), CAS: 69-72-7

Lamisil once (Novartis, Švajčiarsko)

Metylsalicylát (Sigma-Aldrich, USA), CAS: 119-36-8

Polymér PLGA/A (Katedra farmaceutickej technológie, FaF UK HK, Česká republika)

Polymér PLGA (Katedra farmaceutickej technológie, FaF UK HK, Česká republika)

Tablety pre prípravu fosforečnanového pufru pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA)

Urgo filmogel R (Laboratoires Urgo, Francúzsko)

### 2.2 Prístroje

Alu panvička pro DSC (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Nemecko)

Analytické digitálne váhy Discovery, max. 210g, d=0,1mg (OHAUS, Švajčiarsko)

Analytické digitálne váhy RADWAG, max. 5,1g d=1 µg (RADWAG, Poľsko)

DSC 200 F3 Maia® (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Nemecko)

Nízkovakuové zariadenie na nanášanie vrstiev EM ACE 200 (Leica, Nemecko)

Magnetická miešačka s ohrevom IKA – (WERKE, Nemecko)

Rotačný reometer Kinexus Pro+ (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Nemecko)

SEM FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko)

Spektrofotometer Specord 205 (Analytik Jena, Nemecko)

Stolný digitálny pH meter – HI 221 (Hanna Instrumenst, Česká republika)

Sušička MEMMERT® ULE 400 (MEMMERT, Nemecko)

Vodný kúpeľ Julabo SW22 (Fisher Scientific, Česká republika)

## 2.3 Príprava pufov

### *Fosforečnanový pufer pH 7,4*

Tableta pre prípravu fosforečnanového pufru pH 7,4 bola podľa pokynov rozpustená v 200,0 ml čistenej vode na elektromagnetickej miešačke za laboratórnej teploty.

### *Fosforečnanový pufer pH 5,5*

Príprava vychádza z liekopisu [41]. Bol pripravený Roztok A, ktorý obsahoval 13,61 g dihydrogenfosforečnanu draselného R rozpusteného vo vode a zriedeného na 1000 ml. Roztok B bol pripravený z 35,81 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R, ktorý sa rozpustil a narietil do 1000 ml vo vode R. Pripravené roztoky sa následne zmiešali v pomere 96,4 ml roztoku A ku 3,6 ml roztoku B. Digitálnym pH metrom, Hanna Instrumenst – HI 221 sa skontrolovalo výsledné pH roztoku.

## 2.4 Príprava FFS

Tekuté sústavy na tvorbu filmov (FFS) sú zložené z PLGA/A, kyseliny salicylovej, metylsalicylátu a acetónu. Pomer polymérneho systému (PLGA/A, SA, MS) a acetónu bol 1 : 1; 1 : 2 alebo 1 : 4. Jednotlivé pomery zložiek sú uvedené v Tabuľka 6.

*Tabuľka 6 Zloženie systémov pre in situ tvorbu filmov*

Formulácia	Polymérny systém			Acetón [mg]
	PLGA/A [mg]	SA [mg]	MS [mg]	
FFS 1	1900	100	-	
FFS 2	1800	-	200	2000
FFS 3	1700	100	200	
FFS 4	1600	-	400	
FFS 5	1700	100	200	4000
FFS 6	1700	100	200	8000

*Vysvetlivky: SA: kyselina salicylová, MS: metylsalicylát, PLGA/A: kyselina poly(mliečna-ko-glykolová) vetvená na kyseline polyakrylovej v 4 % zmesi*

## 2.5 Degradácia PLGA

Bola testovaná degradácia lineárneho a vetveného PLGA vo fosforečnanovom pufri pH 5,5 pri 32 °C. Do vytárovanej vialky bolo navážených 100 mg rozdrobeného

polyméru. Polymér sa nechal roztaviť pri teplote 90 °C v teplovzdušnej sušiarňi. Celý proces tavenia trval približne 30 min resp. do času viditeľného roztavenia všetkých pevných častíc. Polymérny film na dne vialky bol následne preliaty 10 ml pufrom ohriateho na teplotu 32 °C. Vzorky boli uložené v termostate pri teplote 32 °C. Pre každý polymér bolo pripravených osemnásť vzoriek. V stanovených časových intervaloch (0,25; 0,5; 1; 2; 3 a 6 dní) boli z termostatu vybrané tri vzorky z každého polyméru. Bol odliaty pufr a odstránená vlhkosť zo steny vialky a povrchu filmu. Vialka so zbobtnalým filmom bola zvažovaná. Potom bol film na dne vialky sušený v teplovzdušnej sušiarňi pri 60 °C do konštantnej hmotnosti a hmotnosť bola zaznamenaná. Následne bol vypočítaný percentuálny úbytok hmotnosti polyméru a graficky bol znázornený časový priebeh degradácie. Taktiež bola vytvorená fotodokumentácia.

## 2.6 Tokové a adhézne vlastnosti

Testovanie tokových a adhézných vlastností prebiehalo na rheometri Kinexus Pro+ v usporiadaní doska-doska s použitím hornej geometrie o priemere 20 mm (PU 20). Pre oba testy boli vzorky pripravované identicky, a to tak, že dolná geometria sa nechala vytemperovať na 32 °C, následne bola z reometru odobratá a vytárovaná na váhach. Na stred dolnej geometrie bola navážená 0,1 g FFS a geometria so vzorkou bola zapojená naspäť do reometrau. FFS bol po dobu 5 min ponechaný na geometrii naďalej temperovanej na 32°C, aby došlo k evaporácii rozpúšťadla a vytvoreniu filmu. Následne vzorky boli podrobené tokovým a adhéznym testom.

Boli hodnotené tokové vlastnosti polyméru PLGA/A plastifikovaného 10 % a 20 % MS (FFS 2 a 4). V softvéri rSpace v1.76 bol spustený test *Toolkit\_V005 Shear Rate Ramp - Alternative Flow Curve.rseq*. Parametre boli nastavené nasledovne: rýchlostný spád v rozsahu 0,01 až 10,0 s<sup>-1</sup> a teplota 32 °C. Boli získané tokové a viskozitné krivky a na základe ich priebehu vybraný Newtonov alebo Power-law model pre ich matematický popis. Primeranosť modelu potvrdzuje korelačný koeficient, ktorého hodnota by sa mala približovať k jednej. Na vyhodnotenie vplyvu MS na tokové vlastnosti boli použité parametre modelov, a to hodnota viskozity  $\eta$  (Pa·s) pre newtonovský model alebo index konzistencie  $K$  (Pa·s<sup>n</sup>) a index tokového správania  $n$  (-) v prípade Power-law (mocninného) modelu.

Boli hodnotené adhézne vlastnosti filmov vytvorených *in situ* z FFS 1, 2 a 3 a filmu čistého PLGA/A. V softvéri rSpace v1.76 bol spustený test *rSolution\_0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements*. Parametre boli nastavené nasledovne: kontaktný čas 30 s, kontaktná sila 1 N, rýchlosť odťahovania hornej geometrie 50 mm/s. Pre vyhodnotenie priľnavosti boli využité parametre: maximálna sila pre odtrhnutie  $F$  (N), čas potrebný k poklesu maximálnej sily o 90 %  $t$  (s) a plocha pod krivkou závislosti sily na čase (N/s).

## 2.7 DSC

Termická analýza polyméru PLGA/A, SA, MS a filmov vytvorených po evaporácii organického rozpúšťadla z FFS 1 – 3 bola urobená na prístroji DSC 200 F3 Maia, NETZSCH (Tabuľka 6). Príprava vzoriek do DSC zariadenia pozostávala z nasledujúcich krokov: (a) vytvorenie otvorov do viečka panvičky, (b) odváženie hmotnosti prázdnej panvičky s viečkom na analytických váhach RADWAG, (c) naváženie vzorky s hmotnostným rozmedzím 9 - 15 mg a (d) hermetické uzatvorenie panvičky viečkom za pomoci lisu na to určeného. Následne bola zlisovaná panvička so vzorkou odvážená znova. Bola vypočítaná hmotnosť vzorky ako rozdiel hmotnosti panvičky s obsahom vzorky a prázdnej panvičky.

Takto pripravená vzorka bola umiestnená na snímač do meracej cely DSC, na druhý snímač bola umiestnená referenčná prázdna panvička. Po uzavretí cely sa v softvéri NetzschProteus 8.0 nastavili vstupné informácie o vzorke, ako sú: hmotnosť prázdnej panvičky, hmotnosť vzorky, prietok dusíka rýchlosťou 50 ml/min, teplotný režim zvolený podľa očakávanej teploty skelného prechodu daného polyméru známeho z predchádzajúcich experimentov [153], teploty topenia liečivej látky a teploty evaporácie plastifikátoru (Obrázok 10). Vyhodnotenie DSC kriviek bolo vykonané v softvéri Proteus analysis. Teplota topenia a evaporácie bola získaná polohou píku na krivke prvého ohrevu, teplota skelného prechodu bola určená v inflexnom bode na krivke druhého ohrevu.

Total Selection	Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Isothermal	60.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	7 Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	8 Isothermal	60.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	9 Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	10 Isothermal	20.0 °C	5 min	

a) PLGA/A

Total Selection	Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Dynamic	200.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Isothermal	200.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Isothermal	-20.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	7 Dynamic	200.0 °C	10.0 K/min	
<input checked="" type="checkbox"/>	8 Isothermal	200.0 °C	5 min	
<input checked="" type="checkbox"/>	9 Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min	

b) SA, MS, *in situ* filmy

Obrázok 10 Teplotné režimy DSC

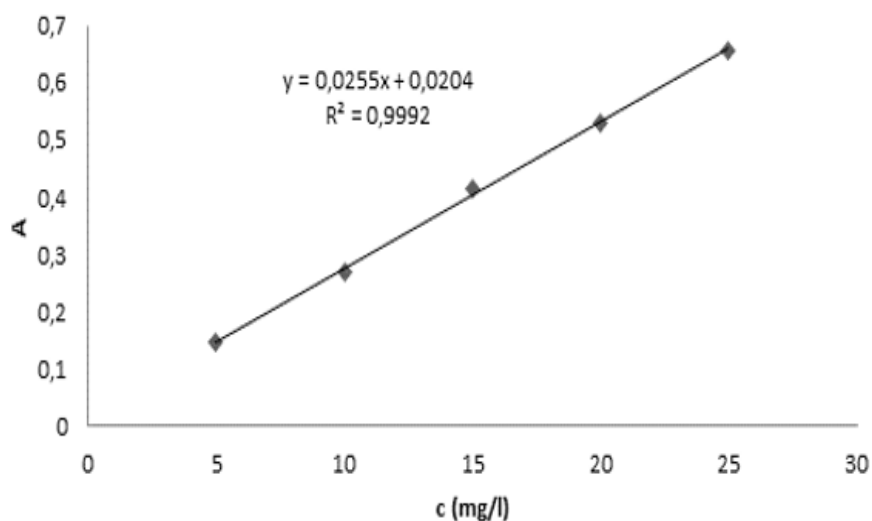
## 2.8 SEM

Pomocou SEM bol sledovaný povrch filmov vytvorených *in situ* z FFS 1, 3, 5 a 6 (Tabuľka 6) a komerčných prípravkov Akutol, Urgo filmogel, Lamisil Once. Filmy *in situ* boli pripravené rozotrením alebo nasprejovaním FFS na podložné sklíčka a odparením organického rozpúšťadla. SEM takto pripravených filmov bola prevedená na katedre fyziky Prírodovedeckej fakulty UHK (Mgr. Jan Loskot Ph.D.). Vzniknutý film bol upravený pokrytím 8 nm vrstvy zlata pomocou rozprašovača EM ACE 200. Snímky boli vyhotovené rastrovým elektrónovým mikroskopom FlexSEM 1000 pri urýchľovacom napätí 15 kV. Bol hodnotený povrch filmov a vplyv plastifikátora a množstva použitého rozpúšťadla na jeho vzhľad.

## 2.9 Disolúcia

Boli uskutočnené disolučné testy *in situ* PLGA/A filmu z FFS 1, 2 a 3 (Tabuľka 6). FFS o objeme 500 µl bol pomocou mikropipety nanosený na dno vialky. Vzorky boli vložené do horkovzdušnej sušiarne na dobu 5 minút pri teplote 40 °C s cieľom odpariť organické rozpúšťadlo. Odparenie rozpúšťadla bolo overené gravimetricky. Pre každé zloženie filmu boli vzorky pripravené triplicitne. *In situ* vytvorené filmy boli preliate 10 ml fosforečnanového pufru pH 7,4 a vložené do termostatu udržiavaného na 32 °C. V časových intervaloch 3, 9, 24, 48, 72 a 144 hodín bol pufer odobratý a nahradený pufrom rovnakého objemu zahriateho na 32 °C. V disolučnom médiu bolo metódou kalibračnej krivky na spektrofotometri Specord 205, Analytik Jena stanovené množstvo kyseliny salicylovej. Absorbancia každej vzorky bola meraná pri vlnovej

dĺžke 298 nm trikrát, z čoho bol vypočítaný priemer. Priemerované boli následne i triplicitné vzorky filmov. Pre každý časový interval sa zo získaných hodnôt absorbancie pomocou rovnice kalibračnej priamky (Obrázok 11) vypočítalo množstvo uvoľnenej SA, podiel z celkového množstva SA inkorporovanej do filmu, a následne kumulatívne percento (Rovnica 1). Výsledky disolučného testu sú prezentované graficky ako časový profil uvoľňovania kyseliny salicylovej v závislosti na zložení *in situ* filmov.



Obrázok 11 Kalibračná krivka kyseliny salicylovej

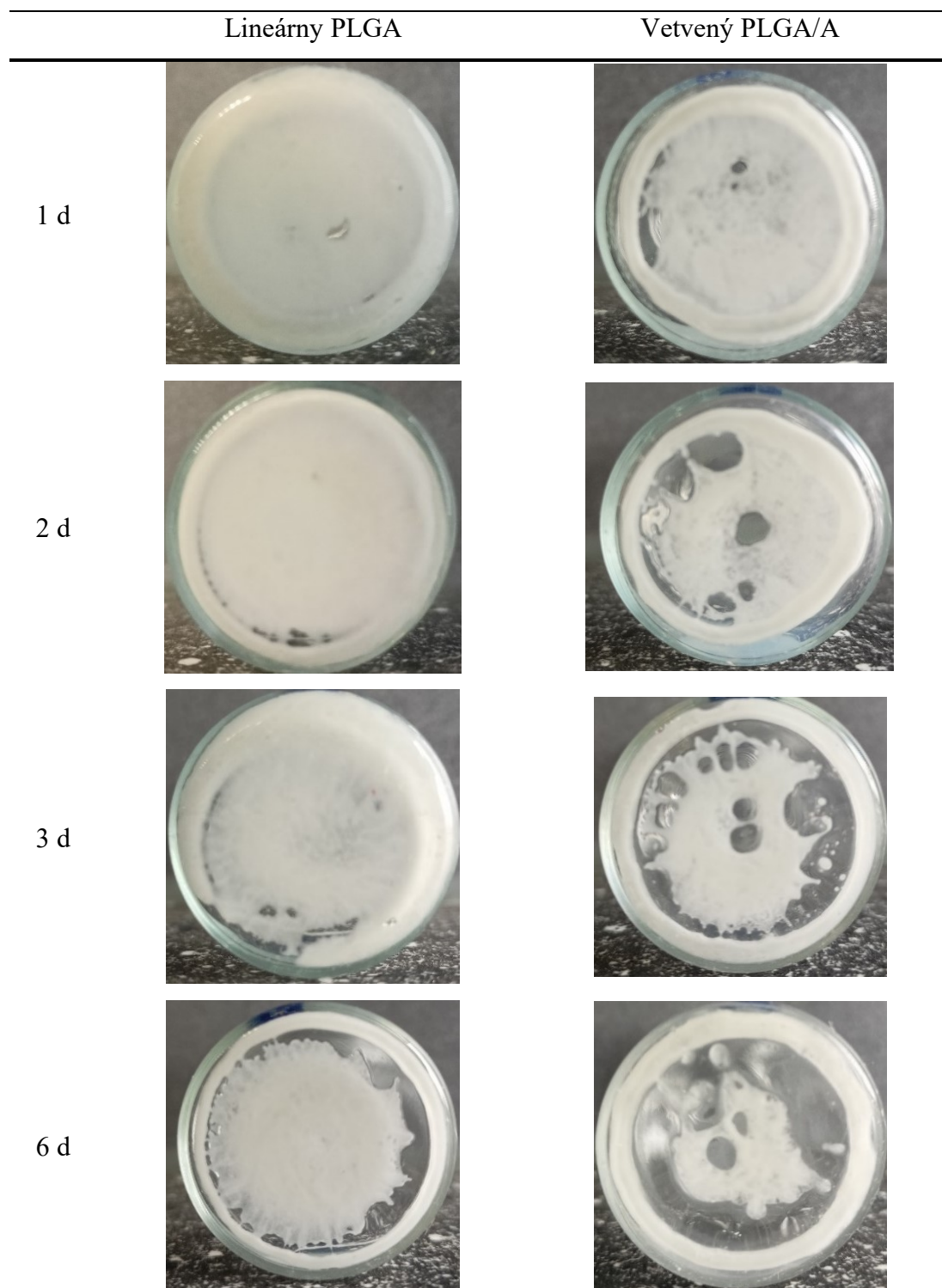
Rovnica 1 Obsah nameranej SA odvodený z rovnice kalibračnej krivky pre SA

$$SA = \frac{A - 0,0204}{0,0255} \times zr. \times \frac{1}{1000} \times V$$

kde SA je množstvo kyseliny salicylovej (mg),  
A je absorbancia (-),  
zr. je zriedenie (-),  
V je objem disolučného média (ml).

### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Degradácia PLGA



Obrázok 12 Vizualizácia priebehu bobtnania a degradácie PLGA a PLGA/A



*Tabuľka 7 Degradácia lineárneho PLGA*

Čas (dni)	Označenie	$m_0$ (mg)	$m_t$ (mg)	%	Priemer (%)	SD
0,25	A	105,32	105,20	99,89	99,83	0,06
	B	107,12	106,88	99,78		
	C	107,72	107,55	99,84		
0,5	A	102,72	102,12	99,42	99,02	0,66
	B	101,74	99,97	98,26		
	C	106,75	106,09	99,38		
1	A	107,94	106,70	98,85	99,28	0,58
	B	103,96	102,96	99,04		
	C	102,74	102,68	99,94		
2	A	106,76	105,57	98,89	98,70	0,79
	B	100,91	100,29	99,39		
	C	109,56	107,19	97,84		
3	A	101,32	97,75	96,48	96,49	0,10
	B	102,36	98,87	96,59		
	C	106,35	102,51	96,39		
6	A	104,26	74,23	71,20	68,74	2,13
	B	96,38	65,02	67,46		
	C	94,45	63,82	67,57		

*Vysvetlivky:  $m_0$ : počiatková hmotnosť,  $m_t$ : hmotnosť in situ filmu v čase  $t$*

Tabuľka 8 Degradácia vetveného PLGA/A

Čas (dni)	Označenie	$m_0$ (mg)	$m_t$ (mg)	%	Priemer (%)	SD
0,25	A	101,47	95,65	94,26	94,29	0,47
	B	98,12	92,99	94,77		
	C	104,11	97,68	93,82		
0,5	A	105,05	90,24	85,90	86,85	1,03
	B	102,79	89,12	86,70		
	C	104,66	92,05	87,95		
1	A	102,98	81,95	79,58	76,41	3,94
	B	100,77	78,25	77,65		
	C	98,91	71,22	72,00		
2	A	106,14	59,57	56,12	57,82	1,52
	B	104,26	61,58	59,06		
	C	102,55	59,76	58,27		
3	A	103,78	45,88	44,21	46,79	2,52
	B	101,98	50,22	49,24		
	C	109,00	51,15	46,93		
6	A	105,12	36,20	34,44	33,62	0,87
	B	102,94	33,67	32,71		
	C	104,78	35,34	33,73		

Vysvetlivky:  $m_0$ : počiatková hmotnosť,  $m_t$ : hmotnosť in situ filmu v čase  $t$

### 3.2 Tokové vlastnosti

Tabuľka 9 Parametre hodnotiace tokové vlastnosti FFS 2 (90 % PLGA/A + 10 % MS) a FFS 4 (80% PLGA/A + 20 % MS)

10 % MS			20 % MS		
$D$ (s <sup>-1</sup> )	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (mP·s)	$D$ (s <sup>-1</sup> )	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (mP·s)
0.01	158	16490	0.01	7.98	798.00
0.05	836	16690	0.05	39.73	779.02
0.10	1653	16530	0.10	78.52	785.20
0.20	3272	16410	0.20	156.4	785.93
0.50	8098	16070	0.50	388.9	776.25
0.63	10120	15940	0.63	487.7	772.90
0.79	12650	15940	0.79	613.2	772.29
1.00	15800	15820	1.00	768.6	768.60
1.26	19670	15610	1.26	962.9	764.81
1.59	24510	15440	1.59	1205	760.25
1.99	30470	15290	2.00	1507	755.39
2.51	37350	14890	2.51	1885	750.40
3.16	45070	14270	3.16	2351	743.52
3.98	53400	13430	3.98	2927	735.24
5.01	62250	12430	5.01	3643	726.86
6.31	72030	11410	6.31	4522	716.64
7.94	85070	10720	7.94	5621	707.58
9.49	95490	10060	10.00	6954	695.40

Vysvetlivky:  $D$ : rýchlostný spád,  $\tau$ : posuvné napätie,  $\eta$ : dynamická viskozita,

### 3.3 Adhézne vlastnosti

Tabuľka 10 Parametre hodnotiace adhézne vlastnosti PLGA/A filmu in situ

Meranie	$F_{\max}$ (N)	$F_{\max}/\pi r^2$ (mN/mm <sup>2</sup> )	$t$ (s)	AUC (N/s)
1.	8,110	25,800	0,50	1,216
2.	7,650	24,360	0,52	1,470
3.	8,020	25,540	0,53	1,602
Priemer	7,927	25,233	0,52	1,429
SD	0,244	0,767	0,02	0,196

Tabuľka 11 Parametre hodnotiace adhézne vlastnosti FFS 1 (95 % PLGA/A + 5 % SA) filmu in situ

Meranie	$F_{\max}$ (N)	$F_{\max}/\pi r^2$ (mN/mm <sup>2</sup> )	$t$ (s)	AUC (N/s)
1.	9,250	29,46	0,50	2,316
2.	8,426	26,85	0,52	1,890
3.	8,994	28,63	0,53	2,208
Priemer	8,890	28,31	0,52	2,138
SD	0,422	1,33	0,02	0,221

Tabuľka 12 Parametre hodnotiace adhézne vlastnosti FFS 2 (90 % PLGA/A + 10 % MS) filmu in situ

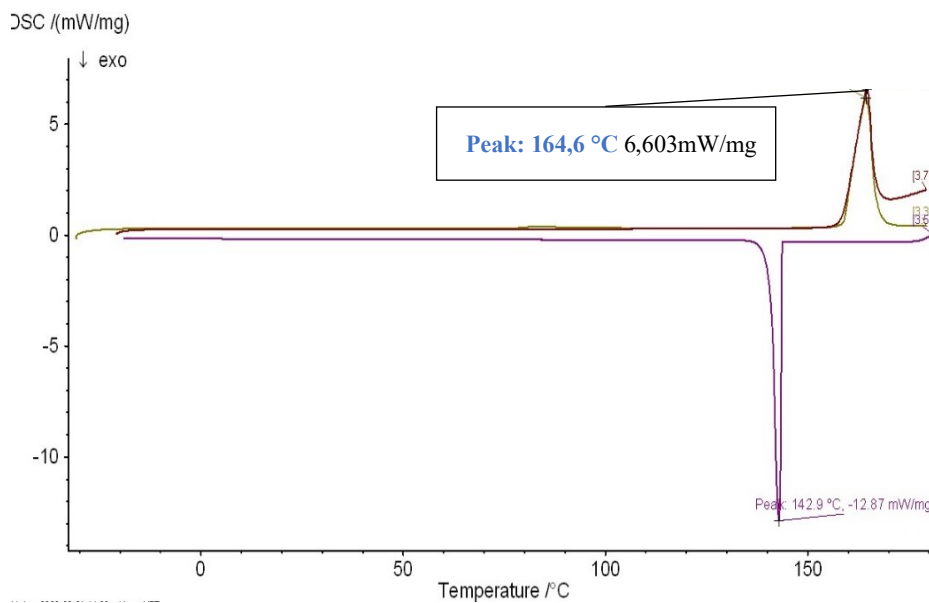
Meranie	$F_{\max}$ (N)	$F_{\max}/\pi r^2$ (mN/mm <sup>2</sup> )	$t$ (s)	AUC (N/s)
1.	9,267	29,52	0,49	2,002
2.	10,430	33,22	0,55	2,414
3.	11,130	35,44	0,09	2,594
Priemer	10,276	32,73	0,52	2,337
SD	0,941	2,99	0,04	0,303

Tabuľka 13 Parametre hodnotiace adhézne vlastnosti FFS 3 (85 % PLGA/A + 10 % MS + 5 % SA) filmu in situ

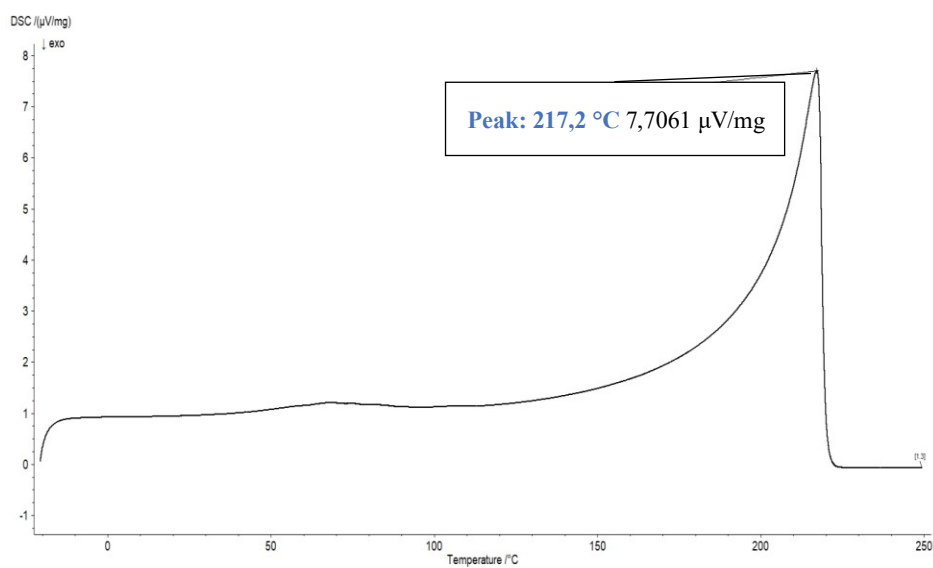
Meranie	$F_{\max}$ (N)	$F_{\max}/\pi r^2$ (mN/mm <sup>2</sup> )	$t$ (s)	AUC (N/s)
1.	12,330	39,27	0,5367	3,011
2.	12,664	40,32	0,5421	2,043
3.	12,930	41,18	0,5631	3,382
Priemer	12,641	40,26	0,5473	2,812
SD	0,301	0,9566	0,0139	0,691

Vysvetlivky:  $F_{\max}$ : sila potrebná na odtrhnutie,  $F_{\max}/\pi r^2$ : prepočet sily na plochu kruhovej geometrie,  $t$ : čas poklesu sily o 90%, AUC: plocha pod krivkou v závislosti sily na čase

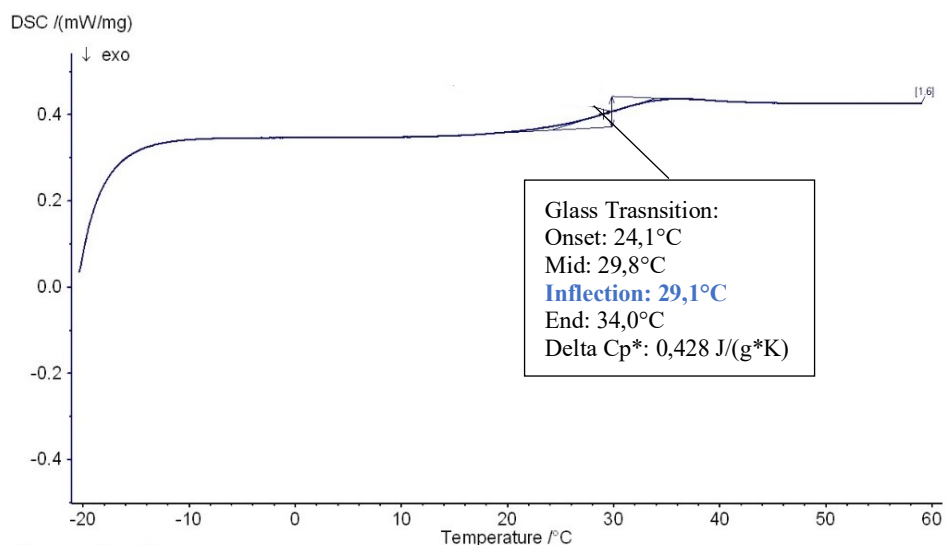
### 3.4 DSC



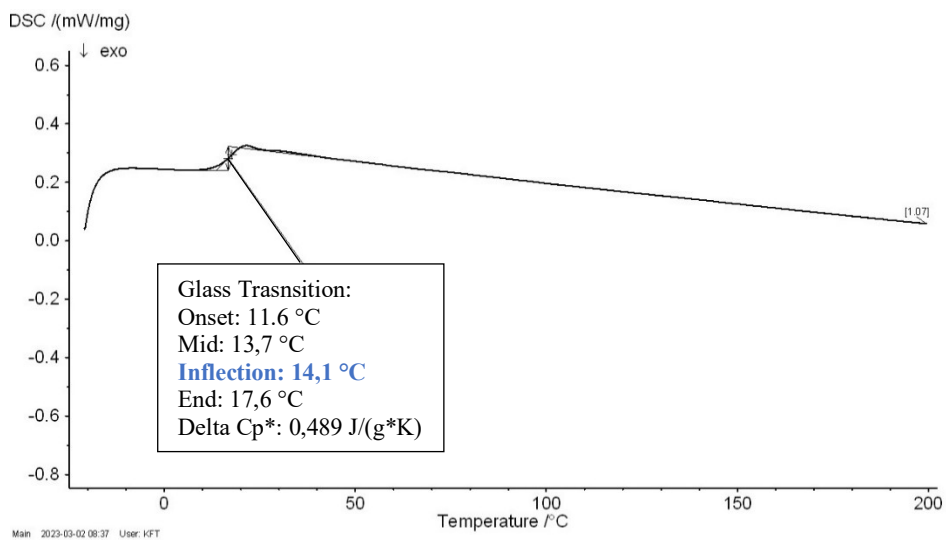
Obrázok 13 Príklad DSC záznamu kyseliny salicylovej



Obrázok 14 Príklad DSC záznamu metylsalicylátu



*Obrázok 15 Příklad DSC záznamu polyméru PLGA/A*



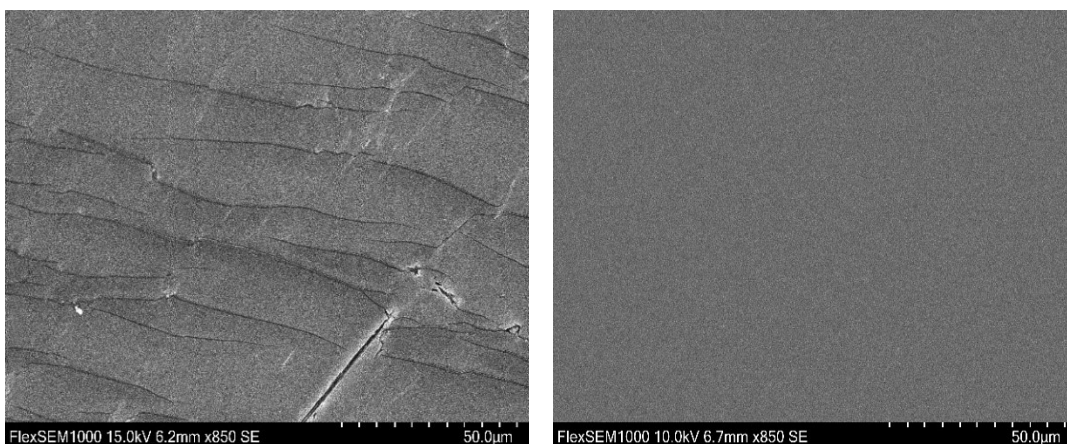
*Obrázok 16 Příklad DSC záznamu PLGA/A filmu s 5 % SA a 10 % MS*

*Tabuľka 14 Hodnoty teplôt skleneného prechodu  $T_g$*

Vzorka	$T_g$ (°C)	Priemer	SD
PLGA/A	29,1	28,7	0,5
	28,8		
	28,2		
PLGA/A + SA 5 %	24,4	25,2	0,8
	25,4		
	25,9		
PLGA/A + MS 10 %	22,8	22,2	0,6
	22,1		
	21,6		
PLGA/A + SA 5 % + MS 10 %	14,5	14,2	0,3
	14,1		
	13,9		

*Vysvetlivky: SA: kyselina salicylová, MS: metylsalicylát, PLGA/A: kyselina poly(mliečna-ko-glykolová) vetvená na kyseline polyakrylovej v 4 % zmesi*

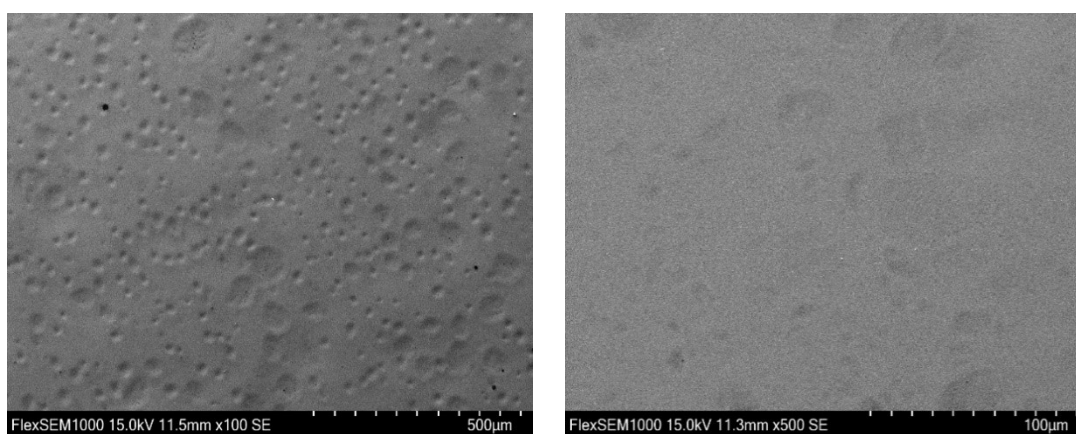
### 3.5 SEM



*a) neplastifikovaný*

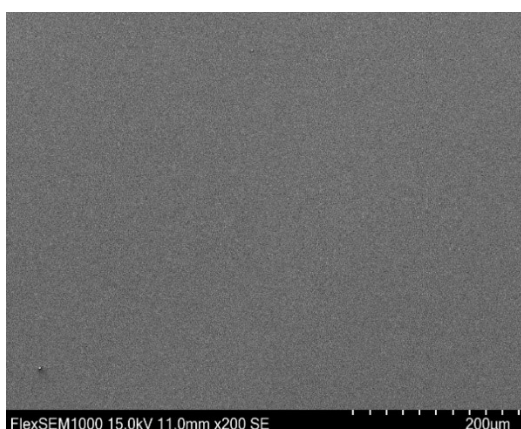
*b) plastifikovaný 10 % MS*

*Obrázok 17. SEM snímky PLGA/A filmu s obsahom 5 % kyseliny salicylovej*



*a) pomer (PLGA/A, SA, MS) a acetónu 1:1*

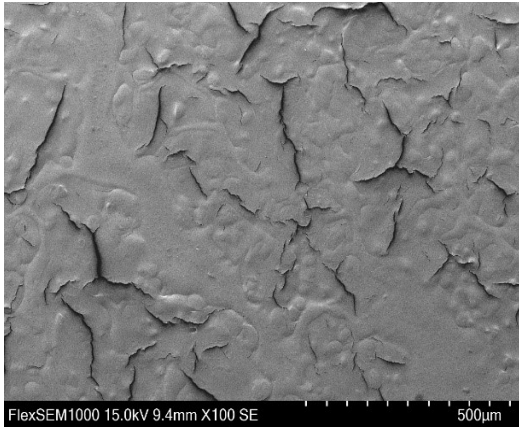
*b) pomer (PLGA/A, SA, MS) a acetónu 1:2*



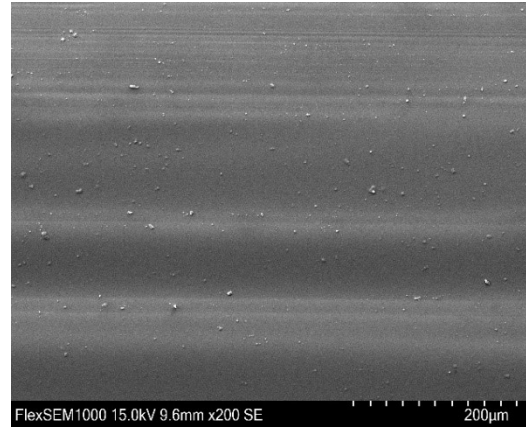
*c) pomer (PLGA/A, SA, MS) a acetónu 1:4*

*Obrázok 18 SEM snímky PLGA/A filmov s 10 % metylsalicylátu a 5 % kyseliny salicylovej – vplyv použitého množstva organického rozpúšťadla*

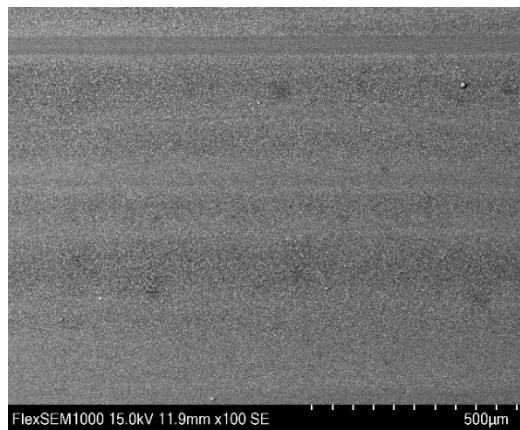




*a) Akutol*



*b) Urgo Filmogel*



*c) Lamisil Once*

*Obrázok 19 SEM snímky komerčných filmov*

### 3.6 Disolúcia

Tabuľka 15 Množstvo uvoľnenej SA z in situ filmu z FFS 2 (90% PLGA/A + 10% MS)

Čas (h)	A	Zr.	$c_{SA}$ (mg/ml)	SA (mg)	Priemer (%)	Kum %	SD
	0,2919	10	0,11	1,06			
3	0,2920	10	0,11	1,07	3,99	3,99	0,31
	0,3341	10	0,12	1,23			
	0,4915	10	0,18	1,85			
9	0,5082	10	0,19	1,91	6,81	10,80	0,16
	0,5247	10	0,20	1,98			
	0,3393	20	0,25	2,50			
24	0,3310	20	0,24	2,44	8,86	19,66	0,20
	0,3416	20	0,25	2,52			
	0,6893	10	0,26	2,62			
48	0,6698	10	0,25	2,55	9,35	29,01	0,28
	0,7103	10	0,27	2,71			
	0,5527	10	0,21	2,09			
72	0,5197	10	0,20	1,96	6,78	35,79	0,85
	0,4431	10	0,17	1,66			
	0,5174	10	0,19	1,95			
144	0,4648	10	0,17	1,74	6,36	42,15	0,61
	0,4430	10	0,17	1,66			

Vysvetlivky: A: absorbanca,  $c_{SA}$ : koncentrácia kyseliny salicylovej, SA: množstvo kyseliny salicylovej, Zr. : zriedenie, SD: smerodajná odchýlka

Tabuľka 16 Množstvo uvoľnenej SA z in situ filmu z FFS 1 (95% PLGA/A + 5% SA)

Čas (h)	A	Zr.	$c_{SA}$ (mg/ml)	SA (mg)	Priemer (%)	Kum %	SD
	0,4707	10,0	0,18	1,77			
3	0,4557	10,0	0,17	1,71	11,47	11,47	0,71
	0,4426	10,0	0,17	1,66			
	0,4325	10,0	0,16	1,62			
9	0,4456	10,0	0,17	1,67	11,05	22,52	0,16
	0,4433	10,0	0,17	1,66			
	0,2651	20,0	0,19	1,92			
24	0,2698	20,0	0,20	1,96	13,14	35,67	0,21
	0,2761	20,0	0,20	2,01			
	0,4789	10,0	0,18	1,80			
48	0,4665	10,0	0,17	1,75	11,93	47,60	0,50
	0,4762	10,0	0,18	1,79			
	0,4189	10,0	0,16	1,56			
72	0,3343	10,0	0,12	1,23	9,98	57,09	1,61
	0,4454	10,0	0,17	1,67			
	0,3614	10,0	0,13	1,34			
144	0,3162	10,0	0,12	1,16	8,61	65,56	0,85
	0,3651	10,0	0,14	1,35			

Vysvetlivky: A: absorbanca,  $c_{SA}$ : koncentrácia kyseliny salicylovej, SA: množstvo kyseliny salicylovej, Zr. : zriedenie, SD: smerodajná odchýlka

Tabuľka 17 Množstvo uvoľnenej kyseliny salicylovej z in situ filmu z FFS 3 (85% PLGA/A + 10% MS + 5% SA)

Čas (h)	A	Zr.	$c_{SA}$ (mg/ml)	SA (mg)	Priemer (%)	Kum %	SD
	0,3356	23	0,28	2,82			
3	0,2333	23	0,19	1,90	5,41	5,41	0,95
	0,2781	23	0,23	2,30			
	0,7128	10	0,27	2,72			
9	0,6855	10	0,26	2,61	6,36	11,77	0,31
	0,7656	10	0,29	2,92			
	0,5288	20	0,40	3,99			
24	0,4784	20	0,36	3,59	8,88	20,65	0,31
	0,5223	20	0,39	3,94			
	0,6248	20	0,47	4,74			
48	0,5570	20	0,42	4,21	10,02	30,68	0,74
	0,5363	20	0,40	4,05			
	0,5080	20	0,38	3,82			
72	0,4816	20	0,36	3,62	8,23	38,90	0,72
	0,4310	20	0,32	3,22			
	0,7972	10	0,30	3,05			
144	0,7626	10	0,29	2,91	6,58	45,49	0,58
	0,6762	10	0,26	2,57			

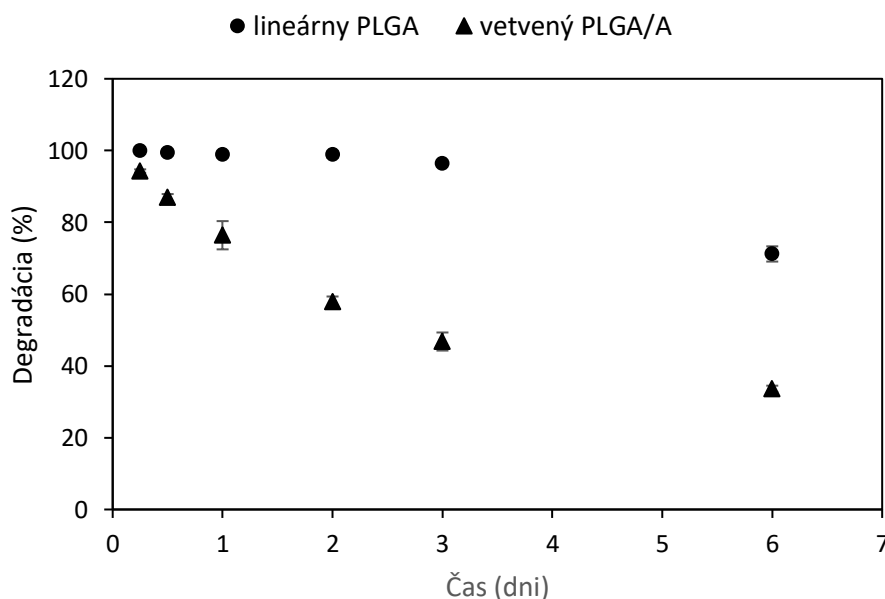
Vysvetlivky: A: absorbanca,  $c_{SA}$ : koncentrácia kyseliny salicylovej, SA: množstvo kyseliny salicylovej, Zr. : zriedenie, SD: smerodajná odchýlka

## 4 DISKUSIA

### 4.1 Degradácia PLGA

Experimentom bola sledovaná degradácia dvoch derivátov PLGA rôznej architektúry polymérneho reťazca, a to lineárneho a vetveného na kyseline polyakrylovej PLGA/A, v prostredí fosforečnanového pufru pH 5,5 po dobu 6 dní. Degradácia PLGA prebieha v dôsledku hydrolyzy esterových väzieb [94,101].

Ako možno vidieť na grafe (Obrázok 20), pri lineárnom polyméri možno počas prvých troch dní pozorovať približne iba 4% úbytok na hmotnosti. Následne sa degradácia značne urýchlila. Pri ukončení testovania po dobe 6 dní celkovo degradovalo okolo 32 % PLGA. Vetvený polymér PLGA/A, na rozdiel od lineárneho polyméru, vykazuje úbytok hmotnosti filmu 24 % už po prvých 24 hodinách testu. Až následne sa degradácia spomalila, pričom úbytok za deň už nepresiahol viac ako 10 % hmotnosti filmu. Za 6 dní sa celkovo degradovalo okolo 66 % vetveného polyméru PLGA/A.



Obrázok 20 Priebeh degradácie lineárneho a vetveného PLGA

Experimentálne bol potvrdený predpoklad, že vetvený polymér degraduje rýchlejšie v dôsledku zníženej hydrofobicity vďaka znásobeniu prítomných voľných karboxylových skupín [98], a to i napriek jeho vyššej molárnej hmotnosti v porovnaní s lineárnym PLGA (Tabuľka 5). Bola potvrdená skutočnosť, že rýchlosť degradácie je

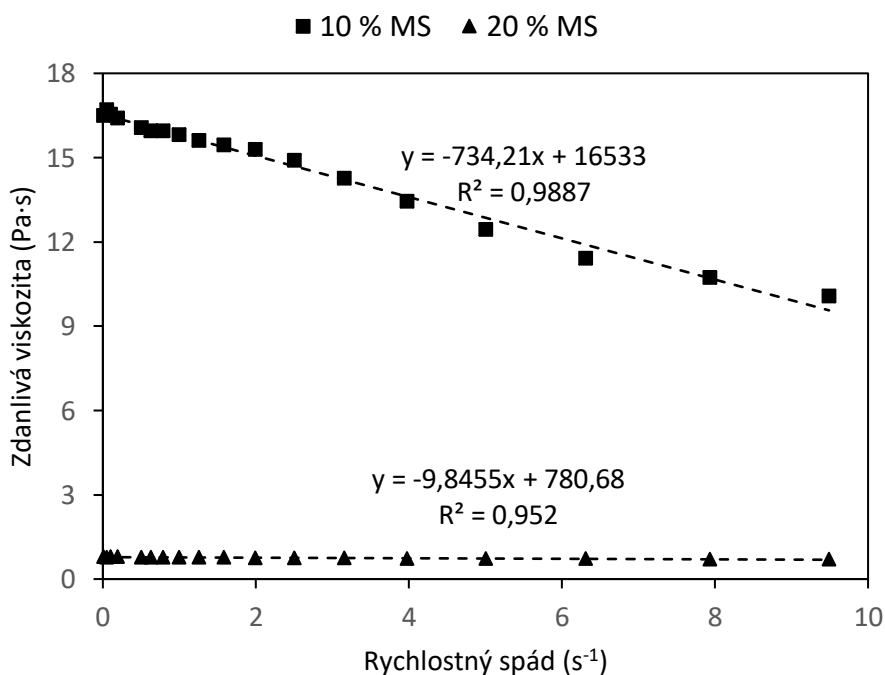
závislá prioritne na štruktúre polyméru. I napriek zistenému *lag time* pri degradácii, možno lineárny PLGA derivát použiť ako nosič liečiva, pretože počiatočná fáza liberácie by bola možná mechanizmom difúzie z povrchu filmu.

Ako východiskový polymérny základ FFS a ich filmov *in situ* bol pre ďalšie experimenty zvolený polymér PLGA/A.

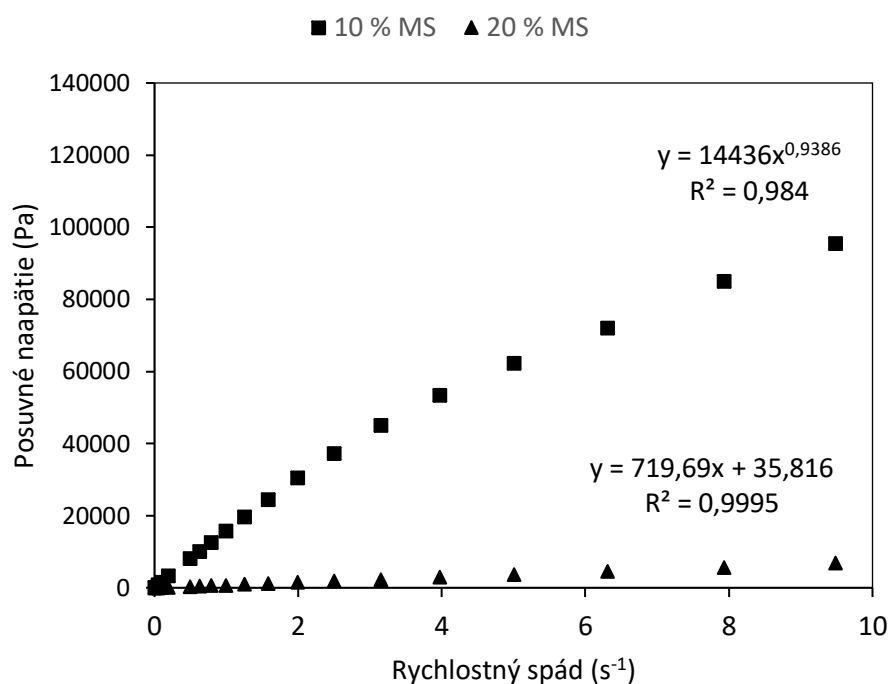
## 4.2 Tokové vlastnosti

Boli testované tokové vlastnosti vetveného PLGA/A, plastifikovaného 10 % alebo 20 % MS. Meraná bola viskozita pri zvyšujúcom sa rýchlostnom spáde v rozsahu 0,01 až 10 s<sup>-1</sup>. Ide o relatívne nízke hodnoty reflektujúce mierne namáhanie filmu v mieste aplikácie. Ako bolo očakávané, koncentrácia MS mala výrazný vplyv na tokové vlastnosti.

Prvý graf (Obrázok 21) prezentuje priebeh viskozitných kriviek, ktoré vyjadrujú závislosť viskozity na rýchlostnom spáde. Druhý graf (Obrázok 22) ukazuje namerané bodové hodnoty tokových kriviek, kde krivku 10 % MS možno popísať mocninným matematickým modelom a krivku 20 % MS Newtonovým modelom. Vhodnosť výberu modelov potvrdzujú vysoké hodnoty koeficientov korelácie.



Obrázok 21 Viskozitné krivky polyméru PLGA/A plastifikovaného 10 % a 20 % MS



Obrázok 22 Bodové tokové krivky polyméru PLGA/A plastifikovaného 10 % MS a 20 % MS

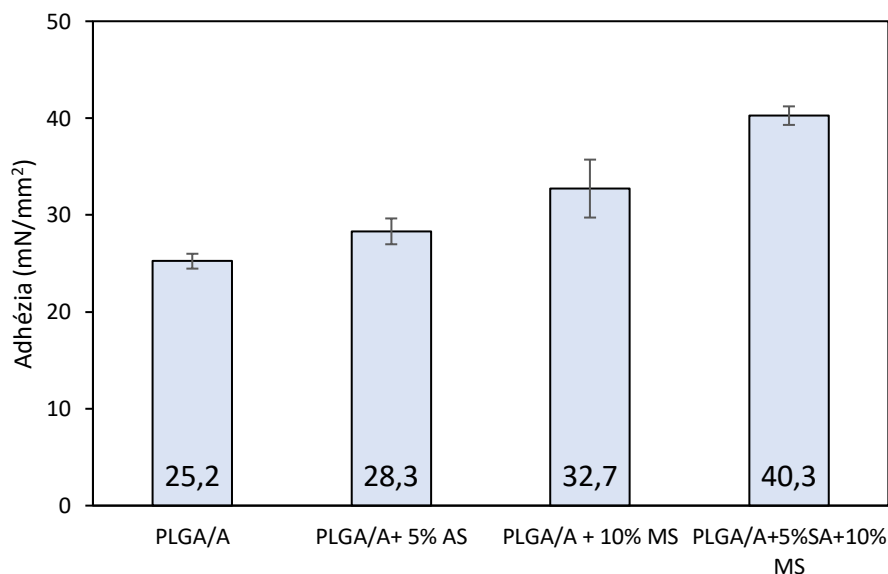
Vo vzorke PLGA/A plastifikovanej 10 % MS viskozita klesá s rastúcim rýchlostným spádom, čo je charakteristické pre nenewtonovské kvapaliny. Pokles viskozity avšak nie je z reologického hľadiska významný, pretože index tokového správania ( $n = 0,984$ ) sa približuje k hodnote jedna, ktorá charakterizuje newtonské sústavy s konštantnou viskozitou. Je možné konštatovať, že polymér PLGA/A plastifikovaný 10 % MS je newtonská kapalina. Koeficient konzistencie  $K$ , číselne rovný viskozite pri rýchlostnom spáde  $1 \text{ s}^{-1}$ , je  $14,4 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ .

Pri použití 20 % MS je hodnota  $K$  iba  $0,77 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ , a teda 20-krát nižšia, pokles viskozity je minimálny. Takto nízka viskozita môže mať nepriaznivý dopad na adhézne vlastnosti filmu a rovnako aj na kinetiku uvoľňovania liečiva [145]. Výsledným zistením je, že formulácie s obsahom 20 % MS nespĺňujú potrebné požiadavky pre nami vyvíjanú liekovú formu a pri ďalšom testovaní sa bude pokračovať už iba s formuláciami plastifikovanými 10 % MS.

### 4.3 Adhézne vlastnosti

Podrobenie filmov *in situ* adhézny testom vyplýva zo skutočnosti, že ide o potencionálnu topickú liekovú formu s predĺženým uvoľňovaním. Úlohou filmu je prílnúť v mieste aplikácie a zabezpečiť dodávanie liečiva pre účinnú terapiu. V súčasnosti existuje mnoho variant testov *in vitro* pre charakterizáciu bioadhézie filmov [139,140]. Nami bola zvolená metóda *pull away* testu, pri ktorej adhéziu možno charakterizovať ako silu potrebnú na odtrhnutie filmu od podkladu alebo z miesta aplikácie.

K premenným s významným vplyvom na výslednú adhéziu patria: čas kontaktu, konsolidačná sila a rýchlosť odtrhnutia vzorky od podkladu, ktoré boli verifikované. Testom boli namerané údaje popisných parametrov: maximálna sila pre odtrhnutie, čas potrebný k poklesu maximálnej sily o 90 % a plocha pod krivkou časového priebehu sily (Obrázok 7).



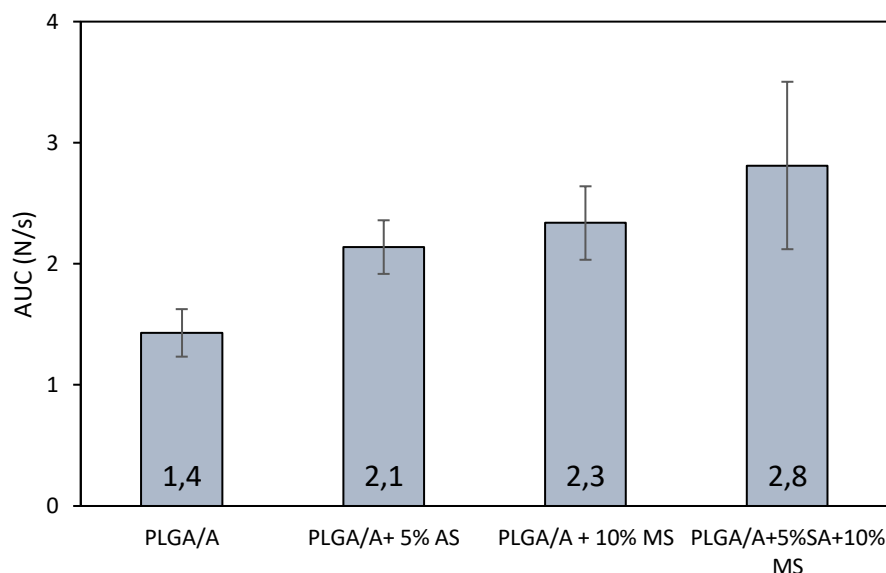
Obrázok 23 Adhézna sila vztiahnutá na kontaktnú plochu

Maximálna sila potrebná pre odtrhnutie bola vztiahnutá na kontaktnú plochu a vyjadrená v mN/mm<sup>2</sup>. Takto je možné porovnávať výsledky ťahových testov realizovaných na reometroch pri použití horných geometrií rôzneho priemeru (napr. PU 20 vs. PU 40). Ako možno vidieť na grafe (Obrázok 23) najnižšia hodnota adhézne sily bola nameraná u neplastifikovaného PLGA/A. Inkorporáciou 5 % SA nedošlo k významnej zmene, ale s prídavkom 10 % MS sa adhézia významne zvýšila.



Jav môže byť vysvetlený, podľa teórie voľného objemu [154], rozvoľnením polymérnych reťazcov, čo zároveň vplýva i na pokles hodnoty  $T_g$  a pokles viskozity. Ich dôsledkom je zvýšená schopnosť rozprestrieť sa na podklade. Tieto výsledky potvrdzujú, že MS i SA sú schopné ovplyvniť adhezivitu filmu. Kombinácia týchto látok je schopná zvýšiť adhéziu silu filmu dvojnásobne v porovnaní s neplastifikovaným polymérnym filmom.

Pre integritu *in situ* filmu a adhéziu v mieste aplikácie je dôležitý pomer adhézných/kohéznych síl. Ten možno kvantifikovať plochou pod krivkou záznamu priebehu adhézneho ťahového testu (AUC N/s). Totiž, pokiaľ majú filmy rovnakú hodnotu maximálnej sily ale rozdielnu hodnotu AUC, líšia sa práve kohéznosťou.



Obrázok 24 Porovnanie plochy pod krivkou v závislosti sila/čas

Ako možno pozorovať na grafe (Obrázok 24) hodnoty AUC neplastifikovaného filmu sú nižšie ako filmu s obsahom salicylátov, čo odráža nižšiu schopnosť súdržnosti pri namáhaní. Pri porovnaní filmov s obsahom aspoň jednej salicylovej zložky boli hodnoty AUC bez väčšieho významného rozdielu.

Doba poklesu maximálnej sily o 90% je mierou eliminácie adhézných a kohéznych síl. Namerané hodnoty pre jednotlivé testované filmy sú prakticky zhodné (Tabuľka 10 až Tabuľka 13), preto tento parameter nie je pre charakterizáciu *in situ* PLGA filmov významný.

## 4.4 DSC

Bola vykonaná termická analýza polyesteru vetveného na kyseline poly(akrylovej) (PLGA/A), kyseliny salicylovej, metylsalicylátu a PLGA/A filmov *in situ* len s 5% SA, a len s 10 % MS a *in situ* filmov s obsahom 5 % SA a 10 % MS. Cieľom bolo zistiť teplotu skelného prechodu PLGA/A, teplotu topenia SA, plastifikačný resp. antiplastifikačný účinok MS a SA a disperzní charakter *in situ* filmov.

Bol zistený endotermný pík teploty topenia kryštalickej kyseliny salicylovej pri teplote 164,5 °C. Pík teploty evaporácie metylsalicylátu bol zaznamenaný pri teplote 217,2 °C (Obrázok 25). Kyselina salicylová, v porovnaní s hodnotami uvedenými v liekopise (158 – 161 °C), vykazuje mierne vyššiu teplotu topenia [41]. U metylsalicylátu bola experimentálne zistená teplota evaporácie nižšia ako popisuje odborná literatúra (220 – 224 °C) [42]. Tieto mierne odchýlky v teplotách mohli byť spôsobené nečistotami.

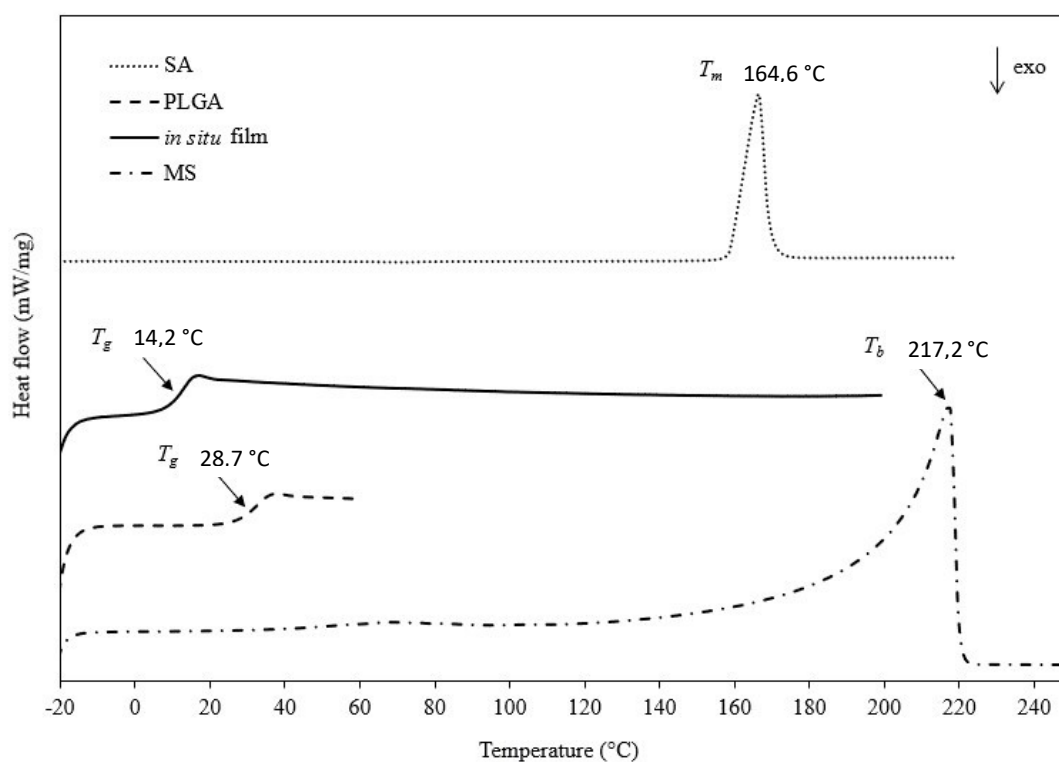
PLGA/A je amorfný polymér, ktorého teplota skelného prechodu ( $T_g$ ), stanovená z polohy inflexného bodu na krivke druhého ohrevu, je  $28,7 \pm 0,5$  °C (Obrázok 25). Táto teplota je porovnateľná s povrchovou teplotou kože (približne 32°C), čo vo výsledku vyhovuje nárokom na zabezpečenie správneho kontaktu medzi kožou a filmom. Keďže charakteristickou vlastnosťou samotného polyméru PLGA/A je krehkosť, bolo potrebné tuto nevýhodu eliminovať plastifikáciou. Na základe predošlých realizovaných experimentov [112], bol zvolený ako plastifikátor metylsalicylát, ktorý okrem toho plní funkciu prekursoru terapeuticky aktívnej kyseliny salicylovej [155].

Okrem faktu, že koncentrácia plastifikátoru ovplyvňuje skelný prechod PLGA/A, ovplyvňuje taktiež reologické, adhezívne a liberačné charakteristiky filmov [156,157]. Napríklad nedostatočná plastifikácia môže spôsobiť nízku elasticitu a adhéziu filmu v mieste aplikácie, nadmerná plastifikácia zase nežiadajú lepivosť filmu, stekanie filmu z miesta aplikácie a rýchlejšiu liberáciu liečiva. Hodnota  $T_g$  *in situ* filmu by mala byť v rozmedzí -5 °C až +30 °C [157]. Avšak, ak je hodnota  $T_g$  nižšia o viac ako 25 °C než je teplota pokožky, môže viesť k trvalej lepivosti filmu [158].

Pokles  $T_g$  bolo možné pozorovať pri všetkých navrhnutých formuláciách filmu s obsahom kyseliny salicylovej a/alebo metylsalicylátu (Tabuľka 14). Z toho môžeme vyvodit', že nielen metylsalicylát, ale tiež štruktúrne príbuzná kyselina salicylová

pôsobí ako plastifikátor. Obe tieto látky, zastúpené samostatne vo filme, boli schopné znížiť teplotu topenia približne o 3,5 až 6,5 °C. Pri ich spoločnom výskyte vo filme, čiže film s obsahom 5 % SA a 10 % MS, bolo možné pozorovať synergický účinok na teplotu skelného prechodu, pri ktorom bolo dosiahnuté zníženie hodnoty na  $14,2 \pm 0,5$  °C (Obrázok 25).

Okrem toho DSC sken tohto filmu ukazuje (Obrázok 16), že SA je vo filme molekulárne dispergovaná, rozpustená, a MS je s polymérom dokonale miesiteľný, nakoľko v grafe nie je viditeľný žiaden pík kryštalickej fázy, ani druhý skelný prechod. Dobrá miesiteľnosť MS s polymérom a rozpustnosť SA v polyméri bez rekryštalizácie zaisťujú, že *in situ* filmy sú transparentné.



Obrázok 25 DSC krivky polyméru PLGA/A, SA, filmu PLGA s 5 % SA a 10 % a MS

## 4.5 SEM

Povrch *in situ* PLGA filmov so salicylátmi boli charakterizované SEM. Pre zaujímavosť a porovnanie boli zhotovené aj snímky komerčných prípravkov.

Prvá séria snímok (Obrázok 17) porovnáva povrch neplastifikovaného a plastifikovaného PLGA/A filmu s 5% SA. DSC síce preukázala klasifikačný účinok SA, tento efekt však nie je dostatočný a povrch filmu bez MS bol zreteľne popraskaný. Film plastifikovaný 10 % MS sa javil hladký, bez viditeľných prasklín alebo iných povrchových nerovností. Preto možno tento film klasifikovať ako dostatočne plastifikovaný a elastický. Ani na jednom zo snímok tejto série neboli pozorované viditeľné častice, ktoré by predstavovali nerozpustenú SA, čo koreluje s výsledkami DSC.

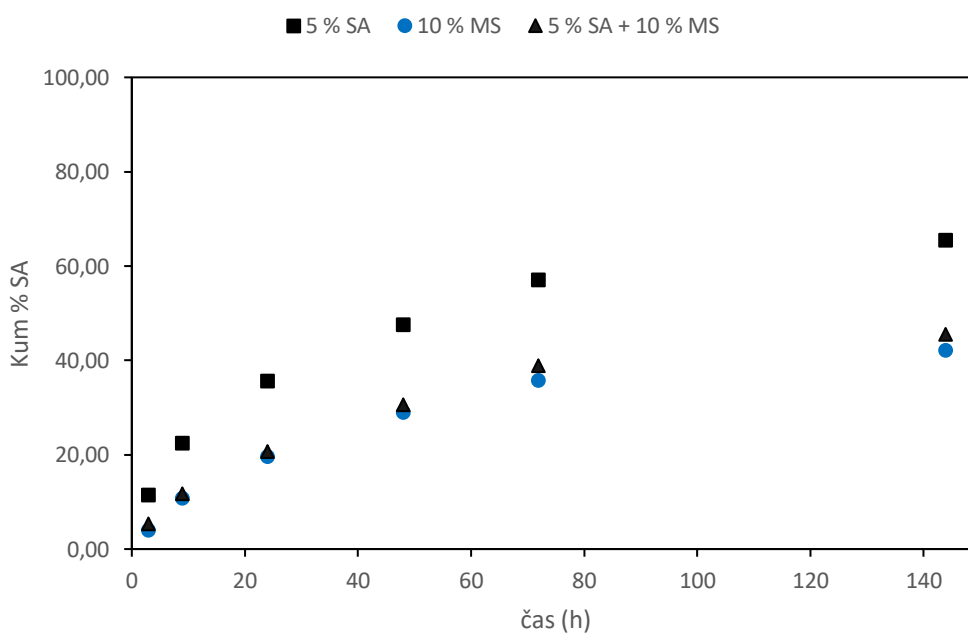
V druhej sérii snímok (Obrázok 18) boli zaznamenané filmy vytvorené z FFS s rôznym množstvom acetónu ako rozpúšťadla (1:1; 1:2; 1:4), čo ovplyvňuje tokové vlastnosti, ľahkosť aplikácie FFS roztieraním alebo sprejovaním a finálnu hrúbku filmu. U viskóznejších filmov dochádza, po evaporácii acetónu, k tvorbe kráterov na povrchu filmov. Na vzorkách filmu s vyššou viskozitou boli krátery početnejšie a výraznejšie ako na filme s nižšou viskozitou. Preto je možné konštatovať, že pre vytvorenie povrchovo homogénnejšieho filmu je vhodnejšie zvoliť vyššie množstvo rozpúšťadla, čo vo výsledku dovoľuje aplikovať FFS nasprejovaním.

Posledná séria snímok (Obrázok 19) predstavuje povrch komerčne dostupných prípravkov pro tvorbu filmu *in situ*. Boli zvolené produkty: Akutol, Urgo filmogel a Lamisil once. Ich zloženie, terapeutické využitie a spôsob aplikácie sú uvedené v kapitole 1.2 tejto práce (Tabuľka 4). Povrch filmu Akutolu na snímku vykazuje praskliny v štruktúre. Celkový vzhľad, v závislosti na hrúbke nanesej vrstvy, vytváral dojem šupín, čo vo výsledku vypovedá o jeho nízkej elasticite. Prípravky Urgo filmogel a Lamisil once vytvorili elastickejšie filmy. Pri porovnaní SEM snímok možno konštatovať, že homogenita komerčných filmov sa javí byť nižšia než homogenita filmov pripravených pre túto prácu.

## 4.6 Disolúcia

Formulované FFS založené na vetvenom PLGA derivátu pre lokálnu aplikáciu salicylátov obsahujú SA a MS. MS je prekursorom terapeuticky účinnej kyseliny salicylovej a zároveň plastifikuje krehký PLGA film. Disolučným testom bolo sledované množstvo kyseliny salicylovej uvoľnenej z PLGA/A *in situ* filmov. Konkrétne boli použité filmy s obsahom 5 % SA, filmy s obsahom 10 % MS a filmy s obsahom 5% SA a 10% MS.

Implementácia *in vitro* disolučného testu bola založená na liekopisnej metóde 2.9.4. *Skúška disolúcie náplasti 2 Metóda s extrakčnou celou* [151]. Test bol upravený s ohľadom na spôsob aplikácie FFS a podmienky v mieste aplikácie. Zvláštna pozornosť bola venovaná zaisteniu sink podmienok počas testu. Konštantná plocha pre disolúciu liečiva, ako faktor významne ovplyvňujúci priebeh uvoľňovania liečiva [152], bola zaistená vytvorením filmu *in situ* na dne vialok, takže v kontakte s disolučným médiom bola iba ich horná plocha. Výmenou celého objemu disolučného média pri odberoch vzoriek bolo zabránené dosiahnutiu nasýtenej koncentrácie liečiva v disolučnom médiu, ktoré by viedlo ku stagnácii uvoľňovania liečiva. Výsledky merania pre jednotlivé vzorky sú zosumarizované v tabuľkách (Tabuľka 15 až Tabuľka 17).



Obrázok 26 Profil disolúcie SA z *in situ* filmu obsahujúceho 5 % SA, 10 % MS, a 5 % SA s 10 % MS

Profil uvoľňovania (Obrázok 26) v počiatočnej fáze vykazoval iba nízky burst efekt po 24 hodinách. V tomto časovom intervale sa uvoľnilo približne 10 % až 20 % SA inkorporovanej vo filme. Následne sa uvoľňovanie značne spomalilo.

V profile disolúcie MS nebolo celkovou kumuláciou dosiahnutých 100 %. Analýza bola preddefinovaná na meranie obsahu SA, ktorá vzniká hydrolýzou MS pri  $\text{pH} > 7$  [51]. V priebehu degradácie PLGA vznikajú kyslé monoméry, kyselina mliečna a glykolová, čo mohlo zapríčiniť zníženie  $\text{pH}$  prostredia, a teda spomaliť hydrolýzu MS. Preto pravdepodobne nebola časť MS premenená na SA. Tento problém by *in vivo* nastať nemal, pretože v ľudskej koži k hydrolýze prispieva prítomnosť esteráz [46]. Okrem toho, ak by sme vychádzali z predpokladu, že uvoľnenie liečiva je viac závislé na degradácií polyméru ako na schopnosti difundovať z neho, je možné, že istá časť MS bola stále v štruktúre nezdegradovanej časti polyméru.

Z filmu bez obsahu MS sa za 6 dní dosiahlo uvoľnenia 65 % SA, čo nespĺňa kritéria prijateľnosti, ktoré definujú celkové uvoľnenie liečiva z LF ako 80 % z celkového obsahu [41]. SA je charakteristická zlou rozpustnosťou vo vodnom prostredí, vďaka ktorej dochádza rýchlo k tvorbe nasýteného roztoku. To by spôsobilo spomalenie uvoľňovania v dôsledku nepriaznivého koncentračného spádu, až prípadnú rekryštalizáciu v médiu, čím by došlo k ovplyvneniu výsledkov spektrofotometrického merania.

Predpokladom bolo, že formulácia s obsahom SA a MS nielenže ovplyvní rýchlosť uvoľňovania SA z polyméru, ale zvýši aj koncentráciu samotnej SA v médiu. Pri porovnaní kumulatívnych hodnôt z merania však neplastifikovaný film vykazoval rýchlejšie uvoľňovanie SA do média ako film plastifikovaný. Nedá sa nevšimnúť, že práve hodnoty filmov s obsahom MS, či už s liečivom alebo bez neho, majú takmer identický priebeh disolúcie. Je známe, že MS je vo vodnom roztoku schopný vytvárať zákal. Preto nebolo možné zhotoviť osobitnú kalibračnú krivku pre MS. Avšak v koncentráciách MS, v ktorých sme sa pohybovali, sa roztok javil byť číry. Preto sa predpokladalo, že spektrofotometrická metóda bude vhodným analytickým nástrojom pre túto disolúciu. Tento predpoklad sa ale nenaplnil. Ukázalo sa, že pre kvantifikáciu množstva uvoľnenej SA by bolo vhodnejšie využiť inú analytickú metódu, ktorá by nebola obmedzovaná nerozpustnosťou SA a tvorbou zákalu MS pri detegovaní. Disolučné testy by bolo vhodné zopakovať za použitia napríklad HPLC analýzy, ktorá

by dovoľovala, okrem základného stanovenia koncentrácie SA, aj stanovenie presného množstva MS, čím by bolo možné vyhodnotiť rýchlosť hydrolýzy MS v médiu.

## 5 ZÁVER

Z výsledkov diplomovej práce, je možné zosumarizovať nasledujúce závery:

- Boli formulované FFS na báze vetveného PLGA, obsahujúce kyselinu salicylovú a metylsalicylát vo funkcii proliečiva a plastifikátora.
- Aplikáciou FFS na povrch dôjde k evaporácii organického rozpúšťadla a tvorbe tenkého filmu.
- Na základe výsledkov z degradácie bol pre formuláciu FFS v tejto práci uprednostnený vetvený polymér PLGA/A.
- Vyššiu viskozitu vykazovali formulácie s obsahom 10 % MS, preto boli v tejto práci uprednostnené.
- Kryštalická SA je v PLGA/A filme molekulárne dispergovaná, a tým dochádza k jej solubilizácii.
- MS bol účinný plastifikátor, plastifikačný účinok preukázala aj SA.
- Kombináciou SA a MS vo filme došlo k synergickému účinku na pokles teploty skelného prechodu a na zvýšenie adhéznej sily.
- SEM zobrazenie potvrdilo nutnosť plastifikácie PLGA/A. Zvýšením pomeru rozpúšťadla voči neprchavej zložke v FFS sa vizuálne zlepšila homogenita *in situ* filmu.
- Disolúcia preukázala schopnosť liberácie SA z PLGA/A, a schopnosť liberácie MS z PLGA/A s hydrolyzou na SA. Bol zaznamenaný nízky počiatkový burst efekt, po ktorom nasledovalo predĺžené uvoľňovanie počas šiestich dní ovplyvnené koncentráciou SA a MS.



## 6 LITERATÚRA

1. Eric R. Kandel; James H. Schwartz; Thomas M. Jessell; Steven A. Siegelbaum; A. J. Hudspeth Pain. In *Principles of Neural Science*; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2014; pp. 472–479 ISBN 978-0-07-139011-8.
2. Vos, T.; Flaxman, A.D.; Naghavi, M.; Lozano, R.; Michaud, C.; Ezzati, M.; Shibuya, K.; Salomon, J.A.; Abdalla, S.; Aboyans, V.; et al. Years Lived with Disability (YLDs) for 1160 Sequelae of 289 Diseases and Injuries 1990-2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* **2012**, *380*, 2163–2196, doi:10.1016/S0140-6736(12)61729-2.
3. Stanos, S.P. Topical Agents for the Management of Musculoskeletal Pain. *J. Pain Symptom Manage.* **2007**, *33*, 342–355, doi:10.1016/j.jpainsymman.2006.11.005.
4. Jankyová, P.S.; Foltánová, P.T. Manažment akútnej bolesti pohybového aparátu.
5. Bergman, S. Management of Musculoskeletal Pain. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2007**, *21*, 153–166, doi:10.1016/j.berh.2006.10.001.
6. Reig, E. Tramadol in Musculoskeletal Pain – A Survey. *Clin. Rheumatol.* **2002**, *21*, S9–S12, doi:10.1007/s100670200030.
7. *Cancer Pain Relief*; World Health Organization, Ed.; World Health Organization ; WHO Publications Center USA [distributor]: Geneva : Albany, NY, 1986; ISBN 978-92-4-156100-6.
8. Galer BS. Topical Medications. In *Bonica's management of pain*; Ballantyne, J., Fishman, S., Rathmell, J.P., Eds.; Wolters Kluwer: Philadelphia, 2019; pp. 1736–1742 ISBN 978-1-4963-4903-3.
9. Bley, K.R. Recent Developments in Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 Agonist-Based Therapies. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 1445–1456, doi:10.1517/13543784.13.11.1445.
10. Vaile, J.H.; Davis, P. Topical NSAIDs for Musculoskeletal Conditions. *Drugs* **1998**, *56*, 783–799, doi:10.2165/00003495-199856050-00004.
11. Yano, T.; Nakagawa, A.; Tsuji, M.; Noda, K. Skin Permeability of Various Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Man. *Life Sci.* **1986**, *39*, 1043–1050, doi:10.1016/0024-3205(86)90195-5.
12. Guy, R.H.; Hadgraft, J.; Bucks, D.A.W. Transdermal Drug Delivery and Cutaneous Metabolism. *Xenobiotica* **1987**, *17*, 325–343, doi:10.3109/00498258709043943.
13. Brown, M.B.; Martin, G.P.; Jones, S.A.; Akomeah, F.K. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Deliv.* **2006**, *13*, 175–187, doi:10.1080/10717540500455975.
14. Heyneman, C.A.; Lawless-Liday, C.; Wall, G.C. Oral versus Topical NSAIDs in Rheumatic Diseases: A Comparison. *Drugs* **2000**, *60*, 555–574, doi:10.2165/00003495-200060030-00004.
15. *Dermatological and Transdermal Formulations*; Walters, K.A., Ed.; Drugs and the pharmaceutical sciences; Dekker: New York, NY, 2002; ISBN 978-0-8247-9889-5.
16. Kornick, C.A.; Santiago-Palma, J.; Moryl, N.; Payne, R.; Obbens, E.A.M.T. Benefit-Risk Assessment of Transdermal Fentanyl for the Treatment of Chronic Pain. *Drug Saf.* **2003**, *26*, 951–973, doi:10.2165/00002018-200326130-00004.

17. Cramer, M.P.; Saks, S.R. Translating Safety, Efficacy and Compliance into Economic Value for Controlled Release Dosage Forms: *PharmacoEconomics* **1994**, *5*, 482–504, doi:10.2165/00019053-199405060-00005.
18. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*; Shah, V.P., Ed.; Plenum Press: New York, 1993; ISBN 978-0-306-44367-1.
19. Čižmáriková, M.; Takáč, P. Liekové formy a aplikačné cesty podávania liekov so zameraním na ich význam v humánnej medicíne.
20. Payne, R.; Mathias, S.D.; Pasta, D.J.; Wanke, L.A.; Williams, R.; Mahmoud, R. Quality of Life and Cancer Pain: Satisfaction and Side Effects with Transdermal Fentanyl versus Oral Morphine. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1588–1593, doi:10.1200/JCO.1998.16.4.1588.
21. Southwell, D.; Barry, B.W.; Woodford, R. Variations in Permeability of Human Skin within and between Specimens. *Int. J. Pharm.* **1984**, *18*, 299–309, doi:https://doi.org/10.1016/0378-5173(84)90145-5.
22. Larsen, R.H.; Nielsen, F.; Sørensen, J.A.; Nielsen, J.B. Dermal Penetration of Fentanyl: Inter- and Intraindividual Variations. *Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *93*, 244–248, doi:10.1046/j.1600-0773.2003.pto930508.x.
23. Steinsträsser, I.; Merkle, H.P. Dermal Metabolism of Topically Applied Drugs: Pathways and Models Reconsidered. *Pharm. Acta Helv.* **1995**, *70*, 3–24, doi:10.1016/0031-6865(94)00047-y.
24. Hogan, D.J.; Maibach, H.I. Adverse Dermatologic Reactions to Transdermal Drug Delivery Systems. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1990**, *22*, 811–814, doi:10.1016/0190-9622(90)70113-v.
25. Carmichael, A.J. Skin Sensitivity and Transdermal Drug Delivery. *Drug Saf.* **1994**, *10*, 151–159, doi:10.2165/00002018-199410020-00004.
26. Murphy, M.; Carmichael, A.J. Transdermal Drug Delivery Systems and Skin Sensitivity Reactions. Incidence and Management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2000**, *1*, 361–368, doi:10.2165/00128071-200001060-00004.
27. Ekinci, D.; Şentürk, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ. Salicylic Acid Derivatives: Synthesis, Features and Usage as Therapeutic Tools. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1831–1841, doi:10.1517/13543776.2011.636354.
28. Cross, S.E.; Anderson, C.; Thompson, M.J.; Roberts, M.S. Is There Tissue Penetration after Application of Topical Salicylate Formulations? *The Lancet* **1997**, *350*, 636, doi:10.1016/S0140-6736(05)63324-7.
29. Megwa, S.A.; Benson, H.A.; Roberts, M.S. Percutaneous Absorption of Salicylates from Some Commercially Available Topical Products Containing Methyl Salicylate or Salicylate Salts in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47*, 891–896, doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb03266.x.
30. Lévesque, H.; Lafont, O. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. *Rev. Med. Interne* **2000**, *21 Suppl 1*, 8s–17s, doi:10.1016/s0248-8663(00)88720-2.
31. Kotolová, H.; Nováková, J. Nejvýznamnější Nežádoucí Účinky Neopioidních Analgetik a Jejich Farmakologické Mechanismy. *Neurol. Praxi* **2021**, *21*, 485–490, doi:10.36290/neu.2020.108.
32. Ivey, K.J. Gastrointestinal Effects of Antipyretic Analgesics. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 53–64, doi:10.1016/0002-9343(83)90233-4.
33. Clissold, S.P. Aspirin and Related Derivatives of Salicylic Acid. *Drugs* **1986**, *32*, 8–26, doi:10.2165/00003495-198600324-00003.

34. Pharmacotherapy for Soft Tissue Injury. In *Sport and Exercise Medicine for Pharmacists*; Pharmaceutical Press, 2006; pp. 143–168 ISBN 978-0-85369-600-1.
35. Lebwohl, M. The Role of Salicylic Acid in the Treatment of Psoriasis. *Int. J. Dermatol.* **1999**, *38*, 16–24, doi:10.1046/j.1365-4362.1999.00500.x.
36. Lazo, N.D.; Meine, J.G.; Downing, D.T. Lipids Are Covalently Attached to Rigid Corneocyte Protein Envelopes Existing Predominantly as Beta-Sheets: A Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Study. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105*, 296–300, doi:10.1111/1523-1747.ep12318985.
37. Marczyk, B.; Mucha, P.; Budzisz, E.; Rotsztejn, H. Comparative Study of the Effect of 50% Pyruvic and 30% Salicylic Peels on the Skin Lipid Film in Patients with Acne Vulgaris. *J. Cosmet. Dermatol.* **2014**, *13*, 15–21, doi:10.1111/jocd.12050.
38. Rabinowitz, J.L.; Feldman, E.S.; Weinberger, A.; Schumacher, H.R. Comparative Tissue Absorption of Oral <sup>14</sup>C-Aspirin and Topical Triethanolamine <sup>14</sup>C-Salicylate in Human and Canine Knee Joints. *J. Clin. Pharmacol.* **1982**, *22*, 42–48, doi:10.1002/j.1552-4604.1982.tb05706.x.
39. Cross, S.E.; Anderson, C.; Roberts, M.S. Topical Penetration of Commercial Salicylate Esters and Salts Using Human Isolated Skin and Clinical Microdialysis Studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *46*, 29–35, doi:10.1046/j.1365-2125.1998.00045.x.
40. Hadgraft, J. Skin Deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 291–299, doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.002.
41. ČR, M. zdravotnictví *Český lékopis 2023: Tištěná verze (1.-4. díl)*; Grada Publishing a.s., 2023; ISBN 978-80-271-5059-5.
42. PubChem Methyl Salicylate Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4133> (accessed on 28 February 2024).
43. PubChem Salicylic Acid Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338> (accessed on 28 February 2024).
44. Parker, D.; Martinez, C.; Stanley, C.; Simmons, J.; McIntyre, I.M. The Analysis of Methyl Salicylate and Salicylic Acid from Chinese Herbal Medicine Ingestion. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 214–216, doi:10.1093/jat/28.3.214.
45. Boullard, O.; Leblanc, H.; Besson, B. Salicylic Acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2000 ISBN 978-3-527-30673-2.
46. Anderson, A.; McConville, A.; Fanthorpe, L.; Davis, J. Salicylate Poisoning Potential of Topical Pain Relief Agents: From Age Old Remedies to Engineered Smart Patches. *Medicines* **2017**, *4*, 48, doi:10.3390/medicines4030048.
47. Martin, D.; Valdez, J.; Boren, J.; Mayersohn, M. Dermal Absorption of Camphor, Menthol, and Methyl Salicylate in Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 1151–1157, doi:10.1177/0091270004268409.
48. Green, B.G.; Flammer, L.J. Methyl Salicylate as a Cutaneous Stimulus: A Psychophysical Analysis. *Somatosens. Mot. Res.* **1989**, *6*, 253–274, doi:10.3109/08990228909144676.
49. Wand-Tetley, J.I. Historical Methods of Counter-Irritation. *Rheumatology* **1956**, *3*, 90–98, doi:10.1093/rheumatology/III.3.90.

50. Braun-Falco, O.; Petzoldt, D. Zur Histotopie von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels in der Epidermis bei Psoriasis vulgaris. *Arch. Für Klin. Exp. Dermatol.* **1967**, *230*, 130–154, doi:10.1007/BF00496397.
51. Cheng, C.-Y.; Brinzari, T.V.; Hao, Z.; Wang, X.; Pan, L. Understanding Methyl Salicylate Hydrolysis in the Presence of Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 6013–6021, doi:10.1021/acs.jafc.1c00958.
52. Roberts, M.S.; Favretto, W.A.; Meyer, A.; Reckmann, M.; Wongseelashote, T. Topical Bioavailability of Methyl Salicylate. *Aust. N. Z. J. Med.* **1982**, *12*, 303–304, doi:10.1111/j.1445-5994.1982.tb02485.x.
53. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel Safety Assessment of Salicylic Acid, Butyloctyl Salicylate, Calcium Salicylate, C12-15 Alkyl Salicylate, Capryloyl Salicylic Acid, Hexyldodecyl Salicylate, Isocetyl Salicylate, Isodecyl Salicylate, Magnesium Salicylate, MEA-Salicylate, Ethylhexyl Salicylate, Potassium Salicylate, Methyl Salicylate, Myristyl Salicylate, Sodium Salicylate, TEA-Salicylate, and Tridecyl Salicylate. *Int. J. Toxicol.* **2003**, *22 Suppl 3*, 1–108.
54. Telaprolu, K.C.; Grice, J.E.; Mohammed, Y.H.; Roberts, M.S. Human Skin Drug Metabolism: Relationships between Methyl Salicylate Metabolism and Esterase Activities in IVPT Skin Membranes. *Metabolites* **2023**, *13*, 934, doi:10.3390/metabo13080934.
55. Arif, T. Salicylic Acid as a Peeling Agent: A Comprehensive Review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2015**, *8*, 455–461, doi:10.2147/CCID.S84765.
56. Gloor, M.; Beier, B. [Keratoplastic Effect of Salicylic Acid, Sulfur and a Tensio-Active Mixture]. *Z. Hautkr.* **1984**, *59*, 1657–1660.
57. Kede, M.P.V.; Guedes, L.S. Salicylic Acid Peel. In; 2017; pp. 1–6.
58. Bergfeld, W. Amended Safety Assessment of Salicylic Acid and Salicylates as Used in Cosmetics.; 2018.
59. Bernauer, U.; Bodin, L.; Chaudhry, Q.; Pieter-Jan, C.; Dusinska, M.; Gaffet, E.; Panderi, I.; Rousselle, C.; Stepnik, M.; Wijnhoven, S.; et al. *SCCS Opinion on Solubility of Synthetic Amorphous Silica (SAS) - SCCS/1606/19 - Final Opinion*; 2019;
60. Polotuhé liekové formy. In *Liekové formy a aplikačné cesty podávania liekov so zameraním na ich význam v humánnej medicíne*; 2019; pp. 44–51 ISBN 978-80-8152-753-1.
61. Borges, A.F.; Silva, C.; Coelho, J.F.J.; Simões, S. Oral Films: Current Status and Future Perspectives: I — Galenical Development and Quality Attributes. *J. Controlled Release* **2015**, *206*, 1–19, doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.006.
62. Pünnel, L.C.; Lunter, D.J. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 932, doi:10.3390/pharmaceutics13070932.
63. Tan, X.; Feldman, S.R.; Chang, J.; Balkrishnan, R. Topical Drug Delivery Systems in Dermatology: A Review of Patient Adherence Issues. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 1263–1271, doi:10.1517/17425247.2012.711756.
64. Bouthillette, M.; Beccati, D.; Akthakul, A.; Ramadurai, N.; Nashat, A.; Langer, R.; Anderson, R.R.; Sakamoto, F.H. A Crosslinked Polymer Skin Barrier Film for Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Pilot Study in Adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2020**, *82*, 895–901, doi:10.1016/j.jaad.2019.09.073.
65. Singh Malik, D.; Mital, N.; Kaur, G. Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 213–228, doi:10.1517/13543776.2016.1131267.

66. Brown, M.B.; Turner, R.; Lim, S.T. Topical Product Formulation Development. In *Topical and Transdermal Drug Delivery*; Benson, H.A.E., Watkinson, A.C., Eds.; Wiley, 2011; pp. 255–286 ISBN 978-0-470-45029-1.
67. CIMA FICHA TECNICA ALGESAL ACTIVADO 10 MG/G + 100 MG/G POMADA Available online: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/49339/FT\\_49339.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/49339/FT_49339.html) (accessed on 4 March 2024).
68. HALMED Deep Heat Rub Crema - Medicinal Products Database Medicinal Products HALMED Available online: <https://www.halmed.hr/en/Lijekovi/Baza-lijekova/Deep-Heat-Rub-krema/13302/> (accessed on 4 March 2024).
69. Detail Lieku ŠÚKL Available online: [https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page\\_id=386&lie\\_id=86229](https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=86229) (accessed on 4 March 2024).
70. CIMA FICHA TECNICA REFLEX SPRAY SOLUCIÓN PARA PULVERIZACIÓN CUTÁNEA Available online: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/47889/FT\\_47889.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/47889/FT_47889.html) (accessed on 4 March 2024).
71. CIMA FICHA TECNICA ALGESAL 10 MG/G + 100 MG/G ESPUMA CUTANEA Available online: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/53607/FT\\_53607.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/53607/FT_53607.html) (accessed on 4 March 2024).
72. Farmaco Banca Dati Farmaci Dell'AIFA, REMY STICK Matita Cutanea Available online: <https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/bancadatifarmaci/farmaco?farmaco=015503> (accessed on 23 March 2024).
73. Farmaco Banca Dati Farmaci Dell'AIFA, Salonpas Flessibile Available online: <https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/bancadatifarmaci/farmaco?farmaco=042979> (accessed on 4 March 2024).
74. Karki, S.; Kim, H.; Na, S.-J.; Shin, D.; Jo, K.; Lee, J. Thin Films as an Emerging Platform for Drug Delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2016**, *11*, 559–574, doi:10.1016/j.ajps.2016.05.004.
75. Frederiksen, K.; Guy, R.H.; Petersson, K. The Potential of Polymeric Film-Forming Systems as Sustained Delivery Platforms for Topical Drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 349–360, doi:10.1517/17425247.2016.1124412.
76. Maniruzzaman, M.; Boateng, J.S.; Snowden, M.J.; Douroumis, D. A Review of Hot-Melt Extrusion: Process Technology to Pharmaceutical Products. *Int. Sch. Res. Not.* **2012**, *2012*, e436763, doi:10.5402/2012/436763.
77. Kashmira, K.; Harsha, K. Film Forming Systems for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, *12*, 487–497, doi:10.1016/j.ajps.2017.07.004.
78. Janßen, E.M.; Schliephacke, R.; Breitenbach, A.; Breitreutz, J. Drug-Printing by Flexographic Printing Technology—A New Manufacturing Process for Orodispersible Films. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 818–825, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.12.023.
79. Sharma, D.; Kaur, D.; Verma, S.; Singh, D.; Singh, M.; Singh, G.; Garg, R. Fast Dissolving Oral Films Technology: A Recent Trend For An Innovative Oral Drug Delivery System. *Int. J. Drug Deliv.* **2015**, *7*, 60–75.

80. De Oliveira, F.F.D.; De Menezes, L.R.; Tavares, M.I.B. Film-Forming Systems in Topically Administered Pharmaceutical Formulations. *Mater. Sci. Appl.* **2020**, *11*, 576–590, doi:10.4236/msa.2020.118038.
81. Lamisil Once - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (Emc) Available online: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/179/smpc#gref> (accessed on 26 March 2024).
82. Urgo FILMOGEL Poškozené nehty 3,3 ml Available online: <https://www.drmax.cz/urgo-filmogel-poskozene-nehty-3-3-ml> (accessed on 26 March 2024).
83. Akutol™ sprej Available online: <https://www.akutol.cz/produkt/akutol-sprej/> (accessed on 26 March 2024).
84. Snejdrova, E.; Martiška, J.; Loskot, J.; Paraskevopoulos, G.; Kováčik, A.; Regdon Jr., G.; Budai-Szűcs, M.; Palát, K.; Konečná, K. PLGA Based Film Forming Systems for Superficial Fungal Infections Treatment. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *163*, 105855, doi:10.1016/j.ejps.2021.105855.
85. Barbu, E.; Verestiuc, L.; Nevell, T.G.; Tsibouklis, J. Polymeric Materials for Ophthalmic Drug Delivery: Trends and Perspectives. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3439–3443, doi:10.1039/B605640G.
86. Achouri, D.; Alhanout, K.; Piccerelle, P.; Andrieu, V. Recent Advances in Ocular Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 1599–1617, doi:10.3109/03639045.2012.736515.
87. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **2011**, *3*, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377.
88. Biondi, M.; Ungaro, F.; Quaglia, F.; Netti, P.A. Controlled Drug Delivery in Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 229–242, doi:10.1016/j.addr.2007.08.038.
89. Chavan, Y.R.; Tambe, S.M.; Jain, D.D.; Khairnar, S.V.; Amin, P.D. Redefining the Importance of Polylactide-Co-Glycolide Acid (PLGA) in Drug Delivery. *Ann. Pharm. Fr.* **2022**, *80*, 603–616, doi:10.1016/j.pharma.2021.11.009.
90. Dorta, M.J.; Oliva, A.; Munguía, O.; Llabrés, M.; Fariña, J.B. In-Vitro Release of Fluoropyrimidines from PLGA Film Implants. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *54*, 757–763, doi:10.1211/0022357021779096.
91. Kim, Y.; Beck-Broichsitter, M.; Banga, A.K. Design and Evaluation of a Poly(Lactide-Co-Glycolide)-Based In Situ Film-Forming System for Topical Delivery of Trolamine Salicylate. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 409, doi:10.3390/pharmaceutics11080409.
92. Zhang, H.; Liu, H.; Huang, N.; He, Y.; Lei, T.; Wang, X.; Yang, M.; Luo, G. Studies Based on Preparation, Physical Characteristics, and Cellular Pharmacological Activities of Thin PLGA Film Loaded with Geniposide. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 1–8, doi:10.1155/2014/352423.
93. Pang, J.; Luan, Y.; Li, F.; Cai, X.; Du, J.; Li, Z. Ibuprofen-Loaded Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Films for Controlled Drug Release. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 659–665, doi:10.2147/IJN.S17011.
94. Snejdrova, E.; Podzimek, S.; Martiška, J.; Holas, O.; Dittrich, M. Branched PLGA Derivatives with Tailored Drug Delivery Properties. *Acta Pharm. Zagreb Croat.* **2020**, *70*, 63–75, doi:10.2478/acph-2020-0011.

95. Kanjickal, D.G.; Lopina, S.T. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery Systems--a Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *21*, 345–386, doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v21.i5.10.
96. Frank, A. Factors Affecting the Degradation and Drug-Release Mechanism of Poly(Lactic Acid) and Poly[(Lactic Acid)-Co-(Glycolic Acid)]. *Polym. Int.* **2005**, *54*, 36–46, doi:10.1002/pi.1697.
97. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Pr at, V. PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 505–522, doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
98. Snejdrova, E.; Dittrich, M.; Drastik, M. Plasticized Branched Aliphatic Oligoesters as Potential Mucoadhesive Drug Carriers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *458*, 282–286, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.030.
99. Guo, M.; Chu, Z.; Yao, J.; Feng, W.; Wang, Y.; Wang, L.; Fan, Y. The Effects of Tensile Stress on Degradation of Biodegradable PLGA Membranes: A Quantitative Study. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *124*, 95–100, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.12.019.
100. Gooch, J.W. *Encyclopedic Dictionary of Polymers*; Springer Science & Business Media, 2010; ISBN 978-1-4419-6246-1.
101. Wu, X.S.; Wang, N. Synthesis, Characterization, Biodegradation, and Drug Delivery Application of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers. Part II: Biodegradation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12*, 21–34, doi:10.1163/156856201744425.
102. Astete, C.E.; Sabliov, C.M. Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247–289, doi:10.1163/156856206775997322.
103. Kitchell, J.P.; Wise, D.L. Poly(Lactic/Glycolic Acid) Biodegradable Drug-Polymer Matrix Systems. *Methods Enzymol.* **1985**, *112*, 436–448, doi:10.1016/s0076-6879(85)12034-3.
104. Gungor, S.; Erdal, M.; Ozsoy, Y. Plasticizers in Transdermal Delivery Systems. In; 2012; pp. 91–112 ISBN 9799533074886.
105. Flynn Plasticity: Free Volume, Gel, Lubricity Theories Available online: <https://www.goodyearrubber.com/plasticity-free-volume-gel-lubricity-theories/> (accessed on 25 April 2024).
106. Frederiksen, K.; Guy, R.H.; Petersson, K. The Potential of Polymeric Film-Forming Systems as Sustained Delivery Platforms for Topical Drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 349–360, doi:10.1517/17425247.2016.1124412.
107. Jadhav, N.; Gaikwad, V.; Nair, K.; Kadam, H. Glass Transition Temperature: Basics and Application in Pharmaceutical Sector. *Asian J. Pharm.* **2009**, *3*, 82, doi:10.4103/0973-8398.55043.
108. *Handbook of Plasticizers*; Wypych, G., Ed.; ChemTec Publishing: Toronto, 2004; ISBN 978-1-895198-29-4.
109. Chamorthy, S.; Pinal, R. Plasticizer Concentration and the Performance of a Diffusion-Controlled Polymeric Drug Delivery System. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *331*, 25–30, doi:10.1016/j.colsurfa.2008.05.047.
110. Amnuaitkit, C.; Ikeuchi, I.; Ogawara, K.; Higaki, K.; Kimura, T. Skin Permeation of Propranolol from Polymeric Film Containing Terpene Enhancers for Transdermal Use. *Int. J. Pharm.* **2005**, *289*, 167–178, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.007.

111. Crawford, R.R.; Esmerian, O.K. Effect of Plasticizers on Some Physical Properties of Cellulose Acetate Phthalate Films. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 312–314, doi:10.1002/jps.2600600238.
112. Snejdrova, E.; Dittrich, M. Pharmaceutically Used Plasticizers. In *Recent Advances in Plasticizers*; 2012 ISBN 978-953-51-0363-9.
113. Snejdrova, E.; Drastik, M.; Dittrich, M.; Kastner, P.; Nguyenova, J. Mucoadhesive Plasticized System of Branched Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) with Aciclovir. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42*, 1653–1659, doi:10.3109/03639045.2016.1160109.
114. Tang, Y.; Singh, J. Controlled Delivery of Aspirin: Effect of Aspirin on Polymer Degradation and in Vitro Release from PLGA Based Phase Sensitive Systems. *Int. J. Pharm.* **2008**, *357*, 119–125, doi:10.1016/j.ijpharm.2008.01.053.
115. D'Souza, S.; Faraj, J.A.; Dorati, R.; DeLuca, P.P. Enhanced Degradation of Lactide-Co-Glycolide Polymer with Basic Nucleophilic Drugs. *Adv. Pharm.* **2015**, *2015*, e154239, doi:10.1155/2015/154239.
116. Frank, A.; Rath, S.K.; Venkatraman, S.S. Controlled Release from Bioerodible Polymers: Effect of Drug Type and Polymer Composition. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2005**, *102*, 333–344, doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.019.
117. Bucher, K.; Bucher, K.E.; Walz, D. Irritant Actions of Unphysiological pH Values. A Controlled Procedure to Test for Topical Irritancy. *Agents Actions* **1979**, *9*, 124–132, doi:10.1007/BF02024143.
118. Alberti, I.; Grenier, A.; Kraus, H.; Carrara, D.N. Pharmaceutical Development and Clinical Effectiveness of a Novel Gel Technology for Transdermal Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 935–950, doi:10.1517/17425247.2.5.935.
119. Williams, A.C.; Walters, K.A. Chemical Penetration Enhancement: Possibilities and Problems. In *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*; 2007; pp. 497–504.
120. Věříš, A. Characterization of PLGA-Based Film Forming Systems. **2021**.
121. PubChem Acetone Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/180> (accessed on 26 March 2024).
122. Committee for Human Medicinal Products ICH Q3C (R8) Residual Solvents - Scientific Guideline Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r8-residual-solvents-scientific-guideline> (accessed on 26 March 2024).
123. Research, C. for D.E. and Inactive Ingredients in Approved Drug Products Search: Frequently Asked Questions. *FDA* **2022**.
124. Akhter, S.A.; Barry, B.W. Absorption through Human Skin of Ibuprofen and Flurbiprofen; Effect of Dose Variation, Deposited Drug Films, Occlusion and the Penetration Enhancer *N*-Methyl-2-Pyrrolidone. *J. Pharm. Pharmacol.* **1984**, *37*, 27–37, doi:10.1111/j.2042-7158.1985.tb04926.x.
125. *The United States Pharmacopeia: USP 29 : The National Formulary : NF 24 : By Authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc., Meeting at Washington, D.C., March 9-13, 2005*; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, Md., 2005; ISBN 978-1-889788-39-5.
126. O'Neill, M.A.A.; Gaisford, S. Application and Use of Isothermal Calorimetry in Pharmaceutical Development. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 83–93, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.038.



127. *Polymer Testing*; Grellmann, W., Seidler, S., Altstädt, V., Bauer, M., Bierögel, C., Busse, G., Eds.; 3rd edition.; Hanser: München, 2022; ISBN 978-1-56990-808-2.
128. Stodghill, S.P. Thermal Analysis – A Review of Techniques and Applications in the Pharmaceutical Sciences Available online: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36776-Thermal-Analysis-A-Review-of-Techniques-and-Applications-in-the-Pharmaceutical-Sciences/> (accessed on 13 January 2024).
129. Höhne, G.; Hemminger, W.; Flammersheim, H.-J. *Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners*; Springer-Verlag, 1996; ISBN 978-3-540-59012-5.
130. Craig, D.Q.M.; Reading, M. *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*; CRC Press, 2006; ISBN 978-1-4200-1489-1.
131. James Swarbrick-Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. v.1-6-Informa Healthcare (2001).Pdf.
132. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems - Hancock - 1997 - Journal of Pharmaceutical Sciences - Wiley Online Library Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1021/js9601896> (accessed on 20 January 2024).
133. Thermal Analysis of Glassy Pharmaceuticals - ScienceDirect Available online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004060319401949H> (accessed on 20 January 2024).
134. The Concept of ‘Structure’ in Amorphous Solids from the Perspective of the Pharmaceutical Sciences | Amorphous Food and Pharmaceutical Systems | Books Gateway | Royal Society of Chemistry Available online: <https://books.rsc.org/books/edited-volume/505/chapter-abstract/159753/The-concept-of-structure-in-amorphous-solids-from?redirectedFrom=PDF> (accessed on 20 January 2024).
135. What are the advantages and disadvantages of using DSC to characterize glass samples? | 3 Answers from Research papers Available online: <https://typeset.io/questions/what-are-the-advantages-and-disadvantages-of-using-dsc-to-1mibrkb6nf> (accessed on 20 January 2024).
136. Measurlabs Diferenciálna skenovacia kalorimetria | DSC analýza | Measurlabs Available online: <https://measurlabs.com/methods/differential-scanning-calorimetry-dsc/> (accessed on 20 January 2024).
137. Wick, K.A.; Wick, S.M.; Hawkinson, R.W.; Holtzman, J.L. Adhesion-to-Skin Performance of a New Transdermal Nitroglycerin Adhesive Patch. *Clin. Ther.* **1989**, *11*, 417–424.
138. Malvern Assessing Tackiness and Adhesion Using a Pull Away Test on a Rotational Rheometer 2015.
139. Minghetti, P.; Cilurzo, F.; Casiraghi, A. Measuring Adhesive Performance in Transdermal Delivery Systems. *Am. J. Drug Deliv.* **2004**, *2*, 193–206, doi:10.2165/00137696-200402030-00004.
140. Test Methods to Evaluate Tack Available online: <https://adhesives.specialchem.com/selection-guide/test-methods-to-evaluate-tack> (accessed on 15 April 2024).

141. Creton, C. Pressure-Sensitive Adhesives: An Introductory Course. *MRS Bull.* **2003**, *28*, 434–439, doi:10.1557/mrs2003.124.
142. Poh, B.T.; Suid, N.H. Dependence of Adhesion Properties of Cross-Linked Epoxidized Natural Rubber (ENR 25)-Based Pressure-Sensitive Adhesives on Benzoyl Peroxide Loading in the Presence of Gum Rosin and Petroresin Tackifiers. *J. Adhes.* **2014**.
143. Bhowmick, M.; Sengodan, T.; Erode, S. EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEMS: AN EXHAUSTIVE PICTORIAL AND FIGURATIVE REVIEW. *J. Drug Deliv. Ther.* **2014**, *4*, 9–22, doi:10.22270/jddt.v4i6.664.
144. ImpactSolutions Peel Adhesion Test – 90° and 180° Peel Test. *Impact Solut.* **2018**.
145. Johnston, J. Testing: General and Specific. In *Pressure Sensitive Adhesive Tapes: A Guide to Their Function, Design, Manufacture, and Use*; Pressure Sensitive Tape Council, 2003 ISBN 978-0-9728001-0-5.
146. Worldwide MI. A Basic Introduction to Rheology.
147. Deepika . B; Tasleem, J.; Kandukoori, N.R.; Raju; Sarangapani, S.; Sri, K. Dissolution: A Predictive Tool for a Conventional and Novel Dosage Forms. **2018**.
148. Eaton, J.; Deng, G.; Hauck, W.; Brown, W.; Manning, R.; Wahab, S. Perturbation Study of Dissolution Apparatus Variables—A Design of Experiment Approach. *Dissolution Technol.* **2007**, *14*, doi:10.14227/DT140107P20.
149. Eldallal, M. *DISSOLUTION REVIEW*; 2016;
150. Zhang, W.; Xiao, C.; Xiao, Y.; Tian, B.; Gao, D.; Fan, W.; Li, G.; He, S.; Zhai, G. An Overview of in Vitro Dissolution Testing for Film Dosage Forms. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *71*, 103297, doi:10.1016/j.jddst.2022.103297.
151. Zkouška diosluce náplastí. In *Český lékopis 2023: Tištěná verze (1.-4. díl)*; Grada Publishing a.s., 2023; pp. 732–733 ISBN 978-80-271-5059-5.
152. Klose, D.; Siepmann, F.; Elkharraz, K.; Siepmann, J. PLGA-Based Drug Delivery Systems: Importance of the Type of Drug and Device Geometry. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354*, 95–103, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.030.
153. Snejdrova, E.; Podzimek, S.; Martiska, J.; Holas, O.; Dittrich, M. Branched PLGA Derivatives with Tailored Drug Delivery Properties. *Acta Pharm.* **2020**, *70*, 63–75, doi:10.2478/acph-2020-0011.
154. Eslami, Z.; Elkoun, S.; Robert, M.; Adjallé, K. A Review of the Effect of Plasticizers on the Physical and Mechanical Properties of Alginate-Based Films. *Molecules* **2023**, *28*, 6637, doi:10.3390/molecules28186637.
155. Topical Penetration of Commercial Salicylate Esters and Salts Using Human Isolated Skin and Clinical Microdialysis Studies - PMC Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1873984/> (accessed on 23 January 2024).
156. Cilurzo, F.; Minghetti, P.; Pagani, S.; Casiraghi, A.; Montanari, L. Design and Characterization of an Adhesive Matrix Based on a Poly(Ethyl Acrylate, Methyl Methacrylate). *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 748–754, doi:10.1208/s12249-008-9102-4.
157. Gennari, C.G.M.; Selmin, F.; Franzè, S.; Musazzi, U.M.; Quaroni, G.M.G.; Casiraghi, A.; Cilurzo, F. A Glimpse in Critical Attributes to Design Cutaneous

- Film Forming Systems Based on Ammonium Methacrylate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *41*, 157–163, doi:10.1016/j.jddst.2017.07.009.
158. Cilurzo, F.; Selmin, F.; Gennari, C.G.M.; Montanari, L.; Minghetti, P. Application of Methyl Methacrylate Copolymers to the Development of Transdermal or Loco-Regional Drug Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 1033–1045, doi:10.1517/17425247.2014.912630.