

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

**Badania nad wielofazową  
postacią leku dopochwowego**

**The study on multi-phase vaginal dosage form**

Rozprawa doktorska na podstawie  
monotematycznego cyklu publikacji naukowych  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

mgr farm. Michał Smoleński

Promotor: dr hab. n. farm. Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Dorota Haznar-Garbacz

Wrocław 2023



<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WŁĄCZONYCH DO CYKLU PUBLIKACJI.....</b>	<b>7</b>
1. WPROWADZENIE.....	8
2. CEL PRACY.....	9
2.1. Cele szczegółowe badań włączonych do cyklu artykułów naukowych.....	9
3. MATERIAŁY I METODY .....	9
3.1. Metoda przeszukiwania baz danych.....	9
3.2. Metody wytwarzania formulacji i sporządzanie serii doświadczalnych .....	10
3.3. Kryterium selekcji formulacji do dalszych badań.....	12
3.4. Sporządzanie wybranych do dalszych badań i zoptymalizowanych serii doświadczalnych 12	
3.5. Ocena właściwości fizykochemicznych .....	13
3.6. Testy stabilności .....	14
3.7. Metoda HPLC .....	14
3.8. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego.....	15
3.9. Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu - metoda przepływowa USP IV.....	15
3.10. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych - metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu USP III.....	16
3.11. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych - metoda przepływowa z wykorzystaniem aparatu USP IV i pompy strzykawkowej ....	16
3.12. Analiza statystyczna wyników .....	17
4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI.....	17
4.1. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji A .....	17
4.2. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji B .....	18
4.3. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji C .....	21
5. DYSKUSJA I PODSUMOWANIE .....	22
6. WNIOSKI.....	27
7. PIŚMIENNICTWO .....	28
<b>ZAŁĄCZNIKI .....</b>	<b>34</b>
I. PUBLIKACJA A.....	34
II. PUBLIKACJA B.....	74
III. PUBLIKACJA C.....	99
IV. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW.....	111
V. WYKAZ PUBLIKACJI POTWIERDZONY PRZEZ BIBLIOTEKĘ .....	124
VI. DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA .....	128

## STRESZCZENIE

Choroby układu rozrodczego kobiet, w szczególności infekcje spowodowane przez grzyby z rodzaju *Candida spp.*, stanowią istotne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Według danych statystycznych, 1/3 światowej populacji kobiet przynajmniej raz w życiu będzie cierpieć z powodu infekcji intymnej o etiologii drożdżakowej. Nawet 15% przypadków infekcji ma charakter nawrotowy, których niewłaściwe lub nieefektywne leczenie prowadzi do oporności szczepów na działanie substancji przeciwgrzybiczych i większego ryzyka komplikacji. Rozwiązanie problemu nawracającej kandydozy pochwy, dotyczącej około 138 milionów kobiet na całym świecie, wymaga podjęcia badań nad nowoczesnymi postaciami leku, które wykażą się wyższą efektywnością leczenia i umożliwią przewyciężenie trudności wynikających z uwarunkowań anatomiczno-fizjologicznych – ciągłego wymywania postaci leku z miejsca podania przez wydzielinę pochwową oraz jej niewielkiej objętości obecnej w pochwie, która utrudnia rozpuszczanie substancji czynnych.

W odpowiedzi na powyższe problemy, podjęto badania w celu opracowania wielofazowej postaci leku dopochwowego, która będzie umożliwiać jednoczesne podawanie leków o charakterze lipofilowym i hydrofilowym oraz będzie wykazywać zwiększony czas retencji w miejscu podania w porównaniu do obecnie stosowanych postaci leku.

W tym celu dokonano przeglądu i analizy piśmiennictwa celem wyznaczenia obszarów badań i wymagań dla optymalnej postaci leku dopochwowego. W wyniku krytycznej analizy stanu wiedzy badania skupiły się na opracowaniu wielofazowej postaci leku na bazie nanoemulsji. Przedstawiono analizę aktualnego stanu techniki i metod badawczych, dla których wykazano brak ujednoczonego sposobu oceny tych postaci.

W dalszej części sporządzono 25 formułacji, spośród których 3 zostały wybrane do dalszych badań. Jako substancję czynną wybrano klotrimazol – pochodną imidazolu. W pracy przedstawiono ścieżkę rozwoju formułacji z uwzględnieniem kompozycji i zastosowanych metod wytwarzania. Przeprowadzono ocenę parametrów fizykochemicznych otrzymanych formułacji uwzględniając parametry takie, jak objętościowy rozkład i średnią wielkość kropli oleju, współczynnik polidispersyjności, średnią wartość potencjału zeta, odczyn pH formułacji i jej osmolalność. Przeprowadzono



badania stabilności i ocenę dostępności farmaceutycznej wolnej frakcji klotrimazolu z matrycy nanoemulsyjnej. Z uwagi na uzyskanie wyników badania dostępności farmaceutycznej, które uniemożliwiły dyskryminującą ocenę formulacji, przeprowadzono dalsze badania w celu opracowania metody charakteryzującej się wyższą precyzją oraz bliższym stopniem symulacji warunków fizjologicznych.

## ABSTRACT

Diseases of the female reproductive system, especially infections caused by *Candida* spp. fungi are a significant challenge to modern medicine. Statistically, one-third of all women will suffer at least once in their life from an intimate infection caused by yeasts. Inadequate or ineffective treatment leads to resistance of strains to antifungal drugs and a higher risk of complications which results in progression to recurrent infections in up to 15% of cases of vaginal candidiasis. The major health problem of recurrent vaginal candidiasis affects 138 million women worldwide. In order to solve the emerging issue, research on novel drug forms of higher treatment efficacy and the ability to overcome the continuous secretion of vaginal discharge and its low ambient volume at the site of administration hindering the dissolution of active pharmaceutical ingredients is required.

To address these problems, the study was undertaken to develop a multicompartiment intravaginal drug formulation enabling simultaneous administration of lipophilic and hydrophilic drugs and exhibiting increased retention time at the administration site when compared to standard dosage forms. In order to achieve this aim, the literature review was performed to analyze and determine areas of research and requirements for an optimal vaginal drug formulation. The study of the development of the multiphase drug formulation based on nanoemulsions has been selected as a main research objective based on the result of the critical analysis of the current state-of-the-art.

In the further part of the study, 25 formulations were prepared, of which 3 were selected for further investigation. Clotrimazole, an imidazole derivative, was chosen as the active pharmaceutical ingredient. In the dissertation, the process of development of the final formulation, especially the composition and the manufacturing methods is presented. The evaluation of physicochemical parameters of the obtained formulations was performed, including volumetric distribution and average oil droplet size, polydispersity index, zeta potential mean value, pH of the formulation and its osmolality. Stability tests and assessment of the pharmaceutical availability of the nonencapsulated fraction of clotrimazole from the nanoemulsion matrix were conducted. An advanced investigation

was performed to develop a method characterized by a higher degree of precision and a closer simulation of physiological conditions due to the results of the pharmaceutical availability test, which prevented discriminatory evaluation of formulations.

## WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WŁĄCZONYCH DO CYKLU PUBLIKACJI

- A. **Smoleński Michał**, Karolewicz Bożena, Gołkowska Anna M., Nartowski Karol P., Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna\*: *Emulsion-based multicompartiment vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 12, art.6455 [39 s.], DOI:10.3390/ijms22126455,  
MEiN – 140  
IF – 6,208
- B. **Smoleński Michał**, Muschert Susanne\*, Haznar-Garbacz Dorota, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: *Nanoemulsion loaded with clotrimazole based on rapeseed oil for potential vaginal application – development, initial assessment, and pilot release studies*, Pharmaceutics, 2023, vol. 15, nr 5, art.1437 [24 s.], DOI:10.3390/pharmaceutics15051437,  
MEiN – 100  
IF – 6,525
- C. **Smoleński Michał**, Haznar-Garbacz Dorota\*, Florin-Muschert Susanne, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: *Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego*, Farmacja Polska, 2022, vol. 78, nr 12, s. 675-684, DOI:10.32383/farmpol/165925  
MEiN – 70

Sumaryczna punktacja MEiN – 310

Sumaryczny IF – 12,733

## 1. Wprowadzenie

Choroby układu rozrodczego kobiet, szczególnie infekcje o charakterze nawrotowym, stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny. Jednym z najczęstszych sposobów podawania leków w tych schorzeniach jest droga dopochwowa znana od wielu lat i powszechnie stosowana, także w antykoncepcji. Najczęściej stosowanymi postaciami są roztwory, maści, krążki, czopki i tabletki [1].

Największą uwagę lekarzy i naukowców przykuwają infekcje grzybicze pochwy (kandydozy, *vaginal candidiasis*) wywołane przez drożdżaki *Candida spp* [2]. Szczególnie narażone są dorosłe kobiety, aktywne seksualnie nastolatki i młode dziewczęta z chorobami współistniejącymi, np. cukrzycą typu 1, niedoborem odporności, a także w trakcie lub po zastosowaniu antybiotykoterapii [3–5]. Nieleczone lub niewłaściwie leczone zapalenie pochwy u kobiet w ciąży może stanowić poważne zagrożenie dla noworodków z powodu inwazyjnych zakażeń grzybiczych, które mogą być przenoszone z matki na noworodka [6]. Zdecydowana większość kobiet przynajmniej raz w życiu cierpi z powodu kandydozy pochwy [2,7]. Niestety, nawet około 138 mln kobiet rocznie cierpi na nawracającą postać kandydozy pochwy (ang. *recurrent vulvovaginal candidiasis*) najczęściej charakteryzowaną jako 3 lub 4 powtarzające się infekcje w ciągu roku [8,9]. Szacuje się, że około 15% infekcji spowodowanych przez *Candida albicans* ulega progresji do postaci nawracającej [3,8,9]. Powoduje to znaczące pogorszenie jakości życia kobiet i stwarza większe ryzyko powikłań.

W odpowiedzi na ten problem prowadzi się liczne badania nad nowoczesnymi postaciami leku takimi, jak hydrożele, filmy, systemy emulsyjne (nanoemulsje, mikroemulsje) oraz nanocząstki [10–13]. Postaci te mają stanowić rozwiązanie trudności wynikających z uwarunkowań anatomiczno-fizjologicznych, gdyż w mniejszym stopniu poddają się ciągłemu wymywaniu formułacji z miejsca podania przez wydzielinę pochwową. Ponadto, ułatwiają rozpuszczanie substancji czynnych, zwłaszcza o charakterze lipofilowym, w niewielkiej ilości wydzieliny obecnej w pochwie, tj. 2 mL w porównaniu do klasycznych postaci dopochwowych [14–16].

Spośród substancji leczniczych w leczeniu kandydozy najczęściej stosuje się pochodne imidazolu, w szczególności flukonazol i klotrimazol (*clotrimazolum*, CLT) [17,18]. Jednak, częste i niewłaściwie stosowanie pierwszego z nich wpłynęło na wzrost oporności grzybów z rodziny *Candida spp.* i brak skuteczności klinicznej flukonazolu [3,18]. Z tego powodu klotrimazol wciąż stanowi lek pierwszego rzutu w leczeniu

kandydozy. Aktualne rekomendacje dotyczące leczenia niepowikłanych infekcji pochwy o etiologii drożdżakowej obejmują codzienną dopochwową aplikację 1% kremu z CLT w dawce 5 g przez 7 do 14 dni [19].

Z uwagi na powyższe trudności, w celu poprawy efektywności terapii schorzeń ginekologicznych podjęto badania nad wielofazową postacią leku dopochwowego, która umożliwiłaby podawanie leków o charakterze lipofilowym i hydrofilowym.

## 2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest poprawa jakości terapii schorzeń układu rozrodczego poprzez wyznaczenie i określenie istotnych cech oraz wymagań optymalnej postaci leku dopochwowego, wybór postaci spełniającej ustalone kryteria, opracowanie formulacji oraz metod jej charakteryzacji.

### 2.1. Cele szczegółowe badań włączonych do cyklu artykułów naukowych

- A.** Przegląd i analiza piśmiennictwa: a) opisującego anatomię i fizjologię pochwy w kontekście charakterystyki miejsca podania leku, b) ustalenie cech i wymagań wobec optymalnej postaci leku dopochwowego, c) porównanie cech optymalnej postaci leku z formulacjami na bazie emulsji, d) analizę aktualnego stanu techniki dla emulsji dopochwowych, metod charakteryzacji i potencjalnych zastosowań medycznych oraz e) określenie dalszych kierunków badań.
- B.** Opracowanie kompozycji i technologii otrzymywania nanoemulsji zawierającej klotrimazol jako modelową substancję czynną oraz ocena otrzymanej postaci w zakresie parametrów fizykochemicznych określonych w pracy **A**.
- C.** Porównanie i opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej klotrimazolu z dopochwowej nanoemulsji otrzymanej w pracy **B** i produktów referencyjnych w postaci zawiesiny i komercyjnego kremu.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Metoda przeszukiwania baz danych

Celem zgromadzenia pozycji i przeanalizowania piśmiennictwa, przedstawionego w publikacji **A**, zawierającego opis dopochwowych formulacji na bazie emulsji, przeszukano bazy danych *Scopus* i *Web of Science* z wykorzystaniem słów kluczowych: *intravaginal*, *vaginal*, *gynecological*, *emulsion*, *microemulsion*, *nanoemulsion*, *multiple*

*emulsion*, SEDDS (*Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*), *\*vagin\** oraz *\*emuls\** dla pozycji opublikowanych w latach 2000–2020.

### 3.2. Metody wytwarzania formulacji i sporządzanie serii doświadczalnych

W celu otrzymania stabilnej kinetycznie nanoemulsji o pożądanych cechach takich, jak: a) wielkość kropli oleju < 90 nm, b) indeksie polidispersyjności < 0,3, c) wartości bezwzględnej potencjału zeta ( $\zeta$ -*potential*)  $\pm$  20 mV lub większej, d) pH w fizjologicznym zakresie 3,5–4,5 oraz e) osmolalności < 1200 mOsm/kg, przygotowano łącznie 28 formulacji o składzie i metodzie wytwarzania przedstawionych zbiorczo w tabelach 1 i 2. Jako substancję czynną zastosowano pochodną imidazolu o działaniu przeciwgrzybiczym - klotrimazol (*clotrimazolium* - CLT, Pol-Aura, Różanowo, Polska). Olej rzepakowy (Bunge Polska sp. z o.o., Kruszwica, Polska) został użyty jako frakcja lipofilowa. Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA lub Steinheim, Niemcy), Poloksamer 188 (Pol-Aura, Różanowo, Polska), Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA lub Steinheim, Niemcy), a także Span 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA lub Steinheim, Niemcy) zostały użyte jako surfaktanty i kosurfaktanty. Pozostałe substancje pomocnicze stanowiły glikol polietylenowy 200 (PEG 200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA lub Steinheim, Niemcy), glikol propylenowy (Firma Chempur, Piekary Śląskie, Polska) i 90% kwas mlekowy (Pol-Aura, Różanowo, Polska). Wodę klasy I wyprodukowano w laboratorium stosując urządzenie Ultra (Hydrolab, Sp. z o.o., Straszyn, Polska).

Podczas sporządzania formulacji wykorzystano metody takie, jak mieszanie z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego (IKA Industrie und Kraftfahrzeugausrüstung GmbH, Königswinter, Niemcy), homogenizację szybkoobrotową (ang. *high-speed homogenization* - HSH, PRO250, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA) oraz homogenizację wysokociśnieniową (ang. *high-pressure homogenization* - HPH, GEA PandaPLUS 2000, GEA Mechanical Equipment Italia S.p.A, Parma, Włochy).

Do zaplanowania eksperymentów wykorzystano technikę jednej zmiennej w czasie (ang. *one-factor-at-a-time*), aby umożliwić dokładną obserwację wpływu czynnika na właściwości formulacji. Dokładne wyjaśnienie celu sporządzenia poszczególnych serii doświadczalnych znajduje się w sekcji poświęconej wynikom w publikacji **B**.

Tabela 1. Sporządzone formułacje – skład jakościowo-ilościowy oraz metoda otrzymywania.

Źródło: publikacja B [20].

Seria nr.	Fracja olejowa (% w/w)	Surfaktanty (% w/w)				Pozostałe substancje pomocnicze(s) (% w/w)		Metoda otrzymywania
		Olej rzepakowy	Pluronic F-127	Poloksamer 188	Tween 80	Span 80	PEG 200	
1	40,0	10,0	-	-	-	-	-	HPH 400
2	40,0	10,0	-	-	-	-	-	HPH 800
3	40,0	10,0	-	-	-	-	-	HPH 1200
4	30,0	10,0	-	-	-	-	-	HPH 800
5	30,0	10,0	-	-	-	-	-	HPH 1200
6	10,0	-	-	10,0	-	-	-	IM+HSH
7	10,0	10,0	-	-	-	-	-	IM+HSH
8	40,0	10,0	-	-	-	20,0	-	HSH + HPH 800
9	40,0	20,0	-	-	-	10,0	-	HSH + HPH 800
10	40,0	10,0	-	10,0	-	-	-	HPH 400
11	30,0	5,0	-	5,0	-	-	-	HPH 800
12	20,0	4,5	-	-	4,5	0,5	-	HSH + HPH 800
13	40,0	5,0	-	-	5,0	-	0,5	HSH + HPH 800
14	20,0	4,5	-	-	4,5	-	-	HSH + HPH 800
15	40,0	18,0	-	-	2,0	6,6	-	HSH + HPH 800
16	30,0	18,0	-	-	2,0	6,6	-	HSH + HPH 800
17	20,0	18,0	-	-	2,0	6,6	-	HSH + HPH 800
18	20,0	16,0	-	-	4,0	6,6	-	HSH + HPH 800
19	20,0	14,0	-	-	6,0	6,6	-	HSH + HPH 800
20	20,0	-	18,0	-	2,0	6,6	-	HSH + HPH 800
21	20,0	-	16,0	-	4,0	6,6	-	HSH + HPH 800
22	20,0	-	14,0	-	6,0	6,6	-	HSH + HPH 800
23 (S9:1)	20,0	-	18,0	-	2,0	6,6	-	HSH + HPH 1300
24 (S8:2)	20,0	-	16,0	-	4,0	6,6	-	HSH + HPH 1300
25 (S7:3)	20,0	-	14,0	-	6,0	6,6	-	HSH + HPH 1300

HSH – homogenizacja szybkoobrotowa, 13 000 ± 200 obr./min; HPH – homogenizacja wysokociśnieniowa, 400 – 400 ± 100 bar; 800 – 800 ± 100 bar; 1200 – 1200 ± 100 bar, 1300 – 1300 ± 100 bar; IM – mieszanie wstępne za pomocą homogenizatora szybkoobrotowego przy prędkości 1500 obr./min

Tabela 2. Skład jakościowo-ilościowy nanoemulsji zawierających CLT. Źródło: publikacja **B** [20].

Składnik	Zawartość [% w/w]		
	S9:1-CLT	S8:2-CLT	S7:3-CLT
<i>Clotrimazolum</i> (CLT)	1,0	1,0	1,0
Olej rzepakowy	20,0	20,0	20,0
Kwas mlekowy	0,6	0,6	0,6
Pluronic F-68	18,0	16,0	14,0
PEG 200	6,6	6,6	6,6
Span 80	2,0	4,0	6,0
Woda klasy I	51,8	51,8	51,8

Opis sporządzania 1% wodnej zawiesiny CLT jako formułacji referencyjnej do badań dostępności wolnej frakcji CLT przedstawiono w publikacjach **B** i **C**.

### 3.3. Kryterium selekcji formułacji do dalszych badań

W pracach rozwojowych nad nanoemulsją zawierającą klotrimazol zastosowano dwa kryteria kwalifikacji formułacji do dalszych badań. Ocena wizualna stanowiła kryterium 1., które zostało opracowane celem odrzucenia serii doświadczalnych niespełniających jednej z makroskopowych cech nanoemulsji, tj. przezroczystości lub półprzezroczystości wynikającej z wielkości kropli oleju mniejszej niż długość fali światła widzialnego oraz wykazujących makroskopowe oznaki rozdzielania fazy wodnej od olejowej [21–23]. Oceny dokonano po 24 godz. od otrzymania formułacji.

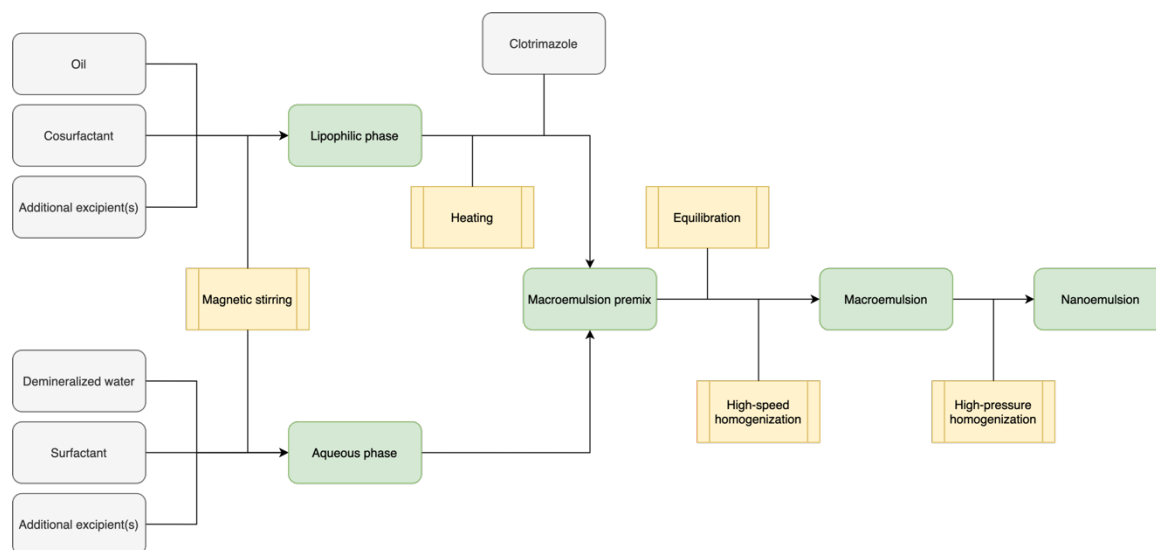
Serie doświadczalne o przezroczystym lub półprzezroczystym wyglądzie, bez makroskopowych cech świadczących o rozdzielaniu się faz po czasie 24 godz. poddano testowi wirówkowemu zgodnie ze schematem zastosowanym przez Wik *et al.* – kryterium 2 [24]. 1 mL badanej formułacji umieszczono w probówce wirówkowej typu *Eppendorf* i poddano wirowaniu przez 30 min. przy 15 000 obrotów na min. w temperaturze 25 °C korzystając z wirówki laboratoryjnej *Eppendorf Centrifuge 5417 R* (*Eppendorf AG*, Hamburg, Niemcy). Test wykonano w 3 powtórzeniach ( $n = 3$ ). Serie doświadczalne bez oznak rozdzielania faz zakwalifikowano do dalszych badań.

### 3.4. Sporządzanie zoptymalizowanych i wybranych do dalszych badań serii doświadczalnych

Do dalszych badań wybrano 3 serie doświadczalne o składach przedstawionych w tabeli 3 - S9:1, S8:2, S7:3 (ang. *blank series*), jak również odpowiadające im



nanoemulsje zawierające klotrimazol - S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT. Serie te sporządzono metodą przedstawioną na Rycinie 1 i opisaną w publikacji **B i C**.



Rycina 1. Otrzymywanie zoptymalizowanych formułacji na bazie nanoemulsji do dalszych badań. Przedruk z publikacji **B** [20].

W pierwszym etapie otrzymywania formułacji, odważone ilości kosurfaktantu i PEG-u 200 dodano do uprzednio ogrzanego oleju rzepakowego i wymieszano do ujednoczenia mieszaniny. Surfaktant rozpuszczono w wodzie klasy I i wprowadzono kroplami do frakcji lipofilowej. Otrzymaną makroemulsję pozostawiono do ustabilizowania przez noc. Następnie, przeprowadzono homogenizację szybkoobrotową i po ochłodzeniu do temperatury pokojowej emulsję poddano 2 cyklom homogenizacji wysokoobrotowej stosując ciśnienie  $1300 \pm 100$  bar. Wartość ciśnienia została ustalona na podstawie optymalizacji procesu przedstawionego w publikacji **B**.

### 3.5. Ocena właściwości fizykochemicznych

Oceny właściwości fizykochemicznych serii doświadczalnych S9:1, S8:2, S7:3 oraz S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT dokonano w publikacji **B**. Dokonano oceny parametrów fizykochemicznych takich, jak: średnia wielkość kropli oleju zawieszanej w fazie ciągłej nanoemulsji (*z-average*), współczynnik polidispersyjności (ang. *polydispersity index*, PDI), wartość potencjału zeta ( $\zeta$ -potential), wartości pH i osmolalności. Pomiarów średniej wielkości kropli oleju, objętościowego rozkładu wielkości kropli oleju, współczynnika polidispersyjności oraz wartości potencjału zeta dokonano z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Wielka Brytania) stosując metodę *Non-Invasive Back Scatter method*.

Pomiaru pH dokonano z wykorzystaniem pH-metru Mettler Toledo SevenMulti S40 (Mettler-Toledo LLC, Columbus, USA) wyposażonego w elektrodę szklaną, zaś osmolalność formulacji zmierzono za pomocą mikro-osmometru Loeser TYP 6 (Loeser Messtechnik, Berlin, Niemcy). Próbki do badań przygotowano zgodnie z procedurami opisanymi w publikacji **B**. Wszystkie pomiary zostały wykonane w 3 powtórzeniach (n = 3).

### **3.6. Testy stabilności**

Otrzymane nanoemulsje zawierające CLT (S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT) poddano testom stabilności w okresie 28 tyg. obserwacji od czasu sporządzenia próbek. Formulacje przechowywano w temp.  $25 \pm 2$  °C, w warunkach wilgotności 30–65% i ochrony przed światłem. Ocenie poddano wygląd formulacji (celem wykrycia makroskopowych oznak rozdzielenia faz) oraz zmierzono średnią wielkość kropli oleju, objętościowy rozkład wielkości kropli oleju, współczynnik polidispersyjności, wartość potencjału zeta i odczyn pH w punktach czasowych 24 godz., 4 tyg. i 28 tyg. od czasu sporządzenia formulacji. Szczegółowy opis znajduje się w publikacji **B**. Wszystkie pomiary zostały wykonane w 3 powtórzeniach (n = 3).

### **3.7. Metoda HPLC**

Zawartość CLT w uzyskanych nanoemulsjach oraz w próbkach otrzymanych podczas badania dostępności farmaceutycznej CLT (publikacje **B** i **C**) zmierzono z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej w układzie faz odwróconych (ang. *Reverse Phase – High-Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Oznaczanie stężenia CLT przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu ciekowego Shimadzu LC-2050C (Shimadzu U.S.A Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) wyposażonego w detektor diodowy DAD (ang. *Diode Array Detector*) i zastosowaniu oktadecylowej kolumny chromatograficznej Phenomenex Gemini C18 o wymiarach 150 mm x 4.6 mm, 3 µm. Badanie prowadzono w warunkach elucji izokratycznej z użyciem fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu i 20 mM buforu fosforanowego o pH 6,8 w stosunku objętościowym 60:40 stosując prędkość przepływu na poziomie 1,5 mL/min. Zakres liniowości metody i jej charakterystyka zostały przedstawione w publikacji **B** i **C**.

### **3.8. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formułacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego**

Badanie dostępności farmaceutycznej CLT przeprowadzono jako funkcję zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formułacji referencyjnych. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem aparatury składającej się z łaźni wodnej (Erweka GmbH, Langen, Niemcy), w której zanurzono szklane naczynia (zlewki) o cylindrycznym kształcie (Erweka GmbH, Langen, Niemcy) oraz wielostanowiskowego mieszadła magnetycznego. Medium akceptorowe stanowiło 300 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH = 3,5, co odpowiada fizjologicznemu odczynowi wydzieliny pochwowej. Badanie prowadzono w temp. 37 °C i przy prędkości obrotów mieszadła magnetycznego wynoszących 100 obr./min. Dokładny opis eksperymentu znajduje się w publikacji **B i C**. Badaniu poddano formułacje S9:1-CLT, S8:2-CLT, 1% zawiesinę CLT i komercyjny produkt referencyjny krem MycoHydralin zawierający 1% CLT (Bayer Healthcare, Loos, Francja). Dla oddzielenia frakcji CLT związanej w formułacji od wolnego CLT wykorzystano worki dializacyjne Servapor (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Niemcy) wykonane z regenerowanej celulozy o wartości odcięcia masy cząsteczkowej do 12 000 Da i porach o średnicy 2,5 nm. Dla ujednoczenia postępowania do badań przyjęto długość worka dializacyjnego wynoszącą 7 cm przy średnicy 16 mm. Do wnętrza prekondycjonowanych worków dializacyjnych wprowadzono odpowiednio po 5 mL formułacji, zawiesiny lub kremu, po czym końce worków zabezpieczono klipsami. Procedurę pobierania i przygotowania próbek do analizy opisano w publikacji **B i C**.

### **3.9. Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu - metoda przepływowa USP IV**

Celem zasymulowania dynamicznych warunków i zapewnienia maksymalnej rozpuszczalności dla CLT przeprowadzono badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą dynamiczną, przepływową z wykorzystaniem aparatu przepływowego (znany również, jako USP apparatus IV) [25,26]. Na aparaturę eksperymentalną składały się: celka przepływowa o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel, Szwajcaria), która została umieszczona w łaźni wodnej od temp. 37 °C oraz pompa tłokowa (CY 7-50, Sotax AG, Basel, Szwajcaria). Badanie prowadzono w układzie otwartym, w którym medium akceptorowe stanowił 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. Pojemność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględniającą objętość

zajmowaną przez złożę szklanych kulek, ustalono na 18 mL. Prędkość przepływu medium ustalono na 2 mL/min., które uzyskano jako najmniejszą możliwą prędkość przepływu medium gwarantującą stabilną pracę pompy CY 7-50. W celu oddzielenia badanych formułacji od medium akceptorowego wykorzystano worki dializacyjne opisane w rozdziale 3.8. Z uwagi na rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredukowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla nanoemulsji S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT, a także formułacji referencyjnych, tj. 1% zawiesiny oraz kremu MycoHydralin. Szczegóły dotyczące procedury pobierania i przygotowywania próbek do analizy znajdują się w publikacjach **B** i **C**.

### **3.10. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formułacji referencyjnych - metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu USP III**

Z powodu nieuzyskania dyskryminujących warunków w pilotażowej metodzie stacjonarnej przeprowadzono drugie badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą stacjonarną z wykorzystaniem aparatu z ruchomym cylindrem, znanym również jako aparat typu III według USP [25,26]. Zastosowano urządzenie Varian Bio-Dis Dissolution System z pompą VK 750D (Varian Inc., Weston Parkway, Cary, USA). W badaniu użyto medium akceptorowego opisanego w podrozdziale 3.8. 200 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 3,5 umieszczono w szklanych cylindrycznych naczyniach o pojemności 300 mL. Eksperyment prowadzono w termostatowanych warunkach 37 °C. Zastosowano worki dializacyjne opisane w podrozdziale 3.8. Z uwagi na mniejszy rozmiar komórki objętość pojedynczej próbki zredukowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formułacji, tj. nanoemulsji S8:2-CLT (wybranej na podstawie wyników zawartych w publikacji **B**), 1% zawiesiny oraz kremu MycoHydralin. Prędkość ruchu posuwistego cylindrów, wewnątrz których umieszczono badane formułacje ustalono na 5 zanurzeń na minutę. Procedurę pobierania i przygotowania próbek do analizy opisano w publikacji **C**.

### **3.11. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formułacji referencyjnych - metoda przepływowa z wykorzystaniem aparatu USP IV i pompy strzykawkowej**

Celem poszukiwania metody dostarczającej warunków w największym stopniu zbliżonych do fizjologicznych, przeprowadzono badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji S8:2-CLT (wybranej na podstawie wyników przedstawionych w publikacji **B**) i produktów referencyjnych, tj. 1% zawiesiny CLT i kremu MycoHydralin

metodą dynamiczną, przepływową z wykorzystaniem celki przepływowej o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel, Szwajcaria), wchodzącej w skład aparatu przepływowego (USP apparatus IV), oraz pompy strzykawkowej (PhD2000 Infusion, Harvard Apparatus, Holliston MA, USA) [25,26]. Medium akceptorowe stanowił 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5, którego rezerwuar stanowiły strzykawki o pojemności 30 mL umieszczone w pompie strzykawkowej. Pojemność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględniającą objętość zajmowaną przez złożę szklanych kulek, ustalono na 18 mL. Przepływ medium ustalono na 2 mL/h, co umożliwiło pobór próbek co 60 min. Badanie prowadzono w temp. 37 °C. Zastosowano worki dializacyjne opisane w podrozdziale 3.8. Z uwagi na rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredukowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formułacji, tj. nanoemulsji S8:2-CLT (wybranej na podstawie publikacji **B**), 1% zawiesiny oraz kremu MycoHydralin. Procedurę pobierania i przygotowania próbek do analizy opisano w publikacji **C**.

### **3.12. Analiza statystyczna wyników**

Wszystkich pomiarów w publikacjach **B** i **C** dokonano w 3 powtórzeniach ( $n = 3$ ). Zostały obliczone wartości średnie (MV) oraz odchylenia standardowe (SD). Dokonano analizy statystycznej wyników za pomocą metody analizy wariancji (ANOVA) dla poziomu ufności 95%. Obliczeń dokonano korzystając z wbudowanego narzędzia „Analiza danych” w oprogramowaniu Microsoft Excel.

## **4. Najważniejsze wyniki**

### **4.1. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji A**

Zgromadzono 172 pozycje piśmiennictwa, w tym 34 dotyczące dopochwowych postaci leku na bazie emulsyjnej (ang. *Emulsion-based Vaginal Dosage Forms, EVDF*) oraz 138 pozycji stanowiących podstawę teoretyczną dla przeprowadzonej analizy.

W publikacji **A** przedstawiono budowę anatomiczno-fizjologiczną pochwy oraz wyszczególniono cechy mające wpływ na podanie leku drogą dopochwową, tj. krótki czas kontaktu z błoną śluzową pochwy, wymywanie formułacji z miejsca podania w wyniku ciągłej produkcji wydzieliny pochwowej i dużą zmienność osobniczą w budowie anatomiczno-fizjologicznej. Jednakże, podanie leku drogą dopochwową pozwala na uzyskanie lepszych rezultatów leczenia schorzeń ginekologicznych przy uniknięciu działań niepożądanych związanych z podaniem ogólnoustrojowym. Błona śluzowa pochwy cechuje się stosunkowo dużą powierzchnią wchłaniania, a rozbudowany system naczyń

pozwała na szybkie wchłanianie się leku z pominięciem krążenia wątrobowego. Dodatkowo w publikacji **A** przedstawiono wpływ składu jakościowego wydzieliny pochwowej i mechanizmy wchłaniania się leku.

W ramach analizy aspektów technologicznych optymalnej postaci leku dopochwowego wyznaczono kryteria istotne dla podania dopochwowego – zdolność postaci do transportu małych cząstek hydrofilowych i lipofilowych, częściową zdolność do rozpuszczania się w wodnym środowisku wydzieliny pochwowej, łatwość podania i właściwości bioadhezyjne [27,28]. Ponadto, postać ta powinna cechować się pH zbliżonym do fizjologicznego i osmolalnością  $< 1200$  mOsm/kg, aby uniknąć działania drażniącego na błonę śluzową [29]. Przeanalizowano wpływ wielkości cząstek i ich ładunku powierzchniowego na zdolność do pokonywania warstwy śluzu obecnego na błonie śluzowej. Biorąc pod uwagę wymienione czynniki zaproponowano postaci emulsyjne jako optymalne nośniki dla leku dopochwowego. Przeprowadzono analizę stanu techniki dla dopochwowych postaci leku na bazie emulsyjnej (ang. *Emulsion-based vaginal dosage forms, EVDF*).

W dalszej części pracy przedstawiono metody charakteryzacji tych postaci na podstawie przeglądu literaturowego i wykazano brak jednolitej metodologii badawczej, która często nie odzwierciedlała warunków fizjologicznych. Przedstawiono przegląd potencjalnych zastosowań *EVDF* w leczeniu schorzeń ginekologicznych i w podaniu systemowym. Wyznaczono kierunki dalszych prac nad rozwojem dopochwowych postaci leku.

## **4.2. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji B**

### *4.2.1. Wybór serii doświadczalnych do dalszych badań oraz proces optymalizacji*

W publikacji **B** przedstawiono proces technologiczny otrzymywania nanoemulsji na bazie oleju rzepakowego do dopochwowego podawania CLT na podstawie wcześniej wyselekcjonowanych składników. W trakcie prac badawczo-rozwojowych nad formułą sporządzono 22 wstępne serie doświadczalne na podstawie, których wyłoniono najbardziej korzystny skład i metodę wytwarzania nanoemulsji, tj. skład ten odpowiadał seriom 20, 21, 22 przedstawionym w tabeli 1. Formuły 1–15 odrzucono z powodu niespełnienia kryterium 1., natomiast formułę 16 z powodu niespełnienia kryterium 2. Uzyskane nanoemulsje 17–19 odrzucono z powodu żelowania polimeru Pluronic F-127 w trakcie procesu homogenizacji, który zastąpiono Poloksamerem 188 w formułach 20–22, które następnie poddano optymalizacji opisanej w publikacji **B**. Otrzymano ostateczne postaci

przedstawione w tabeli 2. Wzrost ciśnienia w procesie homogenizacji powyżej 1300 bar powodował spadek zawartości CLT nawet o 50% początkowej zawartości leku.

#### 4.2.2. Właściwości fizykochemiczne

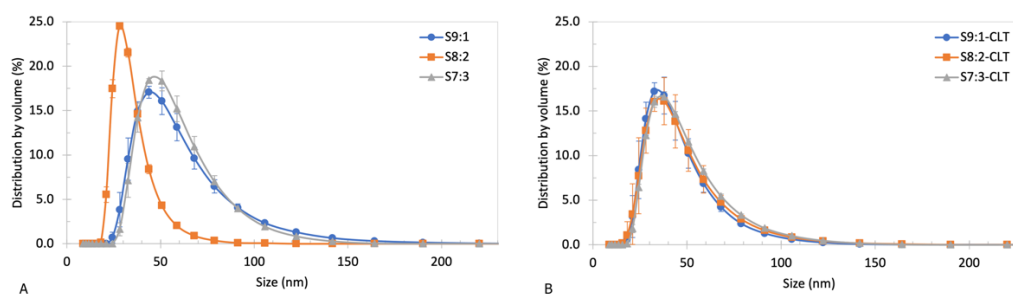
Właściwości fizykochemiczne formułacji S9:1, S8:2, S7:3 i odpowiadającym im nanoemulsjom z lekiem przedstawiono w tabeli 3. Otrzymane serie doświadczalne spełniły wstępne założenia dotyczące: a) wielkość kropli oleju < 90 nm, b) indeks polidispersyjności < 0,3, c) pH w fizjologicznym zakresie 3,5–4,5 i d) osmolalność < 1200 mOsm/kg. Natomiast wartości zmierzonego potencjału zeta oscylowały w granicach zakresu wartości akceptowalnych  $\pm 20$  mV lub większej.

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych serii doświadczalnych. Przedruk i adaptacja na podstawie publikacji B [20].

Seria doświadczalna	Z-average [nm]	PDI	Potencjał $\zeta$ [mV]	Osmolalność [mOsm/kg]	pH
S9:1	67,39 $\pm$ 0,32	0,130 $\pm$ 0,007	-4,63 $\pm$ 0,34	–	3,61
S9:1-CLT	52,16 $\pm$ 0,30	0,145 $\pm$ 0,010	22,00 $\pm$ 1,86	871 $\pm$ 25	4,18
S8:2	58,13 $\pm$ 0,34	0,147 $\pm$ 0,008	16,50 $\pm$ 0,25	–	3,55
S8:2-CLT	55,49 $\pm$ 0,44	0,159 $\pm$ 0,009	19,70 $\pm$ 1,50	852 $\pm$ 17	4,06
S7:3	64,01 $\pm$ 0,11	0,089 $\pm$ 0,012	-2,50 $\pm$ 0,15	–	3,49
S7:3-CLT	56,11 $\pm$ 0,27	0,132 $\pm$ 0,005	22,90 $\pm$ 0,27	758 $\pm$ 5	4,01

Warto zauważyć, że dodatek CLT do nanoemulsji spowodował zmniejszenie średniej wielkości kropli oleju, szczególnie widoczne w przypadku formułacji S9:1 i S7:3, jak również wzrost wartości bezwzględnej potencjału zeta. Najmniej znaczące różnice pomiędzy serią bez leku, a nanoemulsją z CLT zaobserwowano w przypadku formułacji S8:2 i S8:2-CLT.

Objętościowy rozkład wielkości kropli oleju przedstawiono na rycinie X.



Rycina 2. Objętościowy rozkład wielkości kropli oleju dla nanoemulsji wybranych do dalszych badań

#### 4.2.3. Wyniki testu stabilności

Wyniki przeprowadzonych testów stabilności przedstawiono w tabeli 4. Nie zaobserwowano istotnych zmian w wyglądzie nanoemulsji. Średnia wielkość kropli oleju nie miała tendencji do zwiększania się lub zmniejszania w czasie badania. Wartości współczynnika polidispersyjności (PDI) zmalały dla serii S8:2-CLT i S7:3-CLT, choć zmiany te nie miały jednak widocznego wpływu na rozkład wielkości według objętości w czasie (publikacja **B**, ryc. 5), który nie uległ istotnym zmianom. Potencjał  $\zeta$  wykazywał większą zmienność w czasie. Po miesiącu potencjał  $\zeta$  uległ obniżeniu o 0,7 mV (S7:3-CLT) do 4,6 mV (S9:1-CLT), co nie było związane ze zmianami pH. W przypadku S9:1-CLT i S7:3-CLT potencjał  $\zeta$  wzrósł do wartości bliskich początkowym po 28 tyg. Natomiast, dla serii S8:2-CLT zaobserwowano wzrost wartości potencjału  $\zeta$  o 4,5 mV w stosunku do wartości początkowej osiągając 24,20 mV. Dodatkowo, zauważono, że w przypadku serii S7:3-CLT, która wykazała najmniejszą zmienność średniej wartości potencjału  $\zeta$  w ciągu 28 tyg. obserwacji, w ostatnim punkcie czasowym wystąpiło wysokie odchylenie standardowe dla serii S7:3-CLT, które było związane z zaobserwowaniem 2 frakcji kropeł z przewagą dodatnich i ujemnych ładunków mierzonych na ich powierzchniach.

Tabela 4. Wyniki testów stabilności. Przedruk z publikacji **B** [20].

Seria doświadczalna	Czas [tyg.]	Z-average [nm]	PDI	Potencjał $\zeta$ [mV]	pH
S9:1-CLT	0	52,16 ± 0,30	0,145 ± 0,010	22,00 ± 1,86	4,18
	4	52,80 ± 0,06	0,141 ± 0,008	17,40 ± 0,10	4,17
	28	53,22 ± 0,17	0,143 ± 0,014	21,60 ± 1,49	4,13
S8:2-CLT	0	55,49 ± 0,44	0,159 ± 0,009	19,70 ± 1,50	4,06
	4	54,62 ± 0,27	0,140 ± 0,010	18,40 ± 0,79	4,06
	28	55,61 ± 0,15	0,131 ± 0,006	24,20 ± 0,97	4,07
S7:3-CLT	0	56,11 ± 0,27	0,132 ± 0,005	22,90 ± 0,27	4,01
	4	56,20 ± 0,20	0,119 ± 0,004	22,20 ± 0,81	4,02
	28	56,77 ± 0,31	0,116 ± 0,006	23,50 ± 2,46	3,93

#### 4.2.4. Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego

Wyniki zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu przedstawiono w publikacji **B** (ryc. 6). Zaobserwowano brak istotnych statystycznie różnic



w uzyskanych profilach dla wszystkich testowanych nanoemulsji ( $p = 0,51$ ). W ciągu 5 godz. trwania eksperymentu serie S9:1-CLT, S8:2-CLT i S7:3-CLT uzyskały średnią maksymalną ilość uwolnionej wolnej frakcji CLT wynoszącą około 25-30% dawki leku. Pomimo podobieństw zaobserwowano pewne tendencje. Średnia maksymalna ilość wolnej frakcji CLT dla S9:1-CLT była nieco niższa w porównaniu do innych nanoemulsji, dla których zaobserwowano podobne wyniki. Odnotowano wysokie SD dla każdej serii doświadczalnej, najwyższe zaobserwowano w przypadku S8:2-CLT, podczas gdy najniższe SD odnotowano dla S9:1-CLT. 1% zawiesina CLT zastosowana jako formuacja referencyjna wykazywała podobną kinetykę do nanoemulsji z CLT ( $p = 0,67$ ), w przeciwieństwie do kremu z 1% CLT, który uwalniał tylko 5% całkowitej dawki w ciągu 5 godz. Krem różnił się istotnie statystycznie od nanoemulsji i 1% zawiesiny CLT ( $p < 0,05$ ).

#### *4.2.5. Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda przepływowa USP IV*

Wyniki badania pilotażowego przeprowadzonego przy użyciu zestawu USP IV przedstawiono w publikacji **B** (ryc. 7). Profile zmian kumulowanych ilości wolnego CLT dla badanych serii są podobne i charakteryzują się niepełnym uwalnianiem API ( $p = 0,35$ ). Odchylenia standardowe były niskie we wszystkich badanych formuacjach z wyjątkiem serii S9:1-CLT, która również osiągnęła najwyższy poziom uwalnianego CLT do 10% dawki, jednak różnice te były nieistotne statystycznie. Dla formuacji S8:2, S7:3 i 1% zawiesiny zaobserwowano podobne profile o nieco niższych wartościach w porównaniu do S9:1-CLT ( $p = 0,74$ ) i znacznie wyższych niż w przypadku kremu z CLT, tj. 2-3% uwolnionej dawki API ( $p < 0,05$ ).

### **4.3. Najważniejsze wyniki przedstawione w publikacji C.**

#### *4.3.1. Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu - metoda USP III*

Wyniki uzyskanych profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w metodzie z wykorzystaniem aparatu USP III przedstawiono na ryc. 2. w publikacji C. Podobnie jak w przypadku pilotażowej metody stacjonarnej, zaobserwowano niepełne uwolnienie wolnego CLT z postaci leku. W przeciwieństwie do metody stacjonarnej z mieszadłem magnetycznym uzyskano znacząco mniejsze odchylenie standardowe. W tej metodzie seria S8:2-CLT osiągnęła maksymalne stężenie odpowiadające średniemu uwolnieniu około 15% dawki CLT w ciągu 5 godz. Znacząco niższy wynik - średnia około 7,5% -

odnotowano w przypadku 1% wodnej zawiesiny. W przypadku komercyjnego produktu referencyjnego MycoHydralin zaobserwowano zbliżony wynik taki, jak w pilotażowej metodzie stacjonarnej (średnia około 5%). Między obserwowanymi profilami odnotowano istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu - metoda przepływowa z pompą strzykawkową

Wyniki analizy profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w czasie, uzyskane w metodzie przepływowej z zastosowaniem pompy strzykawkowej, zostały przedstawione na ryc. 4. w publikacji C. W trakcie badania stwierdzono niepełne uwolnienie API. Zaobserwowano nieznaczne odchylenie standardowe. W metodzie tej, najbardziej zbliżonej do warunków fizjologicznych pod względem objętości medium - 18 mL wewnątrz celki i przepływie 2 mL/godz., formułacja S8:2-CLT osiągnęła wyższy od kremu i 1% zawiesiny z CLT stopień wolnej frakcji CLT na poziomie 5% dawki API w ciągu 5 godz. Dla zawiesiny i kremu MycoHydralin zaobserwowano niższe ilości uwolnionej wolnej frakcji leku na poziomie 2,5% dawki w czasie 5 godz. Jednakże, obserwowane różnice okazały się być nieistotne statystycznie ( $p = 0,29$ ).

## 5. Dyskusja i podsumowanie

Przeprowadzony przegląd literaturowy w publikacji A stanowił istotny wkład w wyznaczenie wymagań dotyczących właściwości dopochwowej postaci leku, jak również wskazał na konieczność opracowania i usystematyzowania sposobów oceny dopochwowych postaci leku na bazie emulsyjnej, dla których brakuje wymagań w Farmakopei Europejskiej. Pierwszym istotnym elementem jest bardzo częsty brak oceny potencjału drażniącego emulsji na błonę śluzową pochwy związanego z osmolalnością formułacji i odczynem pH. Kolejnym istotnym aspektem jest brak usystematyzowanych metod badania dostępności farmaceutycznej substancji czynnej z tej postaci leku. Wśród zebranych doniesień naukowych dominowały metody dla doustnych postaci leku (aparaty koszyczkowy i łopatkowy), których objętość stosowanego medium akceptorowego jest 250–500-krotnie wyższa od fizjologicznej objętości wydzieliny pochwowej. Świadczy to o konieczności równoległego rozwijania nie tylko dopochwowej postaci leku na bazie emulsyjnej, ale również metod jej oceny.

W publikacji A przedstawiono również najczęstsze schorzenia dotyczące żeńskiego układu rozrodczego, wśród których bezsprzecznie dominują infekcje o etiologii grzybiczej wywołane przez drożdżaki *Candida spp.*

W publikacji **B** podjęto próbę sporządzenia formułacji, która stanowiłaby nośnik dla modelowego leku – klotrimazolu i spełniałaby wymagania przedstawione w publikacji **A**, tj. a) wielkość kropli fazy olejowej  $< 90$  nm, aby przeciwdziałać procesom starzenia emulsji i jednocześnie zapewnić jej zwiększoną retencję w obrębie błony śluzowej; b) wartość bezwzględna potencjału zeta  $\leq \pm 20$  mV celem zapewnienia relatywnej stabilności układu; c) indeksu polidispersyjności, PDI  $< 0,3$ , aby zapewnić homogenność układu; d) pH w zakresie fizjologicznym 3,5–4,5; oraz e) osmolalność  $< 1200$  mOsm/kg zmniejszając ryzyko potencjalnego działania drażniącego na błonę śluzową pochwy [15,21,29–31].

Do wytworzenia formułacji wybrany został olej rzepakowy z uwagi na jego korzystne właściwości zmniejszające stan zapalny, który często towarzyszy infekcjom grzybiczym pochwy, oraz działanie przyspieszające regenerację tkanek, wynikające z zawartości kwasów omega 3-6-9 [32–35]. Dodatkowo, olej rzepakowy jest surowcem powszechnie dostępnym, odpornym na wysoką temperaturę często towarzyszącą procesom przemysłowym i nie wpływającym na zwiększenie zużycia maszyn w przeciwieństwie do oleju lnianego. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że optymalnym surfaktantem jest poloksamer 188, który w przeciwieństwie do poloksameru 407 (Pluronic F-67) ma wyższą temperaturę żelowania nie powodując zmian w strukturze formułacji podczas homogenizacji wysokociśnieniowej [36]. Jako kosurfaktant wykorzystano Span 80, zaś pozostałe substancje pomocnicze stanowiły kwas mlekowy (dostosowanie pH) i PEG 200 (poprawa rozpuszczalności substancji czynnej). W procesie technologicznym wykorzystano homogenizację szybkoobrotową celem dokładnego wymieszania składników i wstępnego zmniejszenia kropli fazy olejowej. Proces homogenizacji wysokociśnieniowej miał na celu dalsze rozbitcie kropli na mniejsze i ujednoczenie ich wielkości. Ponadto, proces ten dostarczał do układu energii kinetycznej poprawiając stabilność emulsji. Jednakże, przekroczenie ciśnienia krytycznego  $1300 \pm 100$  bar powodowało utratę części substancji czynnej [37].

Uzyskane formułacje spełniły kryteria w zakresie wielkości kropli oleju, współczynnika polidispersyjności, pH i osmolalności. Warto odnotować, iż formułacja S8:2 znacząco odbiegała od pozostałych pod względem kształtu objętościowego rozkładu wielkości kropli fazy olejowej. Węższa podstawa wykresu objętościowego rozkładu wielkości kropeł, przesunięta w kierunku kropeł o mniejszej średnicy wynika z uzyskania odpowiedniego stosunku surfaktantu do kosurfaktantu, które przyczyniły się do

zmniejszenia napięcia międzyfazowego i zwiększenia elastyczności warstwy surfaktantu, co skutkowało uzyskaniem układu o wyższej entropii [38]. CLT jako słaba zasada wykazała zdolność do wpływania na wartość potencjału zeta i stabilizowania nanoemulsji, zostało to również zaobserwowane w pracy Borhade et al. [39]. Wynika to z faktu, że CLT jako pochodna imidazolu posiada zdolność do akceptowania protonów wodorowych przechodząc w postać zjonizowaną i zwiększając swoją rozpuszczalność. Wskazywać to może na lokalizację cząstek CLT w obrębie granicy faz lipofilowej i hydrofilowej uzyskanych nanoemulsji.

Kwas mlekowy, PEG 200, poloksamer 188 i CLT zostały zidentyfikowane jako substancje osmotycznie czynne [40–43]. Stężenia CLT kwasu mlekowego i PEG-u 200 pozostawały niezmiennie dla wszystkich serii, jedynie ilość poloksameru ulegała zmianom co znalazło odzwierciedlenie w osmolalności formułacji. Nanoemulsja S9:1-CLT miała jednocześnie największą zawartość poloksameru i najwyższą zmierzoną osmolalność, zaś S7:3-CLT przeciwnie, dlatego ten surfaktant został zidentyfikowany jako główny czynnik wpływający na osmolalność formułacji. Dane literaturowe potwierdzają bezpieczeństwo stosowania poloksameru w wysokich stężeniach przekraczających nawet 20%, podobnie jak w przypadku Spanu 80, dla którego nie obserwowano właściwości drażniących dla stężenia > 40% [36,44].

Pomimo wartości potencjału zeta oscylujących przy dolnej granicy akceptowalnego poziomu +20 mV, nanoemulsje w testach stabilności zachowały dostateczną stabilność z wyjątkiem serii S7:3-CLT, gdzie zaobserwowano podział ładunku na wartości dodatnie i ujemne, co wpłynie będzie na przyspieszenie procesów flokulacji, koalescencji i w konsekwencji rozdzielenia się faz [22,23,45,46].

Pilotażowe badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT w funkcji czasu zostało przeprowadzone celem oceny dostępności farmaceutycznej CLT z uzyskanej nanoemulsji. Zastosowanie błony półprzepuszczalnej miało na celu oddzielenie formułacji od medium akceptorowego. Formułacje na bazie nanoemulsji (S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT) cechowały się wysokimi odchyleniami standardowymi, które nie były obserwowane na tak wysokim poziomie w przypadku kremu i zawiesiny. Otrzymane nanoemulsje wykazały stosunkowo wysoką, ale akceptowalną osmolalność, co spowodowało powstanie ciśnienia osmotycznego między nanoemulsją znajdującą się wewnątrz worków dializacyjnych a medium akceptorowym na zewnątrz. Skutkowało to napływem buforu fosforanowego do formułacji. Podobne obserwacje dotyczące wpływu ciśnienia osmotycznego zostały opisane w publikacjach dotyczących koloidów lub nanomateriałów umieszczonych

wewnątrz worków dializacyjnych [47–49]. W pilotażowej metodzie stacjonarnej z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego nie uzyskano warunków dyskryminujących a różnice obserwowane pomiędzy formułacjami S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT oraz zawiesiną CLT nie wykazywały różnic istotnych statystycznie. Średnie wartości wolnej frakcji CLT uzyskanej w czasie 5 godz. sięgały poziomu 20–30% dawki leku. Krem MycoHydralin osiągnął istotny statystycznie niższy wynik ( $p < 0,05$ ) – około 5% dawki leku w badanym czasie. Należy jednak uwzględnić fakt, że penetracja kremu przez medium jest znacznie utrudniona.

W publikacji **B** przedstawiono dodatkowo wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu stosując metodę przepływową z wykorzystaniem aparatu przepływowego (USP IV). Powodem zastosowania tej metody była ocena zachowania się formułacji w warunkach ciągłego wymywania substancji czynnej przez medium akceptorowe, symulujących wymywanie formułacji przez wydzielinę pochwową. Zastosowano układ otwarty przedstawiony na ryc. 2 w publikacji **B**. W tej metodzie sumaryczna objętość medium akceptorowego przepływająca przez celkę wynosiła 600 mL. Ciągły przepływ świeżego medium w znacznym nadmiarze miał na celu ułatwić rozpuszczalność CLT. Uzyskano jednak wyniki o około 2,5 razy niższe niż w przypadku metody z użyciem mieszadła magnetycznego dla formułacji S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT oraz 1% zawiesiny z CLT. Obserwowane różnice były istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). W przypadku kremu MycoHydralin, również zaobserwowano spadek kumulatywnych ilości wolnej frakcji CLT, jednak w porównaniu z metodą stacjonarną różnice nie były istotne statystycznie ( $p = 0,10$ ). Obserwowane różnice między metodami wynikają z obecności i właściwości surfaktantów obecnych w nanoemulsjach. CLT jako substancja lipofilowa ( $\log P = 6,1$ ) wykazuje większą rozpuszczalność w Spanie 80 niż w poloksamerze. Jednocześnie, Span 80 jest mniej mieszalny z wodą. Ciągły przepływ świeżego medium wpływa na wymywanie kosurfaktantu i jego niższe stężenie w medium po zewnętrznej stronie membrany, utrudniając penetrację CLT przez membranę. Poloksamer 188, jako hydrofilowy surfaktant, jest w stanie szybciej dyfundować do medium akceptorowego zwiększając rozpuszczalność CLT w porównaniu z buforem fosforanowym bez dodatku środków powierzchniowo czynnych. Jednak poloksamer nie jest w stanie wpłynąć na zwiększenie rozpuszczalności CLT w takim stopniu jak Span 80. W rezultacie, w metodzie stacjonarnej z mieszadłem magnetycznym zaobserwowano wyższe kumulowane ilości wolnej frakcji CLT niż w przypadku metody przepływowej. Potwierdzeniem powyższej hipotezy jest fakt uzyskania najwyższego stężenia CLT

w metodzie przepływowej przez formułację S9:1-CLT, zaś w metodzie stacjonarnej najniższego wyniku spośród badanych nanoemulsji. W metodzie stacjonarnej, w której Span 80 nie był wymywany z układu, najwyższe kumulowane ilości wolnej frakcji CLT osiągnęła formułacja o najwyższej zawartości Spanu 80 – S7:3-CLT. Potwierdzenie tej hipotezy wymagało jednak prowadzenia dalszych badań w bardziej dyskryminujących warunkach z użyciem metod charakteryzujących się wyższą precyzją (niższe SD), aby potwierdzić silny wpływ surfaktantów obecnych w formułacji na różnice w kinetyce uwalniania wolnego CLT. Innym czynnikiem, który mógł mieć wpływ na ten parametr, jest ciśnienie osmotyczne, jednak w obu eksperymentach zaobserwowano zbliżone pęcznienie worka dializacyjnego.

Na tym etapie wybrano nanoemulsję S8:2-CLT jako optymalną do dalszych badań z uwagi na najmniejszą zmienność potencjału zeta dla formułacji z lekiem i próby ślepej. Dodatkowo zaobserwowano wzrost stężenia wolnej frakcji CLT zauważalnie szybciej niż w przypadku pozostałych formułacji.

Celem prac przedstawionych w publikacji C było opracowanie metody do oceny kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu. Na podstawie wyników z publikacji B do badań wykorzystano nanoemulsję S8:2-CLT i formułacje referencyjne: 1% wodną zawiesinę CLT i komercyjny krem MycoHydralin. W tym celu zastosowano dodatkowe dwie metody – jedną symulującą warunki stacjonarne z wykorzystaniem aparatu typu USP III i drugą, która miała odzwierciedlać warunki fizjologiczne, uwzględniając wykorzystanie celki przepływowej i pompy strzykawkowej. Pierwsza metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego cechowała się wysokim rozrzutem wyników, który wynikał ze stresu mechanicznego, jakiemu poddane zostały worki dializacyjne doprowadzając do mikrouszkodzeń w strukturze membrany dializacyjnej wskutek ciśnienia osmotycznego, powodującego napływ medium do formułacji oraz obracającego się mieszadła magnetycznego, które podczas losowego kontaktu z membraną wywierało na nią nacisk. W odpowiedzi na ten problem zastosowano metodę z wykorzystaniem aparatu z ruchomym cylindrem, którego sposób mieszania wywiera mniejszy stres mechaniczny niż uderzenie mieszadła magnetycznego. Uzyskano wyniki o większej precyzji niż w przypadku pilotażowej metody i wykazano istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ) – formułacja S8:2-CLT osiągnęła około 15% dawki leku, zawiesina około 7,5%, zaś krem MycoHydralin około 5%. Zmierzone wartości są w przybliżeniu niższe o 1/3 w porównaniu do pilotażowej metody, co może wynikać z dwóch potencjalnych czynników – zmniejszenia objętości buforu fosforanowego z 300

mL do 200 mL lub ilości surfaktantów pochodzących z formułacji, których teoretyczne stężenie maksymalne w medium akceptorowym byłoby niższe o około 1/3. Zwiększenie ilości formułacji ponad 2 mL uniemożliwiła konstrukcja ruchomego cylindra z uwagi na konieczność zaginania worka dializacyjnego, co miało wpływ na dyfuzję leku przez błonę.

W publikacji C przedstawiono również metodę, która stanowiła połączenie metody stacjonarnej i wolnej wymiany medium w małej objętości celem symulacji warunków zbliżonych do fizjologicznych. Zastosowano przepływ 2 mL/godz. z wykorzystaniem pompy strzykawkowej umożliwiającą pobór próbek co 1 godz. Jednocześnie zredukowano też objętość medium pozostającego w kontakcie z badanymi próbkami do 18 mL. Łącznie, początkowa objętość medium i wymieniona w trakcie przepływu stanowiła tylko 14-krotność fizjologicznej objętości wydzieliny pochwowej w porównaniu do innych metod, w których stosowano 100-krotność (aparat z ruchomym cylindrem), czy nawet 500-krotność (aparat koszyczkowy i łopatkowy) objętości. W obserwowanym czasie kumulowana ilość wolnej frakcji CLT wyniosła około 5% dla nanoemulsji S8:2-CLT, co było wartością 2-krotnie większą niż obserwowana dla zawiesiny i kremu MycoHydralin. Tak niskie wartości powodują trudności w ocenie metody z uwagi na brak istotnych statystycznie różnic ( $p = 0,29$ ). Wydłużenie czasu trwania eksperymentu lub zwiększenie częstotliwości próbkowania mogłoby ułatwić uzyskanie warunków dyskryminujących, jednak wiązałoby się ze zwiększeniem sumarycznej ilości medium akceptorowego.

W publikacji C na ryc. 5 przedstawiono porównanie wyników dla poszczególnych formułacji w zależności od zastosowanej metody. Dla nanoemulsji wyraźnie widoczny jest wpływ zastosowanej metody na uzyskane wyniki ( $p < 0,05$ ). W przypadku zawiesiny zaobserwowano istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ), jednak wyniki uzyskane za pomocą metod z aparatem przepływowym i aparatu z ruchomym koszyczkiem były porównywalne. Kumulowane ilości wolnej frakcji CLT dla kremu MycoHydralin były zbliżone, jednak różnice były istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Podsumowując, wybór metody badania dostępności farmaceutycznej ma kluczowe znaczenie dla uzyskanych wyników.

## 6. Wnioski

Opracowanie bezpiecznych i skutecznych wielokompartamentowych dopochwowych formułacji leków na bazie emulsji powinno uwzględniać anatomie

i fizjologię pochwy. Na podstawie analizy bibliograficznej można stwierdzić, że dopochwowe postaci na bazie emulsji są obiecującymi nośnikami leków do miejscowego i ogólnoustrojowego stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych.

Otrzymane w ramach niniejszej dysertacji nanoemulsje zostały sporządzone przy użyciu metod umożliwiających transfer technologii na skalę przemysłową. Uzyskano nanoemulsje cechujące się korzystnymi wartościami w zakresie średniego rozmiaru kropli, jednorodności, fizjologicznego pH, osmolalności i akceptowalnej stabilności. Pomimo znacznych podobieństw wśród otrzymanych nanoemulsji, najbardziej obiecujące właściwości wykazała seria S8: 2-CLT, którą wybrano do dalszych badań.

Istotny jest brak zaleceń dotyczących badania dostępności farmaceutycznej substancji czynnych z dopochwowych postaci leku na bazie emulsyjnej. Wybór metody ma istotny wpływ na uzyskane wyniki badania, dlatego kluczowe znaczenie ma opracowanie ujednoliconego protokołu testowania dostępności farmaceutycznej leku, który zapewni dyskryminujące wyniki i będzie symulował warunki fizjologiczne, pozwalając jednocześnie na porównanie formułacji. Najbardziej dyskryminujące warunki zapewniła metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu z ruchomym cylindrem. Dodatkowo, metoda ta spełnia kryteria do zastosowania w przemyśle z uwagi na wykorzystanie standaryzowanej aparatury.

Uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań nanoemulsje zapewniają większą dostępność farmaceutyczną CLT w porównaniu do klasycznych postaci leku – zawiesiny i kremu, jednak wymagane są dalsze badania nad opracowaniem końcowej postaci dawkowania o właściwościach mukoadhezyjnych w celu wydłużenia czasu retencji w pochwie.

## 7. Piśmiennictwo

1. Brannon-Peppas, L. Novel Vaginal Drug Release Applications. *Adv Drug Deliv Rev* **1993**, *11*, 169–177, doi:10.1016/0169-409X(93)90031-X.
2. Lirio, J.; Giraldo, P.C.; Amaral, R.L.; Sarmiento, A.C.A.; Costa, A.P.F.; Goncalves, A.K. Antifungal (Oral and Vaginal) Therapy for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review Protocol. *BMJ Open* **2019**, *9*, doi:10.1136/bmjopen-2018-027489.



3. Frej-Mądrzak, M.; Golec, S.; Włodarczyk, K.; Choroszy-Król, I.; Nawrot, U. Susceptibility to Clotrimazole of *Candida* Spp. Isolated from the Genitourinary System—a Single Center Study. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–12, doi:10.3390/pathogens10091142.
4. Loveless, M.; Myint, O. Vulvovaginitis- Presentation of More Common Problems in Pediatric and Adolescent Gynecology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2018**, *48*, 14–27, doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.014.
5. Mtibaa, L.; Fakhfakh, N.; Kallel, A.; Belhadj, S.; Belhaj Salah, N.; Bada, N.; Kallel, K. Les Candidoses Vulvovaginales : Étiologies, Symptômes et Facteurs de Risque. *J Mycol Med* **2017**, *27*, 153–158, doi:10.1016/j.mycmed.2017.01.003.
6. Ishiwada, N.; Kitajima, H.; Morioka, I.; Takeuchi, N.; Endo, M.; Watanabe, A.; Kamei, K. Nationwide Survey of Neonatal Invasive Fungal Infection in Japan. *Med Mycol* **2018**, *56*, 679–686, doi:10.1093/mmy/myx096.
7. Kendirci, M.; Koç, A.N.; Kurtoglu, S.; Keskin, M.; Kuyucu, T. Vulvovaginal Candidiasis in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **2004**, *17*, 1545–1549, doi:10.1515/jpem.2004.17.11.1545.
8. Denning, D.W.; Kneale, M.; Sobel, J.D.; Rautemaa-Richardson, R. Global Burden of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review. *Lancet Infect Dis* **2018**, *18*, e339–e347, doi:10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
9. Foxman, B.; Muraglia, R.; Dietz, J.P.; Sobel, J.D.; Wagner, J. Prevalence of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis in 5 European Countries and the United States: Results from an Internet Panel Survey. *J Low Genit Tract Dis* **2013**, *17*, 340–345, doi:10.1097/LGT.0b013e318273e8cf.
10. Caramella, C.M.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M.C.; Sandri, G. Mucoadhesive and Thermogelling Systems for Vaginal Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *92*, 39–52, doi:10.1016/j.addr.2015.02.001.
11. Mallipeddi, R.; Rohan, L.C. Nanoparticle-Based Vaginal Drug Delivery Systems for HIV Prevention. *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, *7*, 37–48, doi:10.1517/17425240903338055.
12. das Neves, J.; Bahia, M.F. Gels as Vaginal Drug Delivery Systems. *Int J Pharm* **2006**, *318*, 1–14, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.03.012.

13. Machado, R.M.; Palmeira-De-Oliveira, A.; Martinez-De-Oliveira, J.; Palmeira-De-Oliveira, R. Vaginal Films for Drug Delivery. *J Pharm Sci* **2013**, *102*, 2069–2081, doi:10.1002/jps.23577.
14. Srikrishna, S.; Cardozo, L. The Vagina as a Route for Drug Delivery: A Review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* **2013**, *24*, 537–543, doi:10.1007/s00192-012-2009-3.
15. Valea, F.A. Reproductive Anatomy Gross and Microscopic, Clinical Correlations. In *Comprehensive Gynecology*; Lobo, R.A., Gershenson, D.M., Lentz, G.M., Valea, F.A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, 2017; pp. 48–77 ISBN 978-0-323-32287-4.
16. D’Amati, G.; di Gioia, C.R.; Proietti Pannunzi, L.; Pistilli, D.; Carosa, E.; Lenzi, A.; Jannini, E.A. Functional Anatomy of the Human Vagina. *J Endocrinol Invest* **2003**, *26*, 92–96.
17. Bhesania, A.H.; Narayankhedkar, A. Vulvovaginal Candidosis. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **2017**, *6*, 240–250, doi:10.20546/ijemas.2017.601.029.
18. Barnes, K.N.; Yancey, A.M.; Forinash, A.B. Ibrexafungerp in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Annals of Pharmacotherapy* **2023**, *57*, 99–106, doi:10.1177/10600280221091301.
19. Nyirjesy, P.; Brookhart, C.; Lazenby, G.; Schwebke, J.; Sobel, J.D. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clinical Infectious Diseases* **2022**, *74*, S162–S168, doi:10.1093/cid/ciab1057.
20. Smoleński, M.; Muschert, S.; Haznar-Garbacz, D.; Małolepsza-Jarmołowska, K. Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1437, doi:10.3390/pharmaceutics15051437.
21. McClements, D.J. Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729, doi:10.1039/c2sm06903b.
22. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841, doi:10.1039/c5sm02958a.
23. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-Emulsions and Micro-Emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res* **2011**, *28*, 978–985, doi:10.1007/s11095-010-0309-1.

24. Wik, J.; Bansal, K.K.; Assmuth, T.; Rosling, A.; Rosenholm, J.M. Facile Methodology of Nanoemulsion Preparation Using Oily Polymer for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Drug Deliv Transl Res* **2020**, *10*, 1228–1240, doi:10.1007/s13346-019-00703-5.
25. <711> *Dissolution Test USP 28, 2nd Supplement, Official 1 August 2005*;
26. 2.9.3 (01/2016:20903). In *Farmakopea Polska XII*; 2020.
27. Bruning, E.; Chen, Y.; McCue, K.A.; Rubino, J.R.; Wilkinson, J.E.; Brown, A.D.G. A 28 Day Clinical Assessment of a Lactic Acid-Containing Antimicrobial Intimate Gel Wash Formulation on Skin Tolerance and Impact on the Vulvar Microbiome. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–21, doi:10.3390/antibiotics9020055.
28. Neves, J. das; Palmeira-de-Oliveira, R.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Rodrigues, F.; Sarmiento, B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. In *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*; Khutoryanskiy, V. V., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, United Kingdom, 2014; Vol. 9781119941, pp. 99–132 ISBN 9781118794203.
29. WHO/UNFPA/FHI *Advisory Note Use and Procurement of Additional Lubricants for Male and Female Condoms : WHO / UNFPA / FHI360 Advisory Note*; 2011;
30. Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351, doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
31. Lai, S.K.; O’Hanlon, D.E.; Harrold, S.; Man, S.T.; Wang, Y.-Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 1482–1487, doi:10.1073/pnas.0608611104.
32. Skowron, M.; Zalejska-Fiolka, J.; Błaszczyk, U.; Birkner, E. Pro-Health Properties of Rapeseed and Olive Oil. *Postepy Hig Med Dosw* **2018**, *72*, 1104–1113, doi:10.5604/01.3001.0012.8175.
33. Paik, B.; Tong, L. Topical Omega-3 Fatty Acids Eyedrops in the Treatment of Dry Eye and Ocular Surface Disease: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 13156, doi:10.3390/ijms232113156.
34. Ishak, W.M.W.; Katas, H.; Yuen, N.P.; Abdullah, M.A.; Zulfakar, M.H. Topical Application of Omega-3-, Omega-6-, and Omega-9-Rich Oil Emulsions for Cutaneous Wound Healing in Rats. *Drug Deliv Transl Res* **2019**, *9*, 418–433, doi:10.1007/s13346-018-0522-8.

35. Fu, Y. Marine N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Diseases. *Advances in Dietary Lipids and Human Health* **2022**, *56*, 225–242, doi:10.1016/B978-0-12-823914-8.00001-X.
36. Zhang, S.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Guo, T.; Hou, X.; He, Z.; He, Z.; Shen, L.; Feng, N. Temperature-Sensitive Gel-Loaded Composite Nanomedicines for the Treatment of Cervical Cancer by Vaginal Delivery. *Int J Pharm* **2020**, *586*, 119616, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119616.
37. Najlah, M.; Suliman, A.S.; Tolaymat, I.; Kurusamy, S.; Kannappan, V.; Elhissi, A.M.A.; Wang, W. Development of Injectable PEGylated Liposome Encapsulating Disulfiram for Colorectal Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 1–16, doi:10.3390/pharmaceutics11110610.
38. Zeng, L.; Xin, X.; Zhang, Y. Development and Characterization of Promising Cremophor EL-Stabilized o/w Nanoemulsions Containing Short-Chain Alcohols as a Cosurfactant. *RSC Adv* **2017**, *7*, 19815–19827, doi:10.1039/C6RA27096D.
39. Borhade, V.; Pathak, S.; Sharma, S.; Patravale, V. Clotrimazole Nanoemulsion for Malaria Chemotherapy. Part I: Preformulation Studies, Formulation Design and Physicochemical Evaluation. *Int J Pharm* **2012**, *431*, 138–148, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.040.
40. Zhao, M.; Thuret, G.; Piselli, S.; Pipparelli, A.; Acquart, S.; Peoc'h, M.; Dumollard, J.-M.; Gain, P. Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2008**, *49*, 550, doi:10.1167/iovs.07-1037.
41. Pham Le Khanh, H.; Nemes, D.; Rusznyák, Á.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives. *Polymers (Basel)* **2022**, *14*, 279, doi:10.3390/polym14020279.
42. Arbelaez-Camargo, D.; Roig-Carreras, M.; García-Montoya, E.; Pérez-Lozano, P.; Miñarro-Carmona, M.; Ticó-Grau, J.R.; Suñé-Negre, J.M. Osmolality Predictive Models of Different Polymers as Tools in Parenteral and Ophthalmic Formulation Development. *Int J Pharm* **2018**, *543*, 190–200, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.03.052.
43. Tian, X.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S. L-Lactic Acid Production Benefits from Reduction of Environmental Osmotic Stress through Neutralizing Agent Combination. *Bioprocess Biosyst Eng* **2014**, *37*, 1917–1923, doi:10.1007/s00449-014-1166-9.

44. Minamisakamoto, T.; Nishiguchi, S.; Hashimoto, K.; Ogawara, K.; Maruyama, M.; Higaki, K. Sequential Administration of PEG-Span 80 Niosome Enhances Anti-Tumor Effect of Doxorubicin-Containing PEG Liposome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2021**, *169*, 20–28, doi:10.1016/j.ejpb.2021.08.013.
45. Sanfeld, A.; Steinchen, A. Emulsions Stability, from Dilute to Dense Emulsions — Role of Drops Deformation. *Adv Colloid Interface Sci* **2008**, *140*, 1–65, doi:10.1016/j.cis.2007.12.005.
46. Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. Nano-Emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2005**, *10*, 102–110, doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004.
47. Robbes, A.S.; Cousin, F.; Mériquet, G. Osmotic Stress on Concentrated Colloidal Suspensions: A Path towards Equilibrium? *Brazilian Journal of Physics* **2009**, *39*, doi:10.1590/S0103-97332009000200006.
48. Briones, E.; Colino, C.I.; Lanao, J.M. Study of the Factors Influencing the Encapsulation of Zidovudine in Rat Erythrocytes. *Int J Pharm* **2010**, *401*, 41–46, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.006.
49. Liao, J.; Pham, K.A.; Breedveld, V. Dewatering Cellulose Nanomaterial Suspensions and Preparing Concentrated Polymer Composite Gels via Reverse Dialysis. *ACS Sustain Chem Eng* **2021**, *9*, 9671–9679, doi:10.1021/acssuschemeng.1c01169.

## ZAŁĄCZNIKI

### I. Publikacja A

**Smoleński Michał**, Karolewicz Bożena, Gołkowska Anna M., Nartowski Karol P., Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna\*: *Emulsion-based multicompartment vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 12, art.6455 [39 s.], DOI:10.3390/ijms22126455



Review

# Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels

Michał Smoleński , Bożena Karolewicz , Anna M. Gołkowska , Karol P. Nartowski   
and Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska \*

Department of Drug Form Technology, Wrocław Medical University, Borowska 211 A, 50-556 Wrocław, Poland; michal.smolenski@student.umed.wroc.pl (M.S.); bozena.karolewicz@umed.wroc.pl (B.K.); anna.golkowska@student.umed.wroc.pl (A.M.G.); karol.nartowski@umed.wroc.pl (K.P.N.)

\* Correspondence: katarzyna.malolepsza-jarmolowska@umed.wroc.pl

**Abstract:** In order to overcome the limitations associated with vaginal administration of drugs, e.g., the short contact time of the drug form with the mucosa or continuous carrier wash-out, the development of new carriers for gynecological use is necessary. Furthermore, high individual anatomical and physiological variability resulting in unsatisfactory therapeutic efficacy of lipophilic active substances requires application of multicompartment drug delivery systems. This manuscript provides an up-to-date comprehensive review of the literature on emulsion-based vaginal dosage forms (EVDF) including macroemulsions, microemulsions, nanoemulsions, multiple emulsions and self-emulsifying drug delivery systems. The first part of the paper discusses (i) the influence of anatomical-physiological conditions on therapeutic efficacy of drug forms after local and systemic administration, (ii) characterization of EVDF components and the manufacturing techniques of these dosage forms and (iii) methods used to evaluate the physicochemical and pharmaceutical properties of emulsion-based vaginal dosage forms. The second part of the paper presents (iv) the results of biological and in vivo studies as well as (v) clinical evaluation of EVDF safety and therapeutic efficacy across different indications.

**Keywords:** vaginal formulations; vaginal drug delivery; emulsion-based dosage forms; vaginal administration; drug carriers for gynecology



**Citation:** Smoleński, M.; Karolewicz, B.; Gołkowska, A.M.; Nartowski, K.P.; Małolepsza-Jarmołowska, K. Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6455. <https://doi.org/10.3390/ijms22126455>

Academic Editor: Axel T. Neffe

Received: 20 May 2021  
Accepted: 11 June 2021  
Published: 16 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The vaginal route of drug administration has been commonly used for many years in contraceptive delivery methods and the treatment of local vaginal infections in the form of vaginal solutions, ointments, pessaries, rings, suppositories and tablets [1]. However, in order to overcome limitations related to intravaginal drug administration, i.e., short contact time with mucosa, constant washing-out by vaginal discharge, low volume of vaginal discharge and high individual anatomical and physiological variability, there is a need for novel gynecological formulations development, such as hydrogels, films, micro- and nanoemulsions or nanoparticles-based drug delivery systems [2–10]. The vaginal route as a potential way for systemic drug delivery has also been considered [11]. Nonetheless, there are several limitations affecting drug bioavailability after intravaginal application related to physiological factors of female genitals and physicochemical properties of the drug itself [11]. The drug absorption process from the vaginal lumen has two main steps—drug dissolution in the vaginal discharges and the mucosa drug penetration stage [12]. The ideal vaginal product should be water soluble, able to penetrate biological membranes and be resistant to washing out. As a result, most technological studies are focused on the development of easy to administer, highly mucoadhesive formulations [3,10,13]. Emulsions, as multi-compartment preparations, in contrast to conventional hydrophilic formulations, allow the simultaneous vaginal application of hydrophilic and lipophilic substances, reducing the risk of pharmaceutical incompatibilities. Furthermore, emulsion-based vaginal

dosage forms (EVDF) in comparison to hydrophilic carriers exhibit favorable formulation properties for vaginal administration, i.e., increased retention time at the application site and controlled penetration of active substances through the vaginal mucosa [2,3,5,6,10].

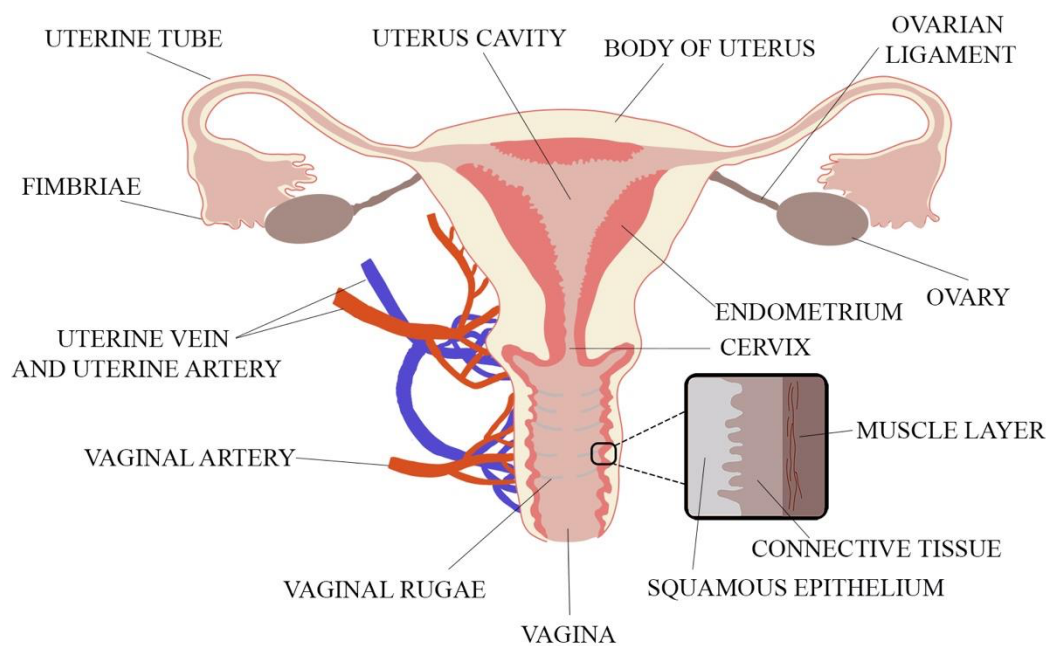
This review aims at providing the readers with a comprehensive analysis of the composition, manufacturing methods and evaluation methodology of emulsion-based vaginal dosage forms as well as the therapeutic effects achieved after administration of these formulations. For this purpose, Scopus and Web of Science databases were searched, using the intravaginal, vaginal, gynecological, emulsion, microemulsion, nanoemulsion, multiple emulsion, SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery Systems), \*vagin\* and \*emuls\* keywords and limiting the period time from 2000 to 2020. Examples of EVDF have already been briefly discussed in the context of mucoadhesion and vaginal formulations, however, to the best of our knowledge, this is the first review which provides the current status of multicompartiment emulsion-based vaginal dosage forms, enabling this group of colloidal formulations to stand out from other available topical formulations [3,4,10,14,15].

## 2. The Anatomical and Physiological Aspects Intravaginal Drug Application

### 2.1. Vaginal Anatomy

When designing a novel vaginal drug form, anatomical and physiological aspects must be considered. These include the properties of the vaginal environment (e.g., pH, volume of vaginal discharge or the presence of microorganisms), its total inner surface, the vaginal vascularization and mucus structure. The vagina is a part of the female internal genitalia, located in the pelvis minor and described as an extensible, collapsible, fibromuscular, curved tube connecting the uterus (cervix) with the vulval vestibule [16,17]. The vagina is attached at its upper end to the uterus above the cervix. The spaces between the vagina and the cervix called fornices consist of anterior, lateral and posterior parts [18]. The vagina is 6–12 cm long and 2.1–5.0 cm wide. As the posterior vaginal wall is attached to the uterus higher than the anterior wall, the length of the posterior part is 8–12 cm and the length of the anterior part is 6–9 cm. Vaginal length is age-dependent and shortens by ca. 0.08 cm per 10 years with menopause enhancing this process [18,19]. Vaginal walls are in apposition so that in the cross-section vaginal lumen is centrally flattened and broadens towards the ends, and thus, the cross-section of vagina reminds the shape of letter H [19]. The H-shaped cross-section of the vagina comes from central flattening of the vaginal lumen with broadening towards the ends. The thin vaginal wall consists of three layers. The inner layer is the vaginal mucosa formed of nonkeratinized, squamous epithelium which is connected to the middle layer—lamina propria—composed of collagen and elastic tissue with significant vascular and lymphatic circulation surrounded by the smooth muscle coating. The third layer is the outer fibrous layer—tunica adventitia—which contains large plexus of blood vessels [1,18,19]. The anatomy of the female reproductive system is shown in Figure 1.





**Figure 1.** The vaginal anatomy with its wall structure (adapted from [18]).

### 2.2. Vascularization of the Vagina

The vagina has a vast anastomotic vascular system which is connected with the uterine artery, branch of the internal iliac artery or vesical or rectal venous plexuses. Extensive vascular networks from the middle and upper regions of the vagina are connected to inferior vena cava bypassing hepatic blood circulation which, in consequence, lowers the impact of hepatic metabolism (i.e., first pass effect) on the drug plasma concentration after intravaginal application [12,19]. On the other hand, vast connections of the vaginal vascular system with the uterus are responsible for the so-called first uterine pass effect (FUPE) and accumulation of the drug in the uterus. FUPE is well described for hormones, i.e., measured concentrations of progesterone are higher in endometrial tissues and lower in blood plasma after intravaginal administration in comparison to intramuscular injections [20]. The described phenomena may prove beneficial in the treatment of uterus cancer by reducing the risk of serious side effects related to high anticancer drug plasma concentrations after systemic application. On the other hand, uterus accumulation of narrow therapeutic index drugs (NTI-drugs), e.g., cytostatic agents administered in the adjuvant therapy of cancer, may have a toxic effect and lead to serious side effects [7,21]. The vaginal application could also be considered as a route of systemic drug administration due to rich vascularity of the vagina [11]. Wing et al. [22] studied intravaginal delivery of misoprostol and proved higher efficiency and fewer side effects in the induction of labour and ripening of cervix compared to oral administration.

### 2.3. Vagina Surface Area

The unique physiological environment prevailing inside the vagina and the vaginal surface properties determine intravaginal formulations requirements for spreadability, extensibility and extended contact time of the drug with the mucosa. The total vaginal inner surface area varies across individuals, wherein the volume of vaginal lumen limits the maximum applicable dose. Early measurements and estimations of vaginal surface area displayed large discrepancies (50 and 600 cm<sup>2</sup>) that are now narrowed to ca. 360 or 390 cm<sup>2</sup> depending on the measuring method [14]. Differences arise from the increase of vaginal mucosa surface in reproductive-aged women by the folds and microridges called the rugae which cover epithelial cell surface especially in the lower third of the vagina. The size of vaginal epithelium changes additionally during the menstrual cycle due to estrogen

sensitivity. In summary, the formulation contact surface area with vaginal mucosa depends on individual factors, e.g., age, stage of the menstrual cycle and depth of application into the vagina, due to the presence of folds in different parts of the organ [1,10,18,19].

#### 2.4. Vaginal Mucosa and Vaginal Discharge

Another factor influencing the drug absorption process after intravaginal application is the three-layer construction of the vaginal wall and the presence of an internal mucosa layer deprived of secretion glands. A thin layer of vaginal discharge (ca. 1–2 mL) on the surface of vaginal walls is constantly present providing the lubrication for the vagina. However, no exact data on ambient vaginal discharge volume is available. Mean production of vaginal secretions is ca. 1.5–2.0 mL per 8 h, up to 6.0 mL per day. The vaginal discharge volume is directly proportional to the estrogen level and inversely proportional to the progesterone level [23]. Furthermore, sexual stimulation enhances the production of vaginal discharge up to 2.8 mL per hour [24]. The discharge originates in the vaginal venous plexus, where it is secreted by the cervical and Bartholin glands through transduction, and is primarily composed of water, 1–2% of mucin and electrolytes including sodium ( $\text{Na}^+$ ) and potassium ( $\text{K}^+$ ) [14,18,19,24]. Mucin is one of the most abundant glycoproteins in the vaginal mucus layer and it is responsible for the gel-like mucus mesh properties formed from negatively charged mucin fibers. Average vaginal discharge pH is between 3.8 to 4.5, however other reports expand the normal pH value of vaginal discharge from 3.4 to 6.4, with an average pH at 4.7 [19]. The acidity of the vaginal environment is controlled by the constant secretion of lactic acid by *Lactobacillus* spp. bacteria [25]. Vaginal discharge pH may be affected by age, hormonal stimulation during menstruation, menopause, pregnancy, inflammations, composition of vaginal microbiota, presence of pathogenic microorganism and even ethnical origin and race [24,26–32]. The presence of vaginal discharge on the mucosal surface, including its quantity and pH, influences the drug dissolution as well as passive and active drug transport through the vaginal membrane [1,33]. Vaginal discharge pH level affects drug dissociation as pH regulates the ionization of active substances and, in consequence, has an impact on permeation of non-ionized drug through the vaginal mucosa [33]. Passive and active drug absorption processes from the vaginal lumen occur not only via transcellular and paracellular routes, but also by the means of vesicular and receptor-mediated transport [1,11,33]. In general, after vaginal application, lipophilic molecules are transported by the transcellular route, while hydrophilic substances are absorbed by paracellular diffusion. Low molecular weight lipophilic drug molecules undergo better absorption than the larger ones or hydrophilic compounds [33]. Constant secretion of the vaginal discharge and its high viscosity form a strong diffusional barrier for drug absorption [11]. In order to achieve high permeability crucial for systemic administration of a drug, low molecular weight lipophilic APIs (active pharmaceutical ingredients) should be encapsulated in water-based formulations due to hydrophilic vaginal environment and small ambient volume of vaginal discharge. Increased quantity of the discharge could enhance poorly water-soluble drugs absorption, on the other hand, the constant fluid secretion could cause the decrease of API bioavailability as a result of formulation wash-out.

#### 2.5. The Influence of Vaginal Microbiota

The vaginal microbiota controls the acidity of vaginal secretions through the lactic acid production [25]. The most abundant group of vaginal microbiota are the *Lactobacillaceae* spp. (28.1%), followed by *Bifidobacteriaceae* spp. (10.1%) and *Prevotellaceae* spp. [34]. *L. crispatus* and *L. iners* are the most commonly reported within *Lactobacillus* spp. in women of reproductive age, but *L. jensenii* and *L. gasseri* presence has also been described [35,36]. In most cases one or two of *Lactobacillus* species, rather than many different species, are isolated from the vagina of a particular patient [36]. The vaginal *lactobacilli* apart from acidification have the ability to produce hydrogen peroxide and bacteriocins which eradicate pathogenic microorganisms [37]. Composition of vaginal microbiota undergoes dynamic changes as a

consequence of ageing, pH changes, hormonal status, ethnicity, genetic background and exogenous factors, i.e., administered medicines, contraceptive method as well as sexual, behavioral and hygiene practices, diet or stress [38,39]. There are variances in the pregnant and non-pregnant women microbiota composition which can be used for early prediction of pre-term births [40–42]. Slight changes in microbiota composition were also observed in patients with deep endometriotic lesions [43].

### 3. Technological Aspects of Vaginal Formulations Development

Based on the anatomical and physiological aspects of the intravaginal drug administration route, the optimal intravaginal formulation should (a) enable the delivery of low molecular weight hydrophilic or lipophilic compounds as they have the highest absorption rates due to their transport mechanism; (b) be partially water-soluble due to the aqueous properties of the vaginal discharge; (c) be easy to administer; (d) have bioadhesive properties in order to prevent washing-out from the vaginal lumen [14,44]. Another influential property of an intravaginal drug formulation is its osmolarity. Based on WHO recommendations for lubricants [45], the intravaginal formulations should have pH of about 4.5, while their osmolarity should be below 1200 mOsm/kg and ideally not exceed 380 mOsm/kg. Machado et al. analyzed the osmolarity of market-available semi-solid formulations, i.e., creams and gels for intravaginal drug delivery with antifungal azoles, antibacterials and estrogens [46]. Authors concluded that hypotonic formulation  $< 260$  mOsmol/kg increase particles penetration through the mucus layers leading to improved and rapid drug absorption. These formulations are also considered safer for vaginal epithelium due to the reduction of time needed to obtain the effective drug concentration and therapeutic effect [46,47]. It has been reported that hyperosmolar vaginal dosage forms with microbicide could cause vaginal irritations, increase toxicity and infection susceptibility to, e.g., HSV-2 [47,48].

Size of drug carrier particles in the formulation also affects the penetration of APIs through the mucus layer [14,49]. Particles within the range of 200–500 nm penetrate cervicovaginal mucus in a more efficient way than particles sized around 100–150 nm. In turn, particles smaller than 100 nm enter pocket-like mucus mesh channels where they are immobilized. Larger particles with sizes ranging 200–500 nm are too big to enter the pocket-like channels, so they penetrate mucus mesh more rapidly [49–51]. Frey et al. and Ponchel et al. [52,53] found that particles greater than 1000 nm are not able to enter channels in the gastrointestinal mucus mesh. The studies on vaginal mucus mesh are limited, however structural similarities between different types of mucus have been shown, hence the possible application of these findings in relation to vaginal mucus mesh. Additionally, not only the size of drug vehicles matters but also the chemical composition of the vehicle surface [14]. Lipophilic drugs are immobilized in the mucus mesh due to the electrostatic and hydrophobic interactions between mucins fibers and lipophilic vehicles. The nature of this phenomenon was analyzed by Lai et al. and Wang et al. by anchoring hydrophilic and neutrally charged motifs on a hydrophobic polystyrene surface. In this case addition of hydrophilic polymers forms a “slippery surface” by the reduction of hydrophobic interactions between the hydrophilic PEG-coated particles and the hydrophobic mucin fibers, resulting in rapid penetration of the particles through the cervicovaginal mucus [49,54,55]. Ensign et al. also highlighted hydrophobic interactions as a barrier to nanocarriers [51].

The bioadhesion of a vaginal formulation to the vaginal mucus can be enhanced by the addition of positively charged polymers, e.g., N-trimethyl chitosan. This process takes advantage of electrostatic attraction between the negatively charged mucin and the positively charged polymer particles. Enhanced binding to the mucins results in an increased resistance to formulation wash-out after application [56,57]. The summary of optimal API and formulation properties is presented in Table 1.

**Table 1.** API and formulation properties imperative to vaginal drug delivery forms development [14,44–57].

Properties	
API	<ul style="list-style-type: none"> <li>• low molecular weight hydrophilic or lipophilic compounds</li> </ul>
Formulation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• water-soluble</li> <li>• bioadhesive</li> <li>• reduced hydrophobic interactions (details in Section 3)</li> <li>• increased viscosity or thermogelling properties</li> <li>• easy administration</li> <li>• pH <math>\approx</math> 4</li> <li>• osmolarity &lt; 1200 mOsm/kg, ideally &lt; 380 mOsm/kg</li> <li>• inner phase particle/droplets size in the range:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100–150 nm—formulations intended to act within the vaginal mucus</li> <li>○ 200–500 nm—formulations intended to penetrate through the mucus to the vaginal epithelium</li> <li>○ &gt;1000 nm—formulations intended to act on the surface of vaginal mucus</li> </ul> </li> </ul>

### 3.1. Emulsions–Based Vaginal Dosage Forms (EVDF)

In 1972 Everett defined O/W emulsion as disperse systems, where *the continuous phase is an aqueous solution (W)* in contrary to W/O, where a continuous phase is an oil or other organic liquid (O) [58]. Following the IUPAC Gold Book, an emulsion is defined as *a fluid colloidal system in which liquid droplets and/or liquid crystals are dispersed in a liquid* [59].

The addition of surfactants and cosurfactants ( $S_{mix}$ ) is required to obtain such colloidal systems. Emulsions are classified according to their droplet size (macro- vs. microemulsions) and composition of both continuous and inner phase (e.g., O/W or W/O). However, thermodynamic and kinetic stability needs to be considered while distinguishing between micro- and nano-emulsions [60–71]. Pre-emulsions, on the other hand, are defined as a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS), forming emulsion in situ after dilution with aqueous media [72]. The terms self-emulsifying drug delivery system (SEDDS), self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) or self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) might be questionable from a physical point of view as spontaneous formation of an emulsion is a characteristic of a microemulsion and low-energy emulsification might be misinterpreted as a self-emulsification process [67].

In this review we use ‘SEDDS’, ‘SMEDDS’ and ‘SNEDDS’ following the definition proposed by Pouton as pre-formulations of an isotropic mixture of oils and surfactants which form emulsions after contact with body fluids [72]. The classification and characteristics of emulsion-based dosage forms are presented in Table 2.

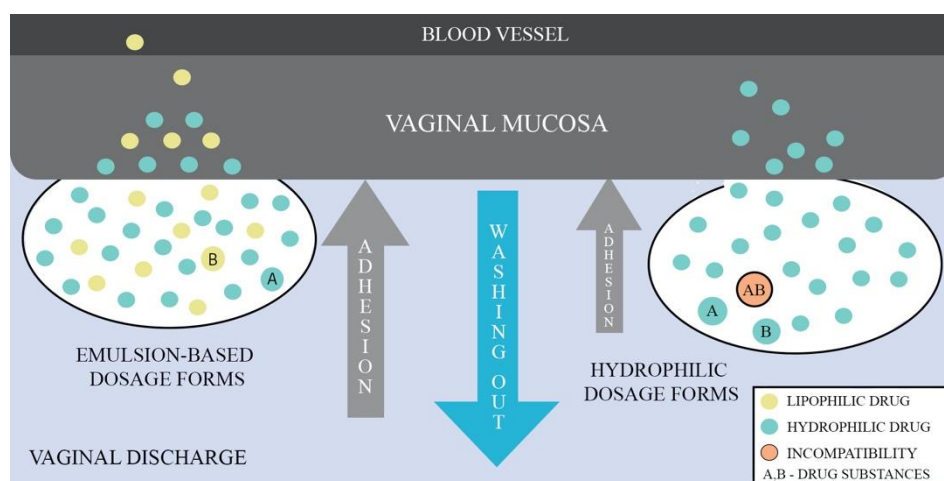
**Table 2.** Classification and characteristic of the emulsion-based dosage form [58–72].

Type of Formulation	Macroemulsion	Microemulsion	Nanoemulsion	Multiple Emulsion	SEDDS <sup>a</sup>
Appearance	Milky	Transparent	Translucent or transparent	Milky	Depending on the vehicle <sup>b</sup>
Droplet size	>500 nm	Typically < 1000 nm	<500 nm	>1000 nm	<100 nm
Droplet shape	Spherical	Spherical and non-spherical	Spherical	Multiple droplets	Spherical and non-spherical <sup>a</sup>
Polydispersity	Often high	Often low (single, narrow distribution peak)	Low or moderate (single or multiple distribution peaks)	Often high	Often low <sup>a</sup>
Stability	Thermodynamically and kinetically unstable	Thermodynamically stable	Kinetically stable	Often thermodynamically and kinetically unstable	-
Manufacturing methods	High and low-energy methods	Spontaneous formation	High and low-energy methods	Two-steps low-energy process	Spontaneous formation <sup>a</sup>

<sup>a</sup> This column covers properties of SMEDDS and SNEDDS listed in Section 3.1, data are given for formulations diluted with aqueous media;

<sup>b</sup> formulation properties before a dilution with aqueous media.

Given that emulsions consist of two phases, aqueous and oil, they have the ability to deliver lipophilic and hydrophilic APIs simultaneously. Depending on the type of emulsion, it is possible to obtain droplets size in the range of nano- to micro-meters enabling to control mucus barrier penetration. The drug membrane penetration can also be enhanced by the use of medium- and long-chained mono/triglycerides as the oil phase or an addition of nonionic surfactants and cosurfactants. Additionally, incorporation of API into the lipid phase has drug-protective properties against enzymatic components of mucus and fluids [73]. Figure 2 shows a comparison of the behavior between emulsion-based dosage forms and hydrophilic forms when administered vaginally, demonstrating the advantages of the emulsion-based dosage forms.

**Figure 2.** Comparison of vaginal emulsion-based and hydrophilic drug dosage forms.

### 3.2. The Technological Aspects of Emulsion-Based Vaginal Dosage Forms

#### 3.2.1. The Vaginal Drug Dosage Form Compositions

Emulsion-based vaginal dosage forms are composed of dispersed (lipids, oils) and continuous (aqueous solutions) phases, surfactants, cosurfactants and other excipients required to control pharmaceutical properties of the formulation (see Table 3).



**Table 3.** Excipients used as the components of emulsion-based vaginal drug formulations [74–106].

Excipients	Group/Function	Applied Excipient
Oil phase	Mineral oils	Paraffin oil/White Vaseline
	Vegetable oils and essential oils	Copaiba oil, Eucalyptus essential oil, Geranium oil, Lemongrass essential oil, Mentha essential oil, Soybean oil, Tea Tree oil
	Sterols	Cholesterol
	Phospholipids	Phospholipon 90G (soybean lecithin at 90% of phosphatidylcholine)
	Fatty acids	Oleic acid
	Fatty acid monoesters	Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate), Cetyl palmitate, Glycerol monolaurate, Isopropyl myristate, Monoglycerides of caprylic acid
	Fatty acid diesters/triesters	Captex 300 (medium-chain triglyceride of caprylic and capric acid), Labrafac lipophile (medium-chain triglycerides of caprylic and capric acid), Labrasol (PEG-8 caprylic/capric glycerides), other undefined medium chain triglycerides
	Alkene derivatives	Parleam (Hydrogenated polyisobutene)
	Organosilicon compounds	Cyclomethicon tetramer, Cyclomethicon pentamer
Surfactants	Non-ionic surfactants	Polysorbates: Tween 20 (polysorbate 20), Tween 80 (polysorbate 80) Sorbitan esters: Span 60, Span 80 PEG derivatives: Gelucire 44/13 (mono/di/triglycerides and PEG-32 mono- and diesters of lauric acid), Labrasol (PEG-8 caprylic/capric glycerides), Kolliphor EL/Cremophor EL (PEG-35 castor oil), Kolliphor HS (Macrogol (15)-hydroxystearate), Kolliphor RH 40/Cremophor RH 40 (PEG-40 castor oil) Polyoxyethylene derivatives: Brij 20 (polyoxyethylene (20) cetyl ether) Polyoxypropylene derivatives: Pluronic F68 (Poloxamer 188), Pluronic F127 (Poloxamer 407)
	Amphoteric surfactants	Amino acid derivatives: Tego Betain F (Cocamidopropyl Betaine)
	Cationic surfactants	Amins: Cetylpyridinium chloride
	Other surfactants	Organosilicon compounds: Abil WE 09 (polyglyceryl-4 isostearate; Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone; hexyl laurate), Abil EM 90 (Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone) Bacterial saccharides: Exopolysaccharide from <i>B. vallismortis</i> WF4 strain (mannose/glucose/xylose/arabinose)
Cosurfactants	Alcohols	Ethanol, glycerol, propylene glycol, transcitol P (2-(2-ethoxyethoxy)ethanol)
	Phospholipids	Soy phosphatidylcholine
	Fatty acids and their monoesters	Caprylic acid, Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate)
	PEGs and PEGs derivatives	Labrasol (PEG-8 caprylic/capric glycerides), PEG 200, PEG 300, PEG 400
	Polysorbates	Tween 20, Tween 80
Other	Gelling agents	Carbomers: CP 934 (Carbopol 934), CP 940 (Carbopol 940), CP ETD 2020 (Carbopol ETD 2020), CP U 10 NF (Carbopol Ultrez 10 NF), Tego Carbomer 341 Polyoxypropylene derivatives: Pluronic F127 (Poloxamer 407) Polysaccharides: Chitosan, HPMC (hydroxypropyl methylcellulose), NaCMC (sodium carboxymethyl cellulose), Xantural (XG, xanthan gum)
	Preservatives	Benzyl alcohol, Chlorocresol, Methylparaben, Sodium benzoate
	pH regulators	Lactic acid, Phosphate buffer, Triethanolamine
	Electrolytes	Magnesium sulphate, Sodium chloride
	Humectants	Propylene glycol, PEG 200

## Oil Phase

Several oils have been proposed as dispersed phase in EVDF formulations including vegetable oils (i.e., copaiba oil or soybean oil), mineral oils (i.e., paraffin oil) [74], and essential oils, sterols [75], phospholipids [76,77], fatty acids, fatty acid esters, poly alcoholic fatty acid esters, alkene derivatives and organosilicon compounds (Table 3) [78,79]. Organosilicon compounds, i.e., cyclomethicone tetramer and pentamer, were used in manufacturing of water-in-silicone (W/S) macroemulsions enabling controlled release of the API from the formulation and enhanced washing-out by vaginal secretion resistance [80,81].

For the preparation of vaginal microemulsions and SEDDS systems, fatty acid derivatives such as Captex<sup>®</sup> 300 (ABITEC, Columbus, USA), Capryol<sup>®</sup> 90 (Gattefossé, Saint-Priest, France), glycerol monolaurate and oleic acid have been used as the oil phase components [76,77,82–88]. These excipients exhibited high solubility of lipophilic compounds, e.g., clotrimazole or tetrahydrocurcumin and were also selected due to their additional properties, such as strong microemulsifying properties (Capryol<sup>®</sup> 90, Gattefossé, Saint-Priest, France), anti-HIV activity (glycerol monolaurate) and low toxicity (Captex<sup>®</sup> 300, ABITEC, Columbus, USA) [76,77,82–88]. Cetyl palmitate and other diesters and triesters of fatty acids, e.g., Labrasol<sup>®</sup> (Gattefossé, Saint-Priest, France), triglycerides of medium-length fatty acids have also been proposed in the preparation of vaginal emulsions [76,79,82–86,89–92]. The medium- and long-chain mono/triglycerides are frequently utilized as the oil phase due to their advantageous safety profile and enhanced absorption of the active substance upon application to mucous membranes [73]. Furthermore, the essential oils, e.g., tea tree oil, eucalyptus oil, geranium oil, mint essential oil from *M. spicata* var. *viridis* and lemongrass oil, can act as multifunctional excipients due to their antimicrobial properties [93–96].

## Surfactants

Surfactants are amphiphilic chemical compounds enabling the decrease of surface and interfacial tension, i.e., the tension that forms at the interface between immiscible phases of colloidal systems [58]. Surfactants adsorb at the hydrophilic and hydrophobic phase interface, depending on their chemical structure, allowing to obtain different types of O/W or W/O emulsions. The size of the droplets, degree of polydispersity (defined as polydispersity index, PDI) as well as the kinetic and thermodynamic stability can be controlled via carefully selected mixture of surfactants and cosurfactants. The surfactants are usually classified according to their experimentally determined hydrophilic–lipophilic balance (HLB, in the range of 0–20), which is structure-based. The higher the HLB value, the more hydrophilic the surfactant. Surfactants with HLB value 0–7 form W/O emulsions, whereas wetting agents with HLB value >7 form O/W emulsions [107]. Apart from the surfactant's chemical nature, the properties and type of the obtained emulsion are influenced by the surfactant concentration in the formulation, the so-called surfactant-to-oil ratio (SOR). In nanoemulsions containing oils of natural origin, SOR value is usually <2, whereas in the case of microemulsions, which require a steeper reduction in surface tension, the SOR is often higher (usually >2), as a result of lower ability of these systems to incorporate the dispersed phase [108,109]. Rao et al. in their study homogenized a formulation composed of lemon oil, Tween 80 and water using low, medium and high SOR values and obtained different types of emulsion systems: macro-, nano- and microemulsions, respectively [109]. The higher surfactant concentration in formulations can extend the physical stability of the emulsion, but often at the cost of reducing the hydrophilic or lipophilic phase content. In water-in-silicone oil (W/S) emulsions (see Table 4) characterized by high interfacial tension between the silicone and aqueous phases an increase in the concentration of the surfactant in the system results in a size decrease of dispersed phase droplets and an increase in their homogeneity. It occurs until a critical value of dispersed droplets size is reached for a given composition, above which further increase of the surfactant content in the formulation does not change size and homogeneity of a W/S emulsion [110].

**Table 4.** Vaginal macroemulsions, microemulsion- and nano-emulsion-based dosage forms—composition, characteristic properties and manufacturing methods.

API (Indication)	Formulation	Oil Phase/Surfactant/Cosurfactant/Others	Particle Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Manufacturing Method	Ref.
<b>Vaginal macroemulsions</b>							
Benzydamine (Antibacterial/Anti-inflammatory)	Emulgel	white Vaseline, paraffin/n.a./n.a./Water phase: NaCMC, glycerol, citrate buffer	n.a.	n.a.	n.a.	Mixing	[106]
Progesterone (n.a.)	W/S emulsion	cyclomethicone pentamer/Abil WE 09/glycerol/Sodium chloride	1000–3000	n.a.	n.a.	Mixing	[81]
Ciprofloxacin (Antibacterial)	W/S emulsion	cyclomethicone pentamer ortetramer/Abil WE 09/glycerol/Sodium chloride	2230–2540	n.a.	n.a.	Mixing	[80]
<b>Vaginal microemulsion</b>							
- (Contraceptive)	Microemulgel	Captex 300/Cremophor EL, Phospholipon 90 G, Propylene Glycol/PEG 200/Seaspan carrageenan, Viscarin carrageenan, Sodium benzoate	30–80	n.a.	n.a.	n.a.	[100]
- (Contraceptive)	Microemulgel	Captex 300/Cremophor EL, Pluronic F68, Phospholipon 90G, Propylene glycol/Xanthan gum, Sodium benzoate	30–80	n.a.	n.a.	n.a.	[77]
Vanadocene (Contraceptive)	Microemulgel	Captex 300, Phospholipon 90G/Cremophor EL, Pluronic F68/Xanthan gum	30–80	n.a.	n.a.	n.a.	[76]
Fluconazole (Antifungal)	Microemulgel	Capryol 90/Cremophor EL/Benzyl alcohol, chlorocresol, CP ETD 2020	24	0.98	n.a.	Mixing	[84]
Clotrimazole (Antifungal)	Microemulgel	Capryol 90/Cremophor EL/Benzyl alcohol, chlorocresol, CP ETD 2020	48	0.75	n.a.	Mixing	[82]
Sertaconazole (Antifungal)	Microemulgel	Oleic Acid/Tween 80/Propylene glycol/CP 940	26	0.55	0.26	Mixing, dissolving API under ultrasonication	[86]
Tetrahydro-curcumin (Vaginal microbicide, HIV protection)	Microemulgel	Glycerol monolaurate/Tween 20/Transcutol P/CP U 10 NF, triethanolamine	130	0.18	n.a.	Low-energy (mixing and heating)	[85]
Phloretin (Anti-inflammatory)	Microemulsion	Oleic acid/Tween 20/Ethanol	11	n.a.	n.a.	Mixing	[83]



Table 4. Cont.

API (Indication)	Formulation	Oil Phase/Surfactant/Cosurfactant/Others	Particle Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Manufacturing Method	Ref.
<b>Vaginal nanoemulsion</b>							
Itraconazole (Antifungal)	Nanoemulgel	Tea tree oil/Tween 20/Labrasol/CP 934, Poloxamer 407	42	0.12	−44	Low-energy method (mixing)	[94]
Oxiconazole (Antifungal)	Nanoemulgel	Isopropyl myristate/Cremophor EL/Ethanol/HPMC or XG or CP 934	26	0.55	−34	Low-energy method (mixing)	[90]
Clotrimazole (Antifungal)	Nanoemulsion	Labrafac lipophile/Labrasol/Capryol 90/Propylene glycol (aqueous phase)	153–186	0.37–0.85	−15–−1	Low-energy method (mixing, heating), High-energy method (sonication)	[91]
Polyphenon 60, Curcumin (Antibacterial)	Nanoemulgel	Soybean oil/Tween 20/Propylene glycol/Chitosan	211	0.34	−33	Low-energy method (mixing), High-energy method (high-speed homogenization and ultrasonication)	[98]
Polyphenon 60, cranberry (Antibacterial)	Nanoemulgel	Oleic acid/Tween 20/Glycerol/Chitosan, lactic acid	58	0.20	−16	Low-energy method (mixing), High-energy method (high-speed homogenization and ultrasonication)	[92]
Mentha essential oil (Antifungal)	Nanoemulgel	Mentha essential oil/Tween 80/PEG 400/CP 940, methylparaben, triethanolamine	178	0.18	−32	High-energy method (high-speed homogenization)	[95]
Nystatine (Antifungal)	Nanoemulsion	Paraffin oil/Exopolysaccharide/PEG 400	131	0.08	−40	Low-energy method (mixing), High-energy method (ultrasonication)	[74]
Ciprofloxacin, Polyphenon 60 (Antibacterial)	Nanoemulsion	Labrasol/Cetylperidinum chloride/Glycerol	151	0.20	55	Low-energy method (mixing), High-energy method (high-speed homogenization and ultrasonication)	[79]
Geranium oil (Antifungal)	Nanoemulgel	Geranium oil/Span 80/Tween 20/Chitosan	281	0.32	53	High-energy method (high-speed and high-pressure homogenization)	[93]

Table 4. Cont.

<i>Syngonanthus nitens</i> (Bong.) extract (Antifungal)	Nanoemulsion	Cholesterol/Brij 20/Soy phosphatidylcholine/Chitosan, phosphate buffer	111	0.30	2	Low-energy method (mixing), High-energy method (sonication)	[75]
Imiquimod (Cancer treatment)	Nanoemulsion	Copaiba oil/Span 60/Tween 80	190	0.11	n.a.	Low-energy method (mixing and solvent evaporation)	[78]
Eucalyptus essential oil (Antifungal)	Nanoemulsion	Eucalyptus essential oil/Polysorbate 80/Sorbitan monooleate	68	0.18	−9	High-energy (high-speed homogenization)	[96]
Lemongrass essential oil (Antifungal)	Nanoemulsion	Lemongrass essential oil/Polysorbate 80/Sorbitan monooleate	90	0.21	−8	High-energy (high-speed homogenization)	[96]

n.a.—information not available.

The increase of surfactant content at the cost of the hydrophilic phase may be compensated after vaginal application of small volumes of the formulation that is diluted with the secretions present in the vaginal lumen (ca. 1–2 mL) [23]. When low SOR emulsions are obtained it is possible to use a higher ratio of the oil phase, thus increasing the hydrophobic API content in the formulation and enabling for a dose decrease.

When establishing the surfactant composition for EVDF additional aspects such as the API's solubility in the chosen excipient composition and their safety profile should be considered. In order to obtain the highest possible concentration of poorly soluble active substances in the formulation the solubility studies of an API are conducted using mixtures of oil and surfactants. This may consequently be a determining factor for the choice of surfactants and cosurfactants, especially if these systems have a high SOR value [79,82,84,85,90,92,97–99]. As surfactants are used as spermicides with vaginal mucosa irritating properties [100], analysis of their safety profile after the vaginal application is another important criterion in the surfactant selection process. Some of the well-known non-ionic and ionic surfactants such as benzalkonium bromide, nonoxynol-9, sodium dodecyl sulphate and Triton X-100 have potential mucosal irritating activity and are rarely used in gynecological formulations [111–113]. Additionally, some surfactants, such as Capmul MCM, have an inhibitory effect on the growth of endogenous vaginal bacterial flora creating a risk of potential infections [114]. On the other hand, advantageous properties of surfactants such as the API permeation enhancement through the vaginal mucosa have been well-documented in the case of Polysorbate 80 and Labrasol and can be employed to improve the therapeutic efficacy of the administered drugs [73]. The list of surfactants used as components of EVDF is summarized in Table 3.

Multiple emulsions are a specific case of emulsion systems whose manufacturing requires both lipophilic and hydrophilic surfactants (see Table 5). A non-ionic silicone based Abil EM 90 W/O emulsifier is the most commonly used lipophilic surfactant in the formation of internal emulsion, while a hydrophilic surfactant, e.g., poloxamer 407 provides w/o/w multiple emulsion stability by encapsulation of w/o emulsion in external aqueous phase [89,101–104]. In turn, obtaining SEDDS formulations is a difficult process due to the limited number of oil-surfactant combinations capable of forming these systems (see Table 6). This process requires numerous preliminary tests to select the type and mutual proportion of these components [115].

**Table 5.** Vaginal multiple emulsions—composition, characteristic properties and manufacturing method.

API(s) (Indication)	Formulation	Oil Phase/Lipophilic Surfactant/Hydrophilic Surfactant/Other	Particle Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Manufacturing Method	Ref.
W <sub>1</sub> : benzalkonium chloride O: octadecylamine W <sub>2</sub> : lactic acid (Antibacterial)	Multiple emulsion	Parleam/Abil EM 90/Poloxamer 407	>5000	n.a.	n.a.	Two-step process	[101]
W <sub>1</sub> : benzalkonium chloride W <sub>2</sub> : chlorhexidine (Antibacterial)	Multiple emulsion	Parleam/Abil EM 90/Poloxamer 407/Sodium chloride	>5000	n.a.	n.a.	Raynal method [71]	[104]
W <sub>1</sub> : metronidazole W <sub>2</sub> : Ornidazole (Antibacterial)	Multiple emulsion	Parleam/Abil EM 90/Poloxamer 407/Magnesium sulphate	>8000	n.a.	n.a.	Raynal method [71]	[102]
O: Clotrimazole (Antifungal)	Multiple emulsion-based gel	Labrafac lipophile, Cetyl palmitate/Abil EM 90, Span 60/Cocamidopropyl Betaine/Tego Carbomer 341, Sodium chloride	>29,000	n.a.	−55	Modification of Raynal method [71]	[89]

n.a.—information not available, O—oil phase, W1—internal aqueous phase, W2—external aqueous phase.

**Table 6.** Vaginal self-emulsifying drug delivery systems—composition, characteristic properties and manufacturing method.

API (Indication)	Formulation	Oil Phase/Surfactant/Cosurfactant/Others	Particle Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Manufacturing Method	Ref.
UC 781 (HIV-protection)	SMEDDS	Mono- and diglycerides of caprylic acid/Cremophor RH40/PEG 300	13	0.25	32	Mixing	[99]
Curcumin (HPV-protection)	SNEDDS	Medium chain triglycerides/Cremophor RH40/PEG 200, Caprylic acid, Tween 80	38	0.35	−1	Mixing	[105]
17- $\alpha$ hydroxyprogesterone (Pre-term births prevention)	Solid-state SNEDDS Vaginal tablet	Captex 300/Kolliphor HS/Polyvinyl alcohol, calcium silicate, microcrystalline cellulose, Kollidon CL, Magnesium stearate	50	0.09	−7	Mixing, tablet formation	[87]
The SphK inhibitor (Pre-term births prevention)	SNEDDS	Captex 300/Kolliphor HS/Dimethyl-acetamide	37	0.05	−5	Mixing	[88]
W <sub>1</sub> : siRNA (Gene silencing)	Multiple microemulsion SEDDS gel	Medium chain triglycerides/Lipophilic: Cremophor RH40, Span 80; Hydrophilic: Cremophor RH 40/Lecithin (hydrophilic and lipophilic)/‘thermosensitive gel’ <sup>a</sup>	167	0.18	−7	Two-step process	[103]
Lawsone (Antifungal)	SMEDDS hollow pessary	Capryol 90/Gelucire 44/14/Tween 80/Ovucire WL3460, beeswax	12	0.27	−11	Mixing	[97]

<sup>a</sup>—based on information provided by the authors, gel composition was not specified, n.a.—not available, W<sub>1</sub>—internal aqueous phase.

### Cosurfactants

Carefully selected cosurfactants can increase the stability of the obtained emulsion, reduce the size of the emulsion droplets and the required concentration of surfactant in the formulation. Cosurfactants increase the ability of the oil-surfactant system to emulsify the aqueous phase and further reduce the tension present at the hydrophilic-lipophilic interface. An example of the beneficial effect of ethylene glycol used as a cosurfactant in combination with the Cremophor EL in microemulsions and nanoemulsions with ethyl oleate as an oil phase is the achievement of a twofold reduction of the inner phase droplet size and a significant reduction of PDI compared to formulations obtained without the addition of the cosurfactant [116,117]. The commonly used cosurfactants in the EVDF include (Table 3): short-chain mono- and polyhydric alcohols [79,83,85,86,90,92,98], soybean phosphatidylcholine [75], fatty acids and fatty acid esters [91,105], polyethylene glycols and their derivatives [74,94,95,99,105] and polysorbates [78,93,97].

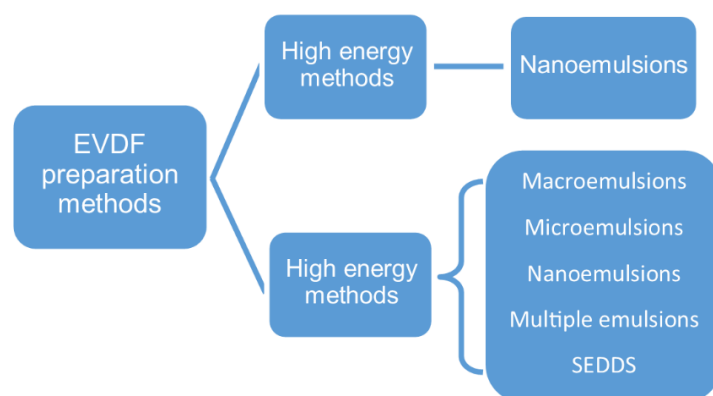
### Other Excipients

In emulsion-based vaginal dosage forms several other excipients such as gelling agents, electrolytes, pH regulators, humectants and preservatives (also acting as antiseptics) are frequently employed to modify pharmaceutical properties of the formulation. The addition of gelling polymers, i.e., carbomer, chitosan, hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC), methyl cellulose (MC), sodium carboxymethyl cellulose (NaCMC), Pluronic F127, xanthan gum to the aqueous phase increase formulation viscosity enabling for improved stability, emulsion adhesiveness and contact time at the application site [76,77,82,84–86,89,90,92–95,98,118–122]. The increased viscosity of the formulation facilitates homogeneous dispersion of the droplets in the continuous phase, limits the mobility of the oil droplets and, as a consequence, prevents flocculation and creaming processes [118–122]. The addition of a gelling polymer results in the transformation of an emulsion into an emulgel, increasing the system's resistance to pH level changes and oxidation [123]. The microemulgels have been the most commonly used forms among microemulsion-based vaginal dosage forms [76,77,82,84–86]. The addition of polymers to microemulsions reduces the mobility of the continuous aqueous phase, decelerating potential destabilization processes resulting from temperature changes and enhanced vaginal secretions after administration [67,68,124]. In multiple emulsions and SEDDS-type systems (Tables 5 and 6) the addition of gelling polymers is limited [89,106] as minor addition of an electrolyte into the internal aqueous phase of a multiple emulsion often increases the viscosity of the formulation [125]. The electrolytes influencing the stability and rheological properties of vaginally administered multiple emulsions include magnesium sulphate or sodium chloride [89,102,104].

Among other excipients used in vaginal emulsion systems the addition of lactic acid or phosphate buffers for pH regulation were reported [75,92,101], while propylene glycol and PEG 200 have been applied as humectants [77]. Benzyl alcohol, sodium benzoate, chlorocresol, methylparaben are used as preservatives [82,84,95]. The absence of preservatives in the formulation reduces the risk of vaginal mucosal irritation. On the other hand, many emulsion-based vaginal dosage forms are in the preliminary research phase, and preservatives use may only be purposeful after their full clinical evaluation of preformulation selected for further development.

### 3.2.2. EVDF Preparation Methods

An emulsion can be formed in a free energy associated process without the application of mechanical forces or energy. Thereby, the emulsification processes used in the vaginal drug forms technology can be divided into low-energy (spontaneous emulsification, emulsion phase inversion method, PIM, phase inversion temperature, PIT) and high-energy methods (Figure 3) [62].



**Figure 3.** EVDF preparation methods.

Campañá-Seoane et al. obtained water/silicone (W/S) macroemulsions with progesterone or ciprofloxacin via a low-energy formulation preparation process, i.e., mixing the silicone phase with the aqueous phase using Unguator 2 homogenizer [80,81]. In contrast, the formation of W/O/W multiple emulsions using low-energy methods is a two-step process. In the first step inner W/O emulsion is prepared through the addition of aqueous media containing electrolytes into a mixture of oil phase and surfactants ( $S_{mix}$ ) at 80 °C under continuous stirring. In the second step the previously obtained W/O emulsion cooled to room temperature is slowly added to the external aqueous phase that contains hydrophilic surfactant(s) [71,89,101,102,104].

Low-energy spontaneous emulsification generally occurs during vaginal microemulsion or SEDDS formulation [67]. The majority of microemulsion-based vaginal drug forms and some of the nanoemulsions listed in Table 4 can also be obtained using the phase titration method (PTM) or the phase inversion method (PIM). In this approach the aqueous phase is gradually added into the oil and surfactant mixture under continuous stirring. With continuous composition change the surfactant curvature evolves resulting in a W/O to O/W phase change [62–64,67,68,78,82–84,86,90,94]. PTM is used in the construction of phase diagrams during preformulation research, enabling to establish compositions using which microemulsion can be formed. In this method a mixture of an oil and  $S_{mix}$  is slowly titrated with the aqueous phase to obtain a vaginal microemulsion with droplet size in the range of 10–190 nm [78,82–84,86].

Mirani et al. [85] obtained tetrahydrocurcumin-loaded vaginal nanoemulsion via the phase inversion temperature (PIT) method. Both phases (oil and water) were initially heated to 45–50 °C followed by mixing and cooling to 25 °C resulting in a nanoemulsion with 130 nm droplets. The PIT method utilizes an alteration in lipophilic properties of nonionic polyoxyethylene-derivative surfactants which can be observed with temperature change—the higher the temperature, the more lipophilic and dehydrated polyoxyethylene surfactant chains become. At the phase inversion temperature (PIT), when the hydrophilic–lipophilic properties of the surfactant are in balance (also called the HLB temperature), a rapid decrease or increase of the temperature enables to obtain a kinetically stable W/O or O/W emulsion, respectively. The PIT method can be easily implemented on the industrial scale, however the stability and polydispersity of the obtained nanoemulsion depends on the experimental conditions and slow heating or cooling of the mixture from HLB temperature enhances droplets coalescence [62–64,67,68].

According to Gupta et al. high-energy manufacturing processes are the methods with input energy density higher than 10<sup>8</sup> W/kg [62]. Among the high-energy emulsification methods used for vaginal nanoemulsion formulation the high-pressure homogenization (pressure range from 50 to 350 MPa), high-speed homogenization and ultrasonication can be distinguished [64,126]. The initial formation of a macroemulsion is required in all high-energy emulsification methods. In the next step macroemulsion droplets are disrupted via high shear forces in high-speed homogenization, turbulence in high-pressure

homogenization method or bubbles cavitation in ultrasonication method [62,126]. High-pressure homogenization at 75 MPa preceded by high-speed homogenization allowed dos Santos et al. to obtain a homogenous nanoemulsion with droplets of 281 nm in a short processing time [93]. High pressure homogenization method generates a lot of heat and physical stress which may affect the formulation properties and API stability. The ultrasonication method might be more suitable for thermosensitive drugs, but it is difficult to upscale [62,64,67,68,126]. Low polydispersity of 110–130 nm oil phase droplets has been reported for vaginal nanoemulsions obtained by sonication preceded by low-energy mixing [74,75]. In contrast, nanoemulsion droplets in the range of 58–211 nm (PDI in the range of 0.20–0.34) have been obtained via ultrasonication preceded by high-speed homogenization (10 000 rpm for 25–30 min) [79,92,98]. Examples of nanoemulsions with essential oils manufactured via high-speed homogenization (15,000–17,000 rpm for 20–30 min) enabled to obtain highly homogenous formulations with 68–178 nm oil droplets diameter [95,96]. In nanoemulsion formulation using high-energy methods the surfactants should be mixed with the oil phase prior to the addition of aqueous phase. Mixing emulsion components in a different order results in macroemulsion formation [62,67,68]. Both low- and high-energy methods allow to obtain homogenous nanoemulsions with uniform size distribution of the inner phase droplets which is of importance for formulation of nanoemulsion-based vaginal drug delivery systems [75,78,94,95].

### 3.2.3. Vaginal Emulsion-Based Drug Delivery Systems Characterization Methods

The 10th Edition of European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) includes the monograph ‘Vaginal solution, emulsion and suspensions’ [127] which does not contain detailed requirements concerning their properties including pH, osmolarity, droplet size of the dispersed phase, rheological properties, adhesiveness, spreadability or the release parameters of the active substance. As EVDFs are emerging formulations, in this review we summarized and described research methods that have been proposed for the evaluation of their structural and pharmaceutical properties (see Table 7). In the following sections we propose a unified set of methods which can be used to assess critical parameters of EVDFs. The described characterization methods of vaginal emulsion systems can provide guidance for researchers beginning their studies on these emerging drug delivery systems.



**Table 7.** Comparison of parameters and research methods using in evaluation of emulsion-based vaginal dosage forms properties.

API(s) (Formulation)	pH	Droplet Size	Viscosity <sup>c</sup> (Pa·s)	Spreadability	Bioadhesion	In Vitro Release/Permeability	In Vivo Studies	Ref.
<b>Vaginal macroemulsions</b>								
Benzydamine (Emulgel)	-	-	Plate-plate (100–700)	-	in vitro, T/DF, porcine VM	Franz cells	-	[106]
Progesterone (W/S * emulsion)	-	MS	Cone-plate (21.2–186.6)	-	in vitro, T/DF, bovine VM, GTL	USP II/Franz cells	rats	[81]
Ciprofloxacin (W/S * emulsion)	-	MS	Cone-plate (1.4–17.0) (1.5–14.0)	-	in vitro, T/DF, GTL	Franz cells and in vivo	rats	[80]
<b>Vaginal microemulsion</b>								
- (Microemulgel)	-	DLS	+ <sup>a</sup>	-	-	-	rabbits	[100]
- (Microemulgel)	-	DLS	+ <sup>a</sup>	-	-	-	rabbits	[77]
Vanadocene (Microemulgel)	-	DLS	Results n.a.	-	-	-	rabbits, pigs	[76]
Fluconazole (Microemulgel)	4.5 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (9800 at 5 rpm)	P-P	in vitro, NM, agar plate	-	rabbits, 11 female patients	[84]
Clotrimazole (Microemulgel)	4.5 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (9000 at 5 rpm)	P-P	in vitro, NM, agar plate	Modified Apparatus No. 1 USP 23	-	[82]
Sertaconazole (Microemulgel)	4.2 <sup>b</sup>	DLS	+ (2.0)	P-P	in vitro, T/DF, goat VM	Franz cells	-	[86]
Tetrahydrocurcumin (Microemulgel)	6.0 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (11.5 at 5 rpm)	TA	-	Dialysis bag	-	[85]
Phloretin (Microemulsion)	-	DLS	-	-	-	-	-	[83]

Table 7. Cont.

API(s) (Formulation)	pH	Droplet Size	Viscosity <sup>c</sup> (Pa·s)	Spreadability	Bioadhesion	In Vitro Release/Permeability	In Vivo Studies	Ref.
<b>Vaginal nanoemulsion</b>								
Itraconazole (Nanoemulgel)	5.5 <sup>b</sup> (nanoemulsion)	DLS	Spindle (0.91)	-	in vitro, T/DF, CM, in vivo (rats)	Franz Cells	rats	[94]
Oxiconazole (Nanoemulgel)	6.9 <sup>b</sup> (gel with HPMC)	DLS	Cone-plate (8.43 at 50 rpm for gel with HPMC)	P-P	in vitro, NM, animal vagina	USP II	-	[90]
Clotrimazole (Nanoemulsion)	5.7 <sup>b</sup>	DLS	Cone-plate (0.041–0.042 at 100/s)	P-P	-	Franz Cells	10 women—skin tolerance	[91]
Polyphenon 60, Curcumin (Nanoemulgel)	-	DLS	+	-	-	Dialysis bag	rats	[98]
Polyphenon 60, cranberry (Nanoemulgel)	3.7 <sup>b</sup>	DLS	+	-	-	Dialysis cells	rats	[92]
Mentha essential oil (Nanoemulgel)	5.2 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (24.8)	TA	in vitro	-	mice	[95]
Nystatine (Nanoemulsion)	-	DLS	Spindle (0.12)	-	-	Dialysis bag	mice	[74]
Ciprofloxacin, Polyphenon 60 (Nanoemulsion)	-	DLS	-	-	-	USP II	rats	[79]
Geranium oil (Nanoemulgel)	4.4 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (0.4–0.5 at 50/s–0.01/s)	-	in vitro, T/DF, porcine VM	-	-	[93]
<i>Syngonanthus nitens</i> (Bong.) extract (Nanoemulsion)	-	DLS	Cone-plate	-	in vitro, T/DF, porcine VM	-	rats	[75]

Table 7. Cont.

API(s) (Formulation)	pH	Droplet Size	Viscosity <sup>c</sup> (Pa·s)	Spreadability	Bioadhesion	In Vitro Release/Permeability	In Vivo Studies	Ref.
Imiquimod (Nanoemulsion)	6.0 <sup>b</sup>	DLS	-	-	-	Franz cells	-	[78]
Eucalyptus essential oil (Nanoemulsion)	5.3 <sup>b</sup>	DLS	-	-	-	-	mice	[96]
Lemongrass essential oil (Nanoemulsion)	4.6 <sup>b</sup>	DLS	-	-	-	-	mice	[96]
<b>Vaginal multiple emulsions</b>								
W <sub>1</sub> : benzalkonium chloride O: octadecylamine W <sub>2</sub> : lactic acid (Multiple emulsion)	7.8 <sup>b</sup>	MS, GA	Cone-plate (3.2 at 100/s)	-	-	-	-	[101]
W <sub>1</sub> : benzalkonium chloride W <sub>2</sub> : chlorhexidine (Multiple emulsion)	-	MS	Cone-plate (Isosmotic condition: 0.003 at 100/s)	-	-	Conductometric (NaCl as a marker)	-	[104]
W <sub>1</sub> : metronidazole W <sub>2</sub> : ornidazole (Multiple emulsion)	W <sub>1</sub> : 5.7 <sup>b</sup> W <sub>2</sub> : 6.0 <sup>b</sup>	MS	-	-	-	Dialysis tube	rabbits	[102]
O: Clotrimazole (Multiple emulsion-based gel)	6.5 <sup>b</sup>	LD	parallel plate-plate (0.29 at 100/s)	P-P	-	Franz cells	-	[89]
<b>Vaginal Self-Emulsifying Drug Delivery Systems</b>								
UC 781 (SMEDDS)	-	DLS	-	-	-	Dialysis bag (balloon)	-	[99]
Curcumin (SNEDDS)	-	DLS	Plate-plate (116.3)	OM	-	Transwell chambers	-	[105]

Table 7. Cont.

API(s) (Formulation)	pH	Droplet Size	Viscosity <sup>c</sup> (Pa·s)	Spreadability	Bioadhesion	In Vitro Release/Permeability	In Vivo Studies	Ref.
17- $\alpha$ hydroxyprogesterone (Solid-state SNEDDS Vaginal tablet)	-	DLS	-	-	-	USP II	mice	[87]
The SphK inhibitor (SNEDDS)	-	DLS	Spindle (0.2-fold dilution: 0.53 0.4-fold dilution: 4.8 at 20 rpm)	-	-	USP II	mice	[88]
W <sub>1</sub> : siRNA (Multiple emulsion SEDDS gel)	-	DLS	-	-	-	Dialysis bag	mice	[103]
Lawsone (SMEDDS hollow pessary)	4.2–4.8 <sup>b</sup>	DLS	Spindle (0.956–1.023)	-	-	USP I	-	[97]

(-)—test not reported to perform; (+)—test reported to perform, method details not specified; \*—water in silicon emulsion; <sup>a</sup>—authors reported that viscosity of emulgels were in the range of 1–10 Pa·s; <sup>b</sup>—potentiometric method; <sup>c</sup>—method used for viscosity measurement and provided value; CM—cellophane membrane; DLS—dynamic light scattering; GA—granulometric analysis; GTL—goat tanned leather; LD—laser diffractometry; MS—microscopy; NM—Nakamura method [128]; OM—optical method; P-P—plate-plate method; results n.a.—test performed, results not available in a paper; TA—texture analyzer; T/DF—tensile/detachment force; USP I—USP dissolution apparatus No. I; USP II—USP dissolution apparatus No. II.; VM—vaginal mucosa.

### pH and Osmolarity

Alkaline preparations administered vaginally may contribute to the development of bacterial infections. Following the above-mentioned WHO recommendations for vaginal lubricants to avoid bacterial superinfections, it is preferable to obtain a formulation with pH below 4.5, i.e., the physiological pH of vagina. This may not be possible for pH sensitive APIs that require higher pH for extended stability or when the benefits of the formulation application exceed the risk of infection as the result of a pH change [45]. In the revised studies only five micro- and nanoemulsion formulations fall within the physiological range of pH values < 4.5 [82,84,86,92,93]. For other reported formulations the pH values were higher and fell within the slightly acidic range, also considered as physiological [78,85,91,94–97,102]. Some of the formulations pH values exceeded physiological range [89,90,101], creating a risk of bacterial infections. None of the analyzed publications provided information on the osmolarity value of the obtained formulations which, due to the risk of irritation and damage to the vaginal mucosa, should be <1200 mOsm/kg [45]. Gué et al. measured the osmolarity of nanoemulsions intended for parenteral use employing a micro-osmometer and a simple method based on measuring the nanoemulsion's freezing point depression, which can also be used to determine the osmolarity of EVDF. Osmolarity of nanoemulsions was found to depend on the ratio of lipid and surfactant fractions to water, whereas the concentration of APIs representing BCS (Biopharmaceutical Classification System) class I—paracetamol; class II—ibuprofen, amiodarone hydrochloride, fenofibrate; class IV—ciprofloxacin, had no significant effect on the osmolarity value. In contrast, an increase in the concentration of a substance classified as BCS class III, i.e., ranitidine hydrochloride, caused an increase in the osmolarity of the formulation which should also be taken into account when developing vaginal formulations with low osmolarity <300 mOsm/kg [129].

### Internal Droplets Measurements, Polydispersity Index and Zeta Potential

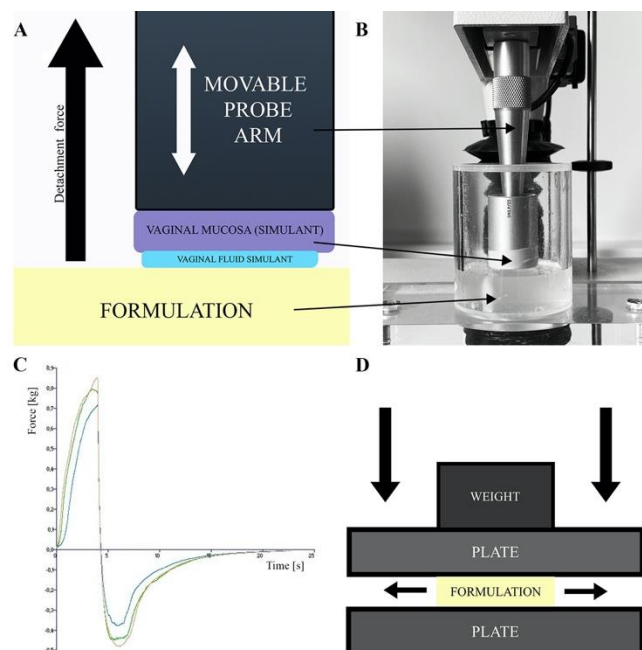
Method selection for measuring the dispersed phase droplet size highly depends on the analyzed particles size range. Optical microscopy is most frequently used for emulsions with droplet sizes in the micrometer range, i.e., macroemulsions, as it only allows the observation of particles larger than 200 nm [80,81,89,102,104,130]. The most commonly used method to determine the dispersed phase droplet size of micro- and nanoemulsion-based vaginal dosage forms is the dynamic light scattering (DLS) method, also known as photon correlation spectroscopy, that enables the measurement of droplet sizes in the range from 1 nm to 6 µm [74–79,82–88,90–96,98,99,103,105]. The accuracy of the obtained results depends on the measurement method and sample preparation, the sample dilution in particular [130]. According to Danaei et al. homogeneous formulations have a low PDI of  $\leq 0.3$ , moderately homogeneous formulations have PDI in the range of 0.3–0.7 and polydisperse formulations display PDI values > 0.7 [131,132]. The Malvern Zetasizer® is the most commonly used device for both particle size measurements by laser methods and zeta potential measurements by Electrophoretic Light Scattering (ELS). During the zeta potential measurements the device uses the Doppler effect observed in the form of changing scattered laser beam frequency by particles set in motion in the electric field [133]. Although the DLS is frequently used to determine the dispersed phase droplet size, it has several limitations including the necessity of viscous materials dilution as well as the requirement of sample filtration prior to analysis. Furthermore, DLS provides information on hydrodynamic radius of diffusing species rather than the microscopic image of the particles. On the other hand, Transmission Electron Microscopy (TEM) provides high resolution images of nanosize materials, but it requires a particular sample preparation which can change the structure and shape of the dispersed phase droplets [130,133].

### Viscosity and Adhesion

Viscosity is one of the parameters influencing the degree of the formulation adhesion to the mucosa. In vaginal formulations dynamic viscosity is measured with rheometers and the values are expressed in Pa·s (Pascal-second, SI unit) or P (Puaz, CGS unit); the relation

between them is  $1 \text{ Pa}\cdot\text{s} = 10 \text{ P}$ . Since the measured formulation viscosity depends on the type of equipment including the spindle/cone used and the measurement conditions (i.e., spindle/cone speed and temperature), the experimental viscosity values for the different formulations are only indicative and determine the magnitude of the viscosity range not allowing for a direct comparison of the tested formulations. The viscosity measurement techniques of emulsion-based vaginal formulations and obtained measurements results are collected in Table 7.

The degree of drug form adhesion to the vaginal mucosa determines its resistance to washing-out by vaginal secretions. In vitro and in vivo methods are used to determine the formulation's adhesiveness. In vitro methods are based on peel, shear or tensile forces measurements, viscosity difference measurements between the formulation, vaginal secretions and their mixture and flow retention measurements, i.e., the time the formulation remains in contact with the mucous membrane during constant liquid washing [134]. An important factor affecting the comparability of in vitro methods with the real performance of the drug formulation after vaginal administration is the choice of material or tissue used as a model for the vaginal mucosa and the composition of artificial vaginal discharge used in the study [134]. The artificial vaginal discharges are mainly composed of sodium chloride, lactic acid, glucose and additional components such as proteins, electrolytes and buffers dissolved [135]. Their characteristics have been well-described by Tietz and Klein [135]. In vitro adhesion tests measure the tensile strength between the surface of a plate or model tissue attached to the base of a texture analyzer or dynamometer and formulation (see Figure 4A–C) [75,80–82,84,86,90,93–95,106]. As surface models simulating the human vaginal mucosa the animal tissues (i.e., pig, goat, cow vagina and goat's skin) are used, as well as synthetic models like cellophane membrane [75,80–82,84,86,90,93–95,106]. Bachhav and Patravale and Khattab and Ismail [82,84,88] conducted mucoadhesion studies using the Nakamura et al. method [128] which is a modification of the flow retention measurement method. In this method the microemulgels were applied onto an agar plate attached to a USP disintegration test apparatus and subjected to cycles of immersion and emergence in  $\text{pH} = 4.5$  buffer until the formulation was washed off entirely of the agar plate.



**Figure 4.** (A) Scheme of adhesion measurements by detachment method, (B) texture analyzer stable micro system, (C) adhesion measurement sample result and (D) spreadability test by plate-plate method.

In the in vivo adhesion studies the measurement of mucoadhesion was based on the visual assessment of the presence of the pigmented nanoemulsion formulation in the

rat vagina 24 h after application [94] or the real-time tracking of the localization of the radiolabeled formulation in the animal vagina using PET/CT imaging [80].

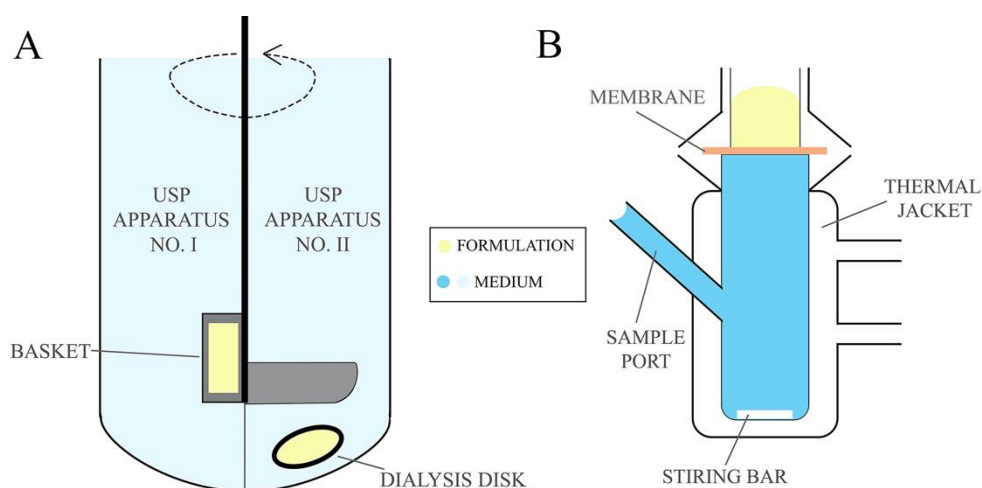
Comparison of vaginal formulations' adhesiveness is challenging due to the differences in measurement devices, measurement conditions and applied vaginal mucosa models. In addition, the results presented as strength expressed as a numerical value are difficult to relate to real vaginal administration conditions. An essential advantage of these studies is the possibility to compare the developed formulations with commercial preparations with known vaginal retention parameters which provides an opportunity to assess the properties of the newly designed formulations.

### Spreadability

The formulation's spreadability test determines the increase in the formulation surface area under an external force and enable a comparison of the spreading properties of the investigated formulations as a function of the composition variables and measurement conditions [89,91]. In the case of vaginal formulations, the larger the surface of vaginal mucosa covered by the formulation, the larger the area available for the API penetration. Spreadability, viscosity and adhesion are important *in vitro* parameters enabling to assess the formulations resistance to the washing-out by vaginal secretions. A plate-plate technique shown in Figure 4D and a texture analyzer are used to assess the spreadability of EVDF [82,84–86,89–91,95,105]. The changes in surface area covered by investigated formulation as a function of the applied pressure/load force enable a comparison of the spreading properties of the tested formulations as a function of the composition variables and measurement conditions [89,91].

### In Vitro Drug Release and Permeability Studies

Drug dissolution studies are used to determine the amount of drug released from the formulation into the acceptor medium over the experimental time. Drug dissolution testing enables to establish drug release kinetic model and the rate at which the API is released from the formulation providing essential information about the pharmaceutical properties of formulations [81]. Permeability studies, on the other hand, determine drug penetration via mucosa enabling to estimate the *in vivo* performance of the formulation. The permeation studies are frequently designed in comparative manner that allows for the comparison of the newly developed formulation with commercially available products [136]. The release tests are conducted using United States Pharmacopeia (USP) Apparatus No. I and II (Figure 5A) (described in the monograph <711> Dissolution Test [137]), also described in European Pharmacopeia 10.0 as basket apparatus and paddle apparatus, respectively [138], usually for 24 h. Using the USP No. I apparatus the formulations are placed in a basket which is immersed in a vessel with acceptor medium heated to  $37 \pm 0.5$  °C and stirred with predefined rotating rate. In the No. II apparatus, however, the test formulation is placed in a dialysis bag or in a disc covered with a semipermeable membrane immersed below a paddle agitator in a vessel filled with acceptor medium. Citrate and phosphate buffer solutions or simulated vaginal discharge are used as the acceptor medium for pharmaceutical bioavailability studies, while sampling is performed in an automated manner at predefined time points [79,81,82,87,88,90,97]. As an alternative, the drug release/membrane penetration studies from EVDF can be performed using dialysis bags, tubes or chambers immersed in a vessel with mixed and thermostated acceptor medium, e.g., simulated vaginal discharge while samples are withdrawn at predefined time points [74,85,92,98,99,102,103].



**Figure 5.** (A) USP dissolution apparatus and (B) Franz Cells unit.

The measurements of *ex vivo* or *in vitro* permeation of the active substance from the emulsion-based vaginal formulation can be performed with the Franz diffusion cells, illustrated in Figure 5B, through a mucous or synthetic membrane [139]. An important factor affecting the quality of the obtained permeation results is the type of membrane used in the test. In the studies on EVDF, biological tissues simulating conditions of the human vagina and synthetic cellulose membranes (i.e., Visking Medicell Membrane, Filter paper Whatman 41) are employed. As an acceptor medium in permeation tests, citrate and phosphate buffer solutions, a water/ethanol mixture (e.g., for clotrimazole) and simulated vaginal secretions are used. The duration of conducted permeation studies in Franz diffusion cells at 37 °C varied from a few hours to 15 days, with sampling at defined time intervals [80,81,86,89,91,94,106].

In both release kinetics and permeation studies, determination of the released substance concentration in the acceptor medium is usually carried out by HPLC chromatography or UV-VIS spectroscopy.

#### In Vivo Studies

The available *in vivo* studies evaluate safety and efficacy of emulsion formulations after intravaginal administration in mice, rats, rabbits and pigs. The therapeutic effect after local application of the intravaginal formulation is frequently compared with the effect of systemic administration of the drug, e.g., by oral route [74–76,79–81,84,87,88,91,92,94–96,98,100,102,103]. To date the results from two of the phase I clinical studies (10 and 11 patients respectively) evaluating the safety and therapeutic efficacy of emulsion formulations with clotrimazole and fluconazole in comparison with commercial reference products are available [84,91].

### 4. Emulsion-Based Vaginal Dosage Forms with Drugs from Different Therapeutic Groups—Biological Evaluation and Examples of In Vivo Applications

#### 4.1. Antifungal Activity

Vulvovaginal candidiasis is one of the most frequently occurring vaginal fungal infections [140]. The problem affects not only adult women but also children and adolescents with comorbidities such as type 1 diabetes mellitus [141]. A total of 75% of women suffer from vaginal candidiasis at least once in their life. Furthermore, recurrent vulvovaginal candidiasis defined as at least four repeating candida infections per year is an emerging global clinical problem that affects 138 million women every year [142,143]. Among all of the vulvovaginal candidiasis treatment strategies local drug administration has the most advantageous safety and efficiency profile as it reduces the risk of side effects, especially in extreme caution conditions, e.g., pregnancy [144,145].



#### 4.1.1. Antimycotic Azoles

In the treatment of vulvovaginal fungal infections the most abundantly used antifungal group of drugs are azoles being imidazole derivatives [144]. Although azoles have high antimycotic activity, their application is limited due to the insufficient water solubility [146,147]. Emulsion-based antifungal azoles formulations displayed high drug loading capacity, as well as increased drug bioavailability after both oral and topical administration as compared to commercial formulations and neat substances [148–157].

##### Fluconazole, Clotrimazole

Bachhav and Patravale have developed microemulsion-based gels with fluconazole and with clotrimazole [82,84] which, unlike the reference Candid-V<sup>®</sup> market gel with clotrimazole, had physiological pH. In vitro release studies of clotrimazole from the final microemulsions showed drug release kinetics similar to Candid-V<sup>®</sup> gel (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India), simultaneously with a greater total amount of the released substance after 10 h of dissolution test. In in vitro antifungal activity tests both microemulsion-based gels with clotrimazole and with fluconazole displayed a larger fungi growth inhibition area as compared to Candid-V<sup>®</sup> gel (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India) [82,84]. After vaginal tolerance study in rabbits, the fluconazole formulation was implemented in a 6-day, double-blind, randomized pilot study with 11 female patients suffering from vaginal candidiasis, divided into a study group (n = 6) treated with fluconazole formulation and control group (n = 5) treated with Candid-V<sup>®</sup> (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India). The study showed similar effects of the fluconazole microemulsion-based gel compared to the Candid-V<sup>®</sup> gel (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India), while reducing by one day the time needed to relieve symptoms in the test group in comparison to the control group [84]. Anticandidal nanoemulsion and W/O/W multiple emulsion with clotrimazole obtained by Soriano-Ruiz et al. had higher antifungal in vitro activity as compared to clotrimazole solution and commercially available 1% and 2% clotrimazole intravaginal creams (Canesten<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Germany and Gine-canesten<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Germany) [89,91]. The determined minimum inhibitory concentration (MIC) of the evaluated creams and emulsion-based formulations against *Candida glabrata* ATTC 66032 were 7.8125 µg/mL and 0.2441 µg/mL, respectively. Furthermore, the developed formulations displayed enhanced in vitro drug release and ex vivo permeation through the skin as compared to the commercial reference products. In ex vivo studies clotrimazole nanoemulsion displayed four times higher vaginal drug retention and nine times higher theoretical steady-state plasma concentration in comparison to commercial formulations. The results demonstrated high antifungal activity and advantageous pharmacokinetic properties as compared to commercially available clotrimazole creams.

##### Itraconazole

Mirza et al. developed itraconazole nanoemulsion thermosensitive gel using Poloxamer 407 and CP 934 as gelling agents and tea tree oil as the oil phase [94]. Due to the low solubility of the drug in the oils the API was firstly dissolved in chloroform following its evaporative removal from the formulation. The concentration of Poloxamer 407 affected the gelation temperature and mucoadhesive properties of the formulations. Increase in the adhesion and decrease in the gelation temperature was observed with an increasing concentration of Poloxamer 407 in the nanoemulsion-based gel. The optimal pharmaceutical properties of the formulation were obtained at 0.3% CP 934 and 20% of Poloxamer 407 concentration in the emulgel. The developed itraconazole/tea tree oil nanoemulsion-based gel displayed higher antifungal activity as compared to conventional itraconazole or tea tree oil gels, proving the synergetic effect of both ingredients with no toxicity in female rats during in vivo studies. After 14 days of treatment with nanoemulsion-based itraconazole gel female rats were considered cured, while in the vaginal discharge of rats treated with

conventional itraconazole gel or tea tree oil gel the concentration of *Candida albicans* cells indicated a still ongoing infection.

#### Sertaconazole

Patel and Patel developed controlled drug release gels based on sertaconazole microemulsion [86]. The drug release kinetics was controlled via changes in polymer concentration. In vitro antifungal activity of optimized formulation against *C. albicans* ATCC 10231 strain was assessed using the cup plate technique and compared to the antifungal activity of commercially available Candid-V<sup>®</sup> gel (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India). After 48 h of incubation the sertaconazole microemulsion-based gel, Candid-V<sup>®</sup> (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India) gel and sertaconazole solution's inhibition areas were ca. 35, 28 and 29 mm respectively. These results proved a higher antifungal activity of sertaconazole microemulsion-based gel compared to the commercial product and the sertaconazole solution [86].

#### 4.1.2. Nystatin

Song et al. [74] have prepared an oil in water nanoemulsion with nystatin and exopolysaccharide dedicated to the treatment of vulvovaginal candidiasis with sustained-release. The conducted in vitro microbiological test evaluation revealed higher antifungal activity of nystatin/exopolysaccharide nanoemulsion against *C. albicans* cultures and 32 times lower MIC compared to nystatin solutions. In vivo studies also confirmed the synergistic activity of nystatin and exopolysaccharide, increased formulation adhesion to the vaginal mucosa and higher effectiveness in the treatment of vulvovaginal candidiasis than for a nifuratel-nystatin cream. Effective relief of candidiasis symptoms was achieved after 15 days of formulation administration, while the nifuratel-nystatin cream-treated control group still suffered from the infection.

#### 4.1.3. Antifungal Phytoconstituents

Srivastava et al. [95] developed a nanoemulsion-based gel with a natural antifungal agent *Mentha spicata* L. var. *viridis* aromatic oil (MEO) and Carbopol 940 for the treatment of vaginal candidiasis. The authors concluded that volatility of Mentha essential oil was decreased when incorporated into nanoemulsion droplets providing extended stability of the prepared formulation. The in vivo studies in female proved higher antifungal activity of the obtained MEO nanoemulsion-based gel as compared to a MEO conventional emulgel.

Dos Santos Ramos et al. [75] developed a nanoemulsion with a luteolin-rich *Syngonanthus nitens* (Bong.) extract for vulvovaginal candidiasis treatment. In vivo studies in female Wistar rats have proven a greater antifungal activity of nanoemulsion with phytoconstituents as compared to free phytoconstituents fraction and a commercially available amphotericin B and tetracycline cream. Animals were considered cured after a 6-day treatment with nanoemulsion as compared to a 10-day treatment with cream and free phytoconstituents fraction. In the following study Dos Santos Ramos et al. [93] reported an anticandidal geranium oil nanoemulgel with chitosan as a gelling agent. The chitosan addition increased the mucoadhesive properties of obtained formulations and as a consequence extended their residence time on the vaginal mucosa as compared to a neat nanoemulsion. The optimized nanoemulgel showed a 64-times higher antifungal activity in vitro as compared to a diluted geranium oil.

Gündel et al. [96] presented two nanoemulsions with eucalyptus and lemongrass essential oils as an alternative to azole treatment of vulvovaginal candidiasis. The in vivo studies in mice confirmed antifungal activity of the developed formulations on a par with reference miconazole cream and higher than neat essential oils. The anti-inflammatory effect of the eucalyptus and lemongrass essential oils nanoemulsions was proven in a histopathological analysis after 8 days of treatment. In contrast, mild inflammation in vaginal mucosa tissues was observed in the group treated with a miconazole cream.

Pandit et al. [97] developed lawsone (an antifungal agent obtained from henna) SMEDDS incorporated into easy-to-administer hollow pessaries. Emulsification of lawsone in the formulation provided a higher antifungal activity *in vitro* as compared to neat lawsone. The hollow pessary can be used for low volumes of concentrated API emulsions providing convenient application and reproducible dosing.

#### 4.2. Antibacterial Activity

Apart from fungal infections women, especially in prepubertal age, suffer from bacterial vaginitis and vaginosis. In contrary to candidiasis which is more frequent among sexually active women, bacterial infections in children and adolescent virgins are related to improper hygiene. Atrophic vaginal mucosa is prone to pathogens due to lower levels of estrogen, not fully grown bacterial flora resulting in alkaline pH and deficiency of defensive factors such as bacteriocins and hydrogen peroxide [37,158–165].

##### 4.2.1. Antibiotics and Chemotherapeutics

A group of Otero-Espinar [80] developed controlled release vaginal W/S emulsions with a model BCS IV class drug, i.e., ciprofloxacin. The radiolabeled W/S formulation after administration in female rats was resistant to wash-out by vaginal discharges for 90 min as monitored using PET/CT imaging. The real-time observation revealed systemic absorption of ciprofloxacin as the drug was distributed to the urinary bladder. After topical administration a higher ciprofloxacin concentration in uterine tissues as compared to blood concentration was reported. Furthermore, six hours after the intravaginal administration of the W/S emulsion ciprofloxacin concentration in uterine tissues was comparable to the drug concentration achieved via an intraperitoneal injection. High drug concentrations in the genital tissues were observed for up to 24 h after vaginal administration of the W/S emulsion. The presented approach may be used in future treatment of urinary tract infections in patients unable to administer the drug orally or experiencing the side effects after oral administration.

Atinderpal et al. [79] developed a ciprofloxacin and green tea Polyphenon 60 nanoemulsion with confirmed activity against ESBL and MBL bacteria. The vaginally administered nanoemulsion showed higher biodistribution, drug bioavailability and blood concentrations compared to the oral route in *in vivo* studies. After vaginal administration high renal and urinary bladder concentrations of ciprofloxacin have been observed which should be considered in future administration of proposed formulation in patients with renal impairment [79]. Studies of both Otero-Espinar et al. and Atinderpal et al. have proven that ciprofloxacin applied as a vaginal emulsion undergoes direct vagina-to-uterus transport known as the first uterine pass effect [20,79,80].

Özer et al. [102] developed multiple W/O/W emulsions with metronidazole and ornidazole for the potential treatment of vaginal bacterial infections. *In vitro* studies demonstrated that the release kinetics of oil-encapsulated chemotherapeutics were similar compared to the drug release from the continuous phase. However, alkaline dissolution media increased the release of metronidazole and ornidazole from both the internal and external emulsion phases. This can prove advantageous in the treatment of bacterial vaginitis where higher pH of vaginal secretions is observed, enabling for increased chemotherapeutic release rate and, as a consequence, faster relief of the infection symptoms [166,167]. After application of a multiple emulsion with radioisotope-labeled compounds in rabbits, a faster absorption of metronidazole than ornidazole from the vaginal epithelium was observed. Both APIs encapsulated in a W/O/W multiple emulsion have proven effective against local bacterial infections with only a minor increase in the blood concentration and, at the same time, a small substance increase in blood concentrations in rabbits was observed, confirming the local effect of the drug.

#### 4.2.2. Antiseptics

Tedajo et al. [101] developed a vaginal W/O/W emulsion as a formulation for potential treatment of female reproductive tract infections, mainly caused by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *C. albicans*. Obtained multiple emulsions allowed the simultaneous administration of benzalkonium chloride, octadecylamine and lactic acid without the risk of pharmaceutical incompatibility, demonstrating at least one-year storage stability [101,168,169]. Although the optimized multiple emulsion showed an increased microbicidal efficacy against *S. aureus* and *C. albicans* compared to the free 0.2% benzalkonium chloride solution, the formulation displayed lower microbicidal activity against *E. coli* compared to an antiseptic reference solution.

Tedajo et al. [104] investigated the release of benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate encapsulated in external and internal aqueous phases of a W/O/W multiple emulsion, respectively. The synergistic effect of the combination of chlorhexidine digluconate and benzalkonium chloride in the form of a multiple emulsion against *S. aureus* and *E. coli* was confirmed in vitro. Prior to vaginal administration of W/O/W emulsions the water-dilution is recommended, which provides hypotonic conditions facilitating APIs release from the internal phase of the emulsion as a result of the swelling-breakdown process. Additionally the encapsulation of labile substances, such as light-sensitive chlorhexidine digluconate, to the internal phase of multiple emulsions provided extended API stability in emulsion-based formulations [104].

#### 4.2.3. Emulsions with Phytoconstituents

Abu-Azzam and Nasr [83] have developed an intravaginal microemulsion with an anti-inflammatory phloretin phytoconstituent for potential treatment of vaginitis. The formulation showed an enhanced anti-inflammatory activity compared to the free phloretin in cell cultures, achieving similar efficacy to diclofenac sodium. The obtained initial results indicated that a vaginal microemulsion with phloretin may be a potential therapeutic alternative to non-steroidal anti-inflammatory drugs, while its safety and efficacy needs to be confirmed in vivo in the future.

For the potential treatment of *E. coli* vaginal infections Kaur et al. obtained two nanoemulsion-based gels composed of green tea Polyphenon 60 mixed with curcumin or cranberry [92,98]. Vaginally administered formulation of radiolabeled Polyphenon 60 in female rats showed higher distribution in the kidney and urinary bladder as compared to vaginal application of drug solutions or orally administered nanoemulgels. The studies of Kaur et al., confirmed that intravaginal administration of Polyphenon 60 with curcumin or cranberry nanoemulsion might be a promising intravaginal and urinary tract infections treatment alternative to the conventional oral administration of antibiotics [92,98].

#### 4.3. Contraceptive and Sexually Transmitted Diseases Prevention

At the end of the 20th and the beginning of the 21st centuries there was a strong interest in the microemulsion-based gels used as vaginal spermicides. D'Cruz and Uckun, in the review article, referred to the safety and spermicidal activity of emulsion-based gels GM-4 and GM-144 compared to commercially available nonoxynol-9 (N-9) gel [77]. After the analysis of in vivo toxicity and spermicidal activity tests in rabbits and mice, D'Cruz and Uckun concluded that microemulsion-based gels are less toxic and more effective than the commercially available intravaginal contraceptive [77]. D'Cruz and Uckun [76] developed intravaginal microemulsion-based gel with contraceptive chelated vanadocene as an alternative to popular N-9 gel that was reported to have a toxic effect on the vaginal epithelium and questionable spermicidal efficacy [113,170,171]. The proposed microemulsion gel formulation revealed promising contraceptive activity in vivo in rabbits and in pigs [76].

Mirani et al. proposed microemulsion-based gel with tetrahydrocurcumin (THC) as a vaginal microbicide in the prophylaxis of HIV infections [85]. The final formulation

exhibited pseudoplastic behavior and comparable viscosity to Durex<sup>®</sup> gel, as well as stable and resistant to sexual intercourse stress THC release profile [85].

D’Cruz et al. [172] described the usage of the self-emulsifying gel—Conceival for intravaginal delivery of lipophilic anti-HIV drugs. Further, McConville and Friend [99] developed SMEDDS-filled capsules for the vaginal administration of another HIV microbicide—a thiocarboxanilide non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (UC781). Prepared by McConville and Friend SMEDDS displayed rapid dispersion and enhanced UC781 release in sink conditions as compared to poorly soluble UC781 powder. The authors concluded that further studies are required for the optimization of the formulation size and UC781 content to tailor properties to intravaginal application.

Köllner et al. [105] developed SEDDS for vaginal delivery of curcumin as a potential anti-HPV agent. Curcumin is practically insoluble in water and has a high binding affinity to mucus, which hinders its absorption after administration on the mucosa. In vitro permeation tests of SEDDS with curcumin showed that  $\approx 15\%$  of the curcumin load penetrates mucus within 3 and  $\approx 35\%$  within 24 h after application proving SEDDS as potential intravaginal carriers for lipophilic, poorly soluble drugs.

#### 4.4. Other Diseases and Conditions

##### 4.4.1. Pre-Term Birth Prevention and Hormonal Therapy

The group of Otero-Espinar [81] proposed W/S emulsions with progesterone as the potential formulations for intravaginal drug administration. Rheological tests revealed higher bioadhesion and higher resistance of emulsion formulation to simulated vaginal discharges in relation to commercially available intravaginal gels. In vivo studies in postmenopausal and young rats have shown that after the application progesterone concentration in the uterine tissue was significantly higher in the group treated with the intravaginal W/S emulsion as compared to the group treated with commercial Crinone<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). During in vivo studies the progesterone accumulation in the uterus tissue was also observed due to the first uterine pass effect.

Patki et al. [87] obtained SNEDDS with 17- $\alpha$  hydroxyprogesterone caproate in the form of the solid vaginal tablet, providing a single-dose formulation that is easy to use and less invasive as compared to the injections. The dissolution rate of 17- $\alpha$  hydroxyprogesterone from the vaginal tablets was significantly higher as compared to free drug. The investigated tablets released 97% of hormone within 120 min of the dissolution test. In vivo studies in Swiss Webster mice showed that intravaginal administration of 17- $\alpha$  hydroxyprogesterone vaginal tablets with SNEDDS reduced the rate of pre-term births, presenting a safe alternative for hormonal drug injections.

Giusto et al. [88] developed SNEDDS-based vehicle for a Sphingosine kinase (SphK) inhibitor used in the prevention of lipopolysaccharide-induced pre-term birth in mice. The obtained SNEDDS formed a gel in contact with simulated vaginal discharge in situ without signs of precipitation. In the dissolution test, 94% of the drug was released from SNEDDS formulation within 30 min of the experiment as compared to less than 1% of neat API dissolved in the same time. In vivo studies in mice demonstrated significantly smaller number of pre-term births and steady uterus SphK concentration after SNEDDS application.

##### 4.4.2. Tumors and Autoimmunological Diseases

Frank et al. [78] obtained nanoemulsion with anti-HPV drug imiquimod for the treatment of cervical cancer. In vitro analysis of substance permeability confirmed that imiquimod in nanoemulsion formulation was able to penetrate porcine vaginal mucosa with a lower rate than free imiquimod, which in planned indication might be beneficial due to reduced vaginal irritation and risk of adverse effects. Additionally, imiquimod encapsulated in the emulsion-based formulation reduced the growth of cervical carcinoma cell line SiHa in vitro, proving its potential in the treatment of cervical cancer.

Wang et al. [103] developed a new intravaginal W/O/W multiple SMEDDS incorporated in the thermosensitive gel for the delivery of small nucleic acid in a gene-silencing



anti-HPV therapy. Authors have decided to encapsulate siRNA into the inner aqueous phase of W/O/W multiple SMEDDS to improve the stability of a labile active ingredient. Multiple W/O/W SMEDDS loaded with siRNA in contrast to other transfection carriers prevented inflammatory reactions in both in vitro and in vivo studies.

## 5. Conclusions and Future Perspective

The development of safe and effective emulsion-based multicompartiment vaginal drug formulations should acknowledge the anatomy and physiology of a vagina. The rheological properties, mucoadhesion, pH value, the droplet size of a dispersed phase and an effective dose should be carefully optimized to achieve prolonged retention time in the vaginal environment. The reported research is primarily focused on the identification of optimal formulation properties related to the application site characteristics. Within the emulsion-based multicompartiment vaginal drug carriers one can distinguish macro-, micro-, nano- and multiple emulsions as well as SEDDS and emulgels. Most commonly used lipophilic excipients include fatty acid ester derivatives and among the surfactants polysorbates and castor oil polyethylene glycol derivatives are used. Combination of these excipients is selected according to API solubility studies of emulsion-based formulations with higher drug capacity, small size of dispersed droplets and low or moderate polydispersity.

The analysis of vaginal formulation testing methods indicates variability in the researchers' approach to the selection of methodologies for the evaluation of formulation properties, e.g., type of applied method and the preference of apparatus and materials used. This results in difficulties in comparison between the properties and parameters of similar formulations reported by different groups. It would be advantageous to define a range of optimal parameter values for a specific type of formulation and a methodology for their assessment. The comprehensive evaluation of the in vitro physicochemical and pharmaceutical properties is important to explain clinical observations, enabling the selection of the optimal formulation as a consequence.

Based on the revised reports it can be concluded that Emulsion-based Vaginal Dosage Forms are promising drug carriers for local and systemic application of antimicrobial and anticancer agents. Moreover, their use in the prevention of sexually transmitted diseases and premature births achieved high therapeutic efficacy and a favorable safety profile. EVDF, due to the easily adjustable properties, i.e., method of administration, low volume, adhesiveness, viscosity, selective local drug activity, can also be considered as vaginal pediatric formulations. Furthermore, the presented review has demonstrated that there is a need for randomized clinical trials that would confirm the therapeutic benefits of the most promising EVDF formulations.

**Author Contributions:** Conceptualization K.M.-J., M.S., K.P.N. and B.K.; resources, B.K. and K.M.-J.; writing—original draft preparation, M.S., B.K. and K.M.-J.; writing—review and editing, B.K., K.P.N. and A.M.G.; visualization, M.S., B.K., K.M.-J. and K.P.N.; supervision, K.M.-J. and B.K.; project administration, M.S. and B.K. funding acquisition, K.M.-J. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Wroclaw Medical University, SIMPLE system number: STM.D140.20.067.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** Aleksandra Dyba is acknowledge for proofreading and linguistic corrections of the final version of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Brannon-Peppas, L. Novel vaginal drug release applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *11*, 169–177. [[CrossRef](#)]
2. Mallipeddi, R.; Rohan, L.C. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 37–48. [[CrossRef](#)]
3. Caramella, C.M.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M.C.; Sandri, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 39–52. [[CrossRef](#)]
4. D’Cruz, O.J.; Uckun, F.M. Vaginal microbicides and their delivery platforms. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 723–740. [[CrossRef](#)]
5. das Neves, J.; Bahia, M.F. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **2006**, *318*, 1–14. [[CrossRef](#)]
6. Bassi, P.; Kaur, G. Innovations in bioadhesive vaginal drug delivery system. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 1019–1032. [[CrossRef](#)]
7. Major, I.; McConville, C. Vaginal drug delivery for the localised treatment of cervical cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2017**, *7*, 817–828. [[CrossRef](#)]
8. Machado, R.M.; Palmeira-De-Oliveira, A.; Martinez-De-Oliveira, J.; Palmeira-De-Oliveira, R. Vaginal Films for Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2069–2081. [[CrossRef](#)]
9. Rohan, L.C.; Sassi, A.B. Vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *AAPS J.* **2009**, *11*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. De Araújo Pereira, R.R.; Bruschi, M.L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2012**, *38*, 643–652. [[CrossRef](#)]
11. Hussain, A.; Ahsan, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 301–313. [[CrossRef](#)]
12. Srikrishna, S.; Cardozo, L. The vagina as a route for drug delivery: A review. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* **2013**, *24*, 537–543. [[CrossRef](#)]
13. Valenta, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1692–1712. [[CrossRef](#)]
14. Das Neves, J.; Palmeira-De-Oliveira, R.; Palmeira-De-Oliveira, A.; Rodrigues, F.; Sarmiento, B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. In *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*; Khutoryanskiy, V.V., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2014; Volume 9781119941, pp. 99–132. ISBN 9781118794203.
15. Palmeira-de-Oliveira, R.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Martinez-de-Oliveira, J. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 105–122. [[CrossRef](#)]
16. Bruska, M. Anatomia czynnościowa i topograficzna narządów płciowych. In *Ginekologia. Podręcznik dla Położnych, Pielęgniarek i Fizjoterapeutów*; Opala, T., Ed.; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, Poland, 2003; pp. 30–31. ISBN 83-200-3353-5.
17. Funt, M.I.; Thompson, J.D.; Birch, H. Normal Vaginal Axis. *South. Med. J.* **1978**, *71*, 1534–1535. [[CrossRef](#)]
18. Anderson, J.R.; Genadry, R. Anatomy and Embryology. In *Berek & Novak’s Gynecology*; Berek, J.S., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 75–128. ISBN 978-0-78176-805-4.
19. Valea, F.A. Reproductive Anatomy Gross and Microscopic, Clinical Correlations. In *Comprehensive Gynecology*; Lobo, R.A., Gershenson, D.M., Lentz, G.M., Valea, F.A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2017; pp. 48–77. ISBN 978-0-323-32287-4.
20. Bulletti, C.; De Ziegler, D.; Flamigni, C.; Giacomucci, E.; Polli, V.; Bolelli, G.; Franceschetti, F. Targeted drug delivery in gynaecology: The first uterine pass effect. *Hum. Reprod.* **1997**, *12*, 1073–1079. [[CrossRef](#)]
21. Alexander, N.J.; Baker, E.; Kaptein, M.; Karck, U.; Miller, L.; Zampaglione, E. Why consider vaginal drug administration? *Fertil. Steril.* **2004**, *82*, 1–12. [[CrossRef](#)]
22. Wing, D.A.; Rahall, A.; Jones, M.M.; Goodwin, T.M.; Paul, R.H. Misoprostol: An effective agent for cervical ripening and labor induction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1995**, *172*, 1811–1816. [[CrossRef](#)]
23. Katz, D.F.; Yuan, A.; Gao, Y. Vaginal drug distribution modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pastor, Z.; Chmel, R. Differential diagnostics of female “sexual” fluids: A narrative review. *Int. Urogynecol. J.* **2018**, *29*, 621–629. [[CrossRef](#)]
25. Miller, E.A.; Beasley, D.A.E.; Dunn, R.R.; Archie, E.A. Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1936. [[CrossRef](#)]
26. Gorodeski, G.I.; Hopfer, U.; Liu, C.C.; Margles, E. Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells. *Endocrinology* **2005**, *146*, 816–824. [[CrossRef](#)]
27. Mania-Pramanik, J.; Kerkar, S.C.; Mehta, P.B.; Potdar, S.; Salvi, V.S. Use of vaginal pH in diagnosis of infections and its association with reproductive manifestations. *J. Clin. Lab. Anal.* **2008**, *22*, 375–379. [[CrossRef](#)]
28. Tucker, K.M.; Godha, K.; Mirkin, S.; Archer, D.F. Vaginal pH: A simple assessment highly correlated with vaginal morphology and symptoms in postmenopausal women. *Menopause* **2018**, *25*, 762–766. [[CrossRef](#)]
29. Hainer, B.L.; Gibson, M.V. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am. Fam. Physician* **2011**, *83*, 807–815.
30. Godha, K.; Tucker, K.M.; Biehl, C.; Archer, D.F.; Mirkin, S. Human vaginal pH and microbiota: An update. *Gynecol. Endocrinol.* **2018**, *34*, 451–455. [[CrossRef](#)]
31. Kitaya, K.; Nagai, Y.; Arai, W.; Sakuraba, Y.; Ishikawa, T. Characterization of microbiota in endometrial fluid and vaginal secretions in infertile women with repeated implantation failure. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 1–10. [[CrossRef](#)]
32. Noguchi, T.; Sado, T.; Naruse, K.; Kobayashi, H. Vaginal fluid pH and buffer capacity for predicting false preterm labor in Japanese women. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2016**, *134*, 69–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Machado, R.M.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Gaspar, C.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira, R. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 14–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Koedooder, R.; Mackens, S.; Budding, A.; Fares, D.; Blockeel, C.; Laven, J.; Schoenmakers, S. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum. Reprod. Update* **2019**, *25*, 298–325. [[CrossRef](#)]
35. Shipitsyna, E.; Roos, A.; Datcu, R.; Hallén, A.; Fredlund, H.; Jensen, J.S.; Engstrand, L.; Unemo, M. Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age—Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible? *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lamont, R.; Sobel, J.; Akins, R.; Hassan, S.; Chaiworapongsa, T.; Kusanovic, J.; Romero, R. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2011**, *118*, 533–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Aroutcheva, A.; Gariti, D.; Simon, M.; Shott, S.; Faro, J.; Simoes, J.A.; Gurguis, A.; Faro, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2001**, *185*, 375–379. [[CrossRef](#)]
38. Donders, G.G.; Zozdika, J.; Rezeberga, D. Treatment of bacterial vaginosis: What we have and what we miss. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 645–657. [[CrossRef](#)]
39. Kamińska, D.; Gajecka, M. Is the role of human female reproductive tract microbiota underestimated? *Benef. Microbes* **2017**, *8*, 327–343. [[CrossRef](#)]
40. Haque, M.M.; Merchant, M.; Kumar, P.N.; Dutta, A.; Mande, S.S. First-trimester vaginal microbiome diversity: A potential indicator of preterm delivery risk. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16145. [[CrossRef](#)]
41. Romero, R.; Hassan, S.S.; Gajer, P.; Tarca, A.L.; Fadrosh, D.W.; Nikita, L.; Galuppi, M.; Lamont, R.F.; Chaemsaitong, P.; Miranda, J.; et al. Correction to: The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* **2014**, *2*, 10. [[CrossRef](#)]
42. Matsumoto, A.; Yamagishi, Y.; Miyamoto, K.; Oka, K.; Takahashi, M.; Mikamo, H. Characterization of the vaginal microbiota of Japanese women. *Anaerobe* **2018**, *54*, 172–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hernandez, C.; Silveira, P.; Rodrigues Sereia, A.F.; Christoff, A.P.; Mendes, H.; de Oliveira, L.F.V.; Podgaec, S. Microbiome profile of deep endometriosis patients: Comparison of vaginal fluid, endometrium and lesion. *Diagnostics* **2020**, *10*, 163. [[CrossRef](#)]
44. Bruning, E.; Chen, Y.; McCue, K.A.; Rubino, J.R.; Wilkinson, J.E.; Brown, A.D.G. A 28 day clinical assessment of a lactic acid-containing antimicrobial intimate gel wash formulation on skin tolerance and impact on the vulvar microbiome. *Antibiotics* **2020**, *9*, 55. [[CrossRef](#)]
45. WHO; UNFPA; FHI. *Advisory Note Use and Procurement of Additional Lubricants for Male and Female Condoms: WHO/UNFPA/FHI360 Advisory Note*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
46. Machado, R.M.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira, R. Vaginal semisolid products: Technological performance considering physiologic parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *109*, 556–568. [[CrossRef](#)]
47. Ensign, L.M.; Hoen, T.E.; Maisel, K.; Cone, R.A.; Hanes, J.S. Enhanced vaginal drug delivery through the use of hypotonic formulations that induce fluid uptake. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6922–6929. [[CrossRef](#)]
48. Lacey, C.J.; Woodhall, S.; Qi, Z.; Sawant, S.; Cowen, M.; McCormack, S.; Jiang, S. Unacceptable side-effects associated with a hyperosmolar vaginal microbicide in a phase 1 trial. *Int. J. STD AIDS* **2010**, *21*, 714–717. [[CrossRef](#)]
49. Lai, S.K.; O'Hanlon, D.E.; Harrold, S.; Man, S.T.; Wang, Y.-Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1482–1487. [[CrossRef](#)]
50. Kraft, J.C.; Freeling, J.P.; Wang, Z.; Ho, R.J.Y. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 29–52. [[CrossRef](#)]
51. Ensign, L.M.; Cone, R.; Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 557–570. [[CrossRef](#)]
52. Frey, B.A.; Giannasca, K.T.; Giannasca, P.; Hubert, R.; Lencer, W.I.; Neutra, M.R. From the Department of Pediatrics, Harvard Medical School and GI Cell Biology Laboratory, Children's Hospital, Boston, Massachusetts 02115. *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1045–1059. [[CrossRef](#)]
53. Ponchel, G.; Montisci, M.-J.; Dembri, A.; Durrer, C.; Duchêne, D. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1997**, *44*, 25–31. [[CrossRef](#)]
54. Dünnhaupt, S.; Kammona, O.; Waldner, C.; Kiparissides, C.; Bernkop-Schnürch, A. Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 447–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, Y.-Y.; Lai, S.K.; Suk, J.S.; Pace, A.; Cone, R.; Hanes, J. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles that “Slip” through the Human Mucus Barrier. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 9726–9729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sigurdsson, H.H.; Kirch, J.; Lehr, C.-M. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wong, P.T.; Wang, S.H.; Ciotti, S.; Makidon, P.E.; Smith, D.M.; Fan, Y.; Schuler, C.F.; Baker, J.R. Formulation and Characterization of Nanoemulsion Intranasal Adjuvants: Effects of Surfactant Composition on Mucoadhesion and Immunogenicity. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 531–544. [[CrossRef](#)]
58. Everett, D.H. Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1972**, *31*, 577–638. [[CrossRef](#)]
59. Emulsion. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; Nič, M.; Jiráč, J.; Košata, B.; Jenkins, A.; McNaught, A. (Eds.) IUPAC: Research Triangle Park, NC, USA, 2009; ISBN 0-9678550-9-8.
60. Danielsson, I.; Lindman, B. The definition of microemulsion. *Colloids Surf.* **1981**, *3*, 391–392. [[CrossRef](#)]



61. Sanfeld, A.; Steinchen, A. Emulsions stability, from dilute to dense emulsions—Role of drops deformation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *140*, 1–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10*, 102–110. [[CrossRef](#)]
63. Friberg, S.E. Comments on “the definition of microemulsion”. *Colloids Surf.* **1982**, *4*, 201. [[CrossRef](#)]
64. Lawrence, M.J.; Rees, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *45*, 89–121. [[CrossRef](#)]
65. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 978–985. [[CrossRef](#)]
66. McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729. [[CrossRef](#)]
67. Lu, Y.; Qi, J.; Wu, W. Absorption, Disposition and Pharmacokinetics of Nanoemulsions. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 396–417. [[CrossRef](#)]
68. Muschiolik, G.; Scherze, I.; Preissler, P.; Weiß, J.; Knoth, A.; Fechner, A. Multiple Emulsions—Preparation and Stability. In Proceedings of the 13th World Congress of Food Science & Technology, Nantes, France, 17–21 September 2006; EDP Sciences: Les Ulis, France, 2006.
69. Raynal, S.; Grossiord, J.L.; Seiller, M.; Clausse, D. A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: Formulation, characterization and study of release. *J. Control. Release* **1993**, *26*, 129–140. [[CrossRef](#)]
70. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841. [[CrossRef](#)]
71. Talegaonkar, S.; Azeem, A.; Ahmad, F.; Khar, R.; Pathan, S.; Khan, Z. Microemulsions: A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2008**, *2*, 238–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Pouton, C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *25*, 47–58. [[CrossRef](#)]
73. Laffleur, F.; Bernkop-Schnürch, A. Strategies for improving mucosal drug delivery. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 2061–2075. [[CrossRef](#)]
74. Song, R.; Yan, F.; Cheng, M.; Dong, F.; Lin, Y.; Wang, Y.; Song, B. Ultrasound-assisted preparation of exopolysaccharide/nystatin nanoemulsion for treatment of vulvovaginal candidiasis. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 2027–2044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. dos Santos Ramos, M.A.; Da Silva, P.B.; De Toledo, L.G.; Oda, F.B.; Da Silva, I.C.; dos Santos, L.C.; dos Santos, A.G.; De Almeida, M.T.G.; Pavan, F.R.; Chorilli, M.; et al. Intravaginal delivery of syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland fraction based on a nanoemulsion system applied to vulvovaginal candidiasis treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2019**, *15*, 1072–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. D’Cruz, O.J.; Uckun, F.M. Vaginal contraceptive activity of a chelated vanadocene. *Contraception* **2005**, *72*, 146–156. [[CrossRef](#)]
77. D’Cruz, O.J.; Uckun, F.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception* **2001**, *64*, 113–123. [[CrossRef](#)]
78. Frank, L.A.; Gazzi, R.P.; Mello, P.A.; Chaves, P.; Peña, F.; Beck, R.C.R.; Buffon, A.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Anti-HPV Nanoemulsified-Imiquimod: A New and Potent Formulation to Treat Cervical Cancer. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 54. [[CrossRef](#)]
79. Atinderpal, K.; Kapoor, N.; Gupta, S.; Tyag, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Gabrani, R.; Dang, S. Development and Characterization of Green Tea Catechins and Ciprofloxacin-loaded Nanoemulsion for Intravaginal Delivery to Treat Urinary Tract Infection. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 442–452. [[CrossRef](#)]
80. Campaña-Seoane, M.; Pérez-Gago, A.; Vázquez, G.; Conde, N.; González, P.; Martínez, A.; Martínez, X.; García Varela, L.; Herranz, M.; Aguiar, P.; et al. Vaginal residence and pharmacokinetic preclinical study of topical vaginal mucoadhesive W/S emulsions containing ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* **2019**, *554*, 276–283. [[CrossRef](#)]
81. Campaña-Seoane, M.; Peleteiro, A.; Laguna, R.; Otero-Espinar, F.J. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. *Int. J. Pharm.* **2014**, *477*, 495–505. [[CrossRef](#)]
82. Bachhav, Y.G.; Patravale, V.B. Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: Formulation, in vitro evaluation, and stability studies. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 476–481. [[CrossRef](#)]
83. Abu-Azzam, O.; Nasr, M. In vitro anti-inflammatory potential of phloretin microemulsion as a new formulation for prospective treatment of vaginitis. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 930–935. [[CrossRef](#)]
84. Bachhav, Y.G.; Patravale, V.B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* **2009**, *365*, 175–179. [[CrossRef](#)]
85. Mirani, A.; Kundaikar, H.; Velhal, S.; Patel, V.; Bandivdekar, A.; Degani, M.; Patravale, V. Tetrahydrocurcumin-loaded vaginal nanomicrobicide for prophylaxis of HIV/AIDS: In silico study, formulation development, and in vitro evaluation. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2019**, *9*, 828–847. [[CrossRef](#)]
86. Patel, A.; Patel, J. Mucoadhesive Microemulsion Based Prolonged Release Vaginal Gel for Anti-Fungal Drug. *Am. J. Pharma Tech. Res.* **2012**, *2*, 650–661.
87. Patki, M.; Giusto, K.; Gorasiya, S.; Reznik, S.E.; Patel, K. 17- $\alpha$  Hydroxyprogesterone Nanoemulsifying Preconcentrate-Loaded Vaginal Tablet: A Novel Non-Invasive Approach for the Prevention of Preterm Birth. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 335. [[CrossRef](#)]
88. Giusto, K.; Patki, M.; Koya, J.; Ashby, C.R.; Munnangi, S.; Patel, K.; Reznik, S.E. A vaginal nanoformulation of a SphK inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced preterm birth in mice. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 2835–2851. [[CrossRef](#)]

89. Soriano-Ruiz, J.L.; Suñer-Carbó, J.; Calpena-Campmany, A.C.; Bozal-de Febrer, N.; Halbaut-Bellowa, L.; Boix-Montañés, A.; Souto, E.B.; Clares-Naveros, B. Clotrimazole multiple W/O/W emulsion as anticandidal agent: Characterization and evaluation on skin and mucosae. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 166–174. [[CrossRef](#)]
90. Khattab, A.; Ismail, S. Formulation and evaluation of oxiconazole nitrate mucoadhesive nanoemulsion based gel for treatment of fungal vaginal infection. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *8*, 33–40.
91. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Capmany, A.C.; Cañadas-Enrich, C.; Febrer, N.B.-D.; Suñer-Carbó, J.; Souto, E.B.; Clares-Naveros, B. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *Int. J. Pharm.* **2019**, *554*, 105–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kaur, A.; Gupta, S.; Tyagi, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Gabrani, R.; Dang, S. Development of nanoemulsion based gel loaded with phytoconstituents for the treatment of urinary tract infection and in vivo biodistribution studies. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 611–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. dos Santos, M.K.; Kreutz, T.; Danielli, L.J.; De Marchi, J.G.B.; Pippi, B.; Koester, L.S.; Fuentefria, A.M.; Limberger, R.P. A chitosan hydrogel-thickened nanoemulsion containing Pelargonium graveolens essential oil for treatment of vaginal candidiasis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *56*, 101527. [[CrossRef](#)]
94. Mirza, M.A.; Ahmad, S.; Mallick, M.N.; Manzoor, N.; Talegaonkar, S.; Iqbal, Z. Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: An in vitro, in vivo evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 275–282. [[CrossRef](#)]
95. Srivastava, N.; Patel, D.K.; Rai, V.K.; Pal, A.; Yadav, N.P. Development of emulgel formulation for vaginal candidiasis: Pharmaceutical characterization, in vitro and in vivo evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *48*, 490–498. [[CrossRef](#)]
96. Gündel, S.D.S.; de Godoi, S.N.; Santos, R.C.V.; da Silva, J.T.; Leite, L.B.D.M.; Amaral, A.C.; Ourique, A.F. In vivo antifungal activity of nanoemulsions containing eucalyptus or lemongrass essential oils in murine model of vulvovaginal candidiasis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *57*, 101762. [[CrossRef](#)]
97. Pandit, A.; Kedar, A.; Koyate, K. Hollow pessary loaded with lawsone via self-microemulsifying drug delivery system for vaginal candidiasis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 101955. [[CrossRef](#)]
98. Kaur, A.; Saxena, Y.; Bansal, R.; Gupta, S.; Tyagi, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Panda, A.K.; Gabrani, R.; Dang, S. Intravaginal Delivery of Polyphenon 60 and Curcumin Nanoemulsion Gel. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18*, 2188–2202. [[CrossRef](#)]
99. McConville, C.; Friend, D. Development and characterisation of a self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) for the vaginal administration of the antiretroviral UC-781. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *83*, 322–329. [[CrossRef](#)]
100. D’Cruz, O.J.; Yiv, S.H.; Waurzyniak, B.; Uckun, F.M. Contraceptive efficacy and safety studies of a novel microemulsion-based lipophilic vaginal spermicide. *Fertil. Steril.* **2001**, *75*, 115–124. [[CrossRef](#)]
101. Tedajo, G.M.; Bouttier, S.; Grossiord, J.L.; Marty, J.P.; Seiller, M.; Fourniat, J. In vitro microbicidal activity of W/O/W multiple emulsion for vaginal administration. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2002**, *20*, 50–56. [[CrossRef](#)]
102. Özer, Ö.; Özyazici, M.; Tedajo, M.; Taner, M.S.; Köseoglu, K. W/O/W multiple emulsions containing nitroimidazole derivatives for vaginal delivery. *Drug Deliv.* **2007**, *14*, 139–145. [[CrossRef](#)]
103. Wang, J.; Wang, Y.; Wang, Z.; Wang, F.; He, J.; Yang, X.; Xie, W.; Liu, Y.; Zhang, Y. A thermosensitive gel based on w1/o/w2 multiple microemulsions for the vaginal delivery of small nucleic acid. *Drug Deliv.* **2019**, *26*, 168–178. [[CrossRef](#)]
104. Tedajo, G.M.; Bouttier, S.; Fourniat, J.; Grossiord, J.L.; Marty, J.P.; Seiller, M. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 63–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Köllner, S.; Nardin, I.; Markt, R.; Griesser, J.; Prüfert, F.; Bernkop-Schnürch, A. Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *115*, 268–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Perioli, L.; Ambrogio, V.; Venezia, L.; Giovagnoli, S.; Pagano, C.; Rossi, C. Formulation studies of benzydamine mucoadhesive formulations for vaginal administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 769–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Griffin, W.C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, *1*, 311.
108. Pavoni, L.; Perinelli, D.R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G.F. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 135. [[CrossRef](#)]
109. Rao, J.; McClements, D.J. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5026–5035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Nazir, H.; Zhang, W.; Liu, Y.; Chen, X.; Wang, L.; Naseer, M.M.; Ma, G. Silicone oil emulsions: Strategies to improve their stability and applications in hair care products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2014**, *36*, 124–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Vieira, O.V.; Hartmann, D.O.; Cardoso, C.M.P.; Oberdoerfer, D.; Baptista, M.; Santos, M.A.S.; Almeida, L.; Ramalho-Santos, J.; Vaz, W.L.C. Surfactants as microbicides and contraceptive agents: A systematic In Vitro study. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Inácio, Á.S.; Mesquita, K.A.; Baptista, M.; Ramalho-Santos, J.; Vaz, W.L.C.; Vieira, O.V. In vitro surfactant structure-toxicity relationships: Implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Niruthisard, S.; Roddy, R.E.; Chutivongse, S. The effects of frequent nonoxynol-9 use on the vaginal and cervical mucosa. *Sex. Transm. Dis.* **1991**, *18*, 176–179. [[CrossRef](#)]
114. Jirwankar, P.; Gobbooru, S.; Shao, J. Self-Emulsified Nanoemulsion for Vaginal Administration: In Vitro Study of Effect on Lactobacillus acidophilus. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 3145–3152. [[CrossRef](#)]

115. Rahman, M.A.; Hussain, A.; Hussain, M.S.; Mirza, M.A.; Iqbal, Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 1–19. [CrossRef]
116. Zeng, L.; Xin, X.; Zhang, Y. Development and characterization of promising Cremophor EL-stabilized o/w nanoemulsions containing short-chain alcohols as a cosurfactant. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 19815–19827. [CrossRef]
117. Djekic, L.; Primorac, M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int. J. Pharm.* **2008**, *352*, 231–239. [CrossRef]
118. Zhang, M.; Yang, B.; Liu, W.; Li, S. Influence of hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose, gelatin, poloxamer 407 and poloxamer 188 on the formation and stability of soybean oil-in-water emulsions. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, *12*, 521–531. [CrossRef]
119. Surh, J.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 596–606. [CrossRef]
120. Said dos Santos, R.; Rosseto, H.C.; Bassi da Silva, J.; Vecchi, C.F.; Caetano, W.; Bruschi, M.L. The effect of carbomer 934P and different vegetable oils on physical stability, mechanical and rheological properties of emulsion-based systems containing propolis. *J. Mol. Liq.* **2020**, *307*, 112969. [CrossRef]
121. Mou, D.; Chen, H.; Du, D.; Mao, C.; Wan, J.; Xu, H.; Yang, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **2008**, *353*, 270–276. [CrossRef]
122. Perez-Moral, N.; Watt, S.; Wilde, P. Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. *Food Hydrocoll.* **2014**, *42*, 215–222. [CrossRef]
123. Sato, A.C.K.; Moraes, K.E.F.P.; Cunha, R.L. Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. *Food Hydrocoll.* **2014**, *34*, 184–192. [CrossRef]
124. Ashara, K.C.; Paun, J.S.; Soniwala, M.M.; Chavda, J.R.; Mendapara, V.P.; Mori, N.M. Microemulgel: An overwhelming approach to improve therapeutic action of drug moiety. *Saudi Pharm. J.* **2016**, *24*, 452–457. [CrossRef]
125. Debeli, D.K.; Lin, C.; Mekbib, D.B.; Hu, L.; Deng, J.; Gan, L.; Shan, G. Controlling the Stability and Rheology of Copolyol Dispersions in Fatty Alcohol Ethoxylate (AEO9)-Stabilized Multiple Emulsions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, *59*, 18307–18317. [CrossRef]
126. Rai, V.K.; Mishra, N.; Yadav, K.S.; Yadav, N.P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 203–225. [CrossRef]
127. Ph. Eur. 10.0, 1164 (01/2008). Available online: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> (accessed on 11 June 2021).
128. Nakamura, F.; Ohta, R.; Machida, Y.; Nagai, T. In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers. *Int. J. Pharm.* **1996**, *134*, 173–181. [CrossRef]
129. Gué, E.; Since, M.; Ropars, S.; Herbinet, R.; Le Pluart, L.; Malzert-Fréon, A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int. J. Pharm.* **2016**, *498*, 49–65. [CrossRef] [PubMed]
130. Van Der Pol, E.; Hoekstra, A.G.; Sturk, A.; Otto, C.; Van Leeuwen, T.G.; Nieuwland, R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 2596–2607. [CrossRef] [PubMed]
131. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Davarani, F.H.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [CrossRef] [PubMed]
132. Silva, H.D.; Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *J. Food Eng.* **2015**, *167*, 89–98. [CrossRef]
133. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. [CrossRef] [PubMed]
134. Edsman, K.; Hägerström, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 3–22. [CrossRef]
135. Tietz, K.; Klein, S. Simulated Genital Tract Fluids and Their Applicability in Drug Release/Dissolution Testing of Vaginal Dosage Forms. *Dissolut. Technol.* **2018**, *25*, 40–51. [CrossRef]
136. Gurpret, K.; Singh, S.K. Singh Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 781–789. [CrossRef]
137. Dissolution Test USP 28, 2nd Supplement, Official 1 August 2005. Available online: [https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q01\\_pf\\_ira\\_33\\_4\\_2007.pdf](https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q01_pf_ira_33_4_2007.pdf) (accessed on 11 June 2021).
138. Ph. Eur. 10.0, 20903 (01/2016). Available online: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> (accessed on 11 June 2021).
139. Salamanca, C.H.; Barrera-Ocampo, A.; Lasso, J.C.; Camacho, N.; Yarce, C.J. Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 148. [CrossRef]
140. Lirio, J.; Giraldo, P.C.; Amaral, R.L.; Sarmiento, A.C.A.; Costa, A.P.F.; Goncalves, A.K. Antifungal (oral and vaginal) therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review protocol. *BMJ Open* **2019**, *9*, e027489. [CrossRef]
141. Kendirci, M.; Koç, A.N.; Kurtoglu, S.; Keskin, M.; Kuyucu, T. Vulvovaginal candidiasis in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2004**, *17*, 1545–1549. [CrossRef] [PubMed]
142. Denning, D.W.; Kneale, M.; Sobel, J.D.; Rautemaa-Richardson, R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e339–e347. [CrossRef]



143. Foxman, B.; Muraglia, R.; Dietz, J.P.; Sobel, J.D.; Wagner, J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: Results from an internet panel survey. *J. Low. Genit. Tract Dis.* **2013**, *17*, 340–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Bhesania, A.H.; Narayankhedkar, A. Vulvovaginal Candidosis. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 240–250. [[CrossRef](#)]
145. Konadu, D.G.; Owusu-Ofori, A.; Yidana, Z.; Boadu, F.; Iddrisu, L.F.; Adu-Gyasi, D.; Dosoo, D.; Awuley, R.L.; Owusu-Agyei, S.; Asante, K.P. Prevalence of vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and trichomoniasis in pregnant women attending antenatal clinic in the middle belt of Ghana. *BMC Pregnancy Childbirth* **2019**, *19*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Kovács, K.; Stampf, G.; Klebovich, I.; Antal, I.; Ludányi, K. Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *36*, 352–358. [[CrossRef](#)]
147. Bhesaniya, K.; Nandha, K.; Baluja, S. Thermodynamics of fluconazole solubility in various solvents at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59*, 649–652. [[CrossRef](#)]
148. Kracht, T.; Müller-Goymann, C.C. Antifungal efficacy of liquid poloxamer 407-based emulsions loaded with sertaconazole nitrate. *Int. J. Pharm.* **2020**, *585*, 119400. [[CrossRef](#)]
149. Ferreira, P.G.; Noronha, L.; Teixeira, R.; Vieira, I.; Borba-Santos, L.P.; Viçosa, A.; de Moraes, M.; Calil-Elias, S.; de Freitas, Z.; da Silva, F.C.; et al. Investigation of a Microemulsion Containing Clotrimazole and Itraconazole for Transdermal Delivery for the Treatment of Sporotrichosis. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 1026–1034. [[CrossRef](#)]
150. Talaat, S.M.; Elnaggar, Y.S.R.; Abdalla, O.Y. Lecithin Microemulsion Lipogels Versus Conventional Gels for Skin Targeting of Terconazole: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Investigation. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 161. [[CrossRef](#)]
151. Tiwari, N.; Sivakumar, A.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Enhanced antifungal activity of Ketoconazole using rose oil based novel microemulsion formulation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *47*, 434–444. [[CrossRef](#)]
152. Suñer-Carbó, J.; Boix-Montañés, A.; Halbaut-Bellowa, L.; Velázquez-Carralero, N.; Zamarbide-Ledesma, J.; Bozal-de-Febrer, N.; Calpena-Campmany, A.C. Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion. *Mycoses* **2017**, *60*, 166–177. [[CrossRef](#)]
153. Suyal, J.; Bhatt, G.; Singh, N. Formulation and evaluation of nanoemulsion for enhanced bioavailability of itraconazole. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2018**, *9*, 2927–2931. [[CrossRef](#)]
154. Coneac, G.; Vlaia, V.; Olariu, I.; Muț, A.M.; Anghel, D.F.; Ilie, C.; Popoiu, C.; Lupuleasa, D.; Vlaia, L. Development and Evaluation of New Microemulsion-Based Hydrogel Formulations for Topical Delivery of Fluconazole. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 889–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. De Campos, V.E.B.; Cerqueira-Coutinho, C.S.; Capella, F.N.C.; Soares, B.G.; Holandino, C.; Mansur, C.R.E. Development and in vitro assessment of nanoemulsion for delivery of ketoconazole against *Candida albicans*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, *17*, 4623–4630. [[CrossRef](#)]
156. Ebenazer, A.; Franklyne, J.S.; Tiwari, N.; Ch, P.A.R.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. In Vivo Testing and Extended Drug Release of Chitosan-Coated Itraconazole Loaded Microemulsion Using Volatile Oil *Thymus vulgaris*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2020**, *30*, 279–289. [[CrossRef](#)]
157. Kaewbanjong, J.; Heng, P.W.S.; Boonme, P. Clotrimazole microemulsion and microemulsion-based gel: Evaluation of buccal drug delivery and irritancy using chick chorioallantoic membrane as the model. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1716–1723. [[CrossRef](#)]
158. Banerjee, K.; Curtis, E.; De San Lazaro, C.; Graham, J.C. Low prevalence of genital candidiasis in children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *23*, 696–698. [[CrossRef](#)]
159. Shapiro, R.A.; Schubert, C.J.; Siegel, R.M. Neisseria gonorrhoea infections in girls younger than 12 years of age evaluated for vaginitis. *Pediatrics* **1999**, *104*, e72. [[CrossRef](#)]
160. Giugno, S.; Rizzo, P.; Ocampo, D.; Rahman, G.; Rubinstein, D.A. Vulvovaginitis in a pediatric population: Relationship among etiologic agents, age and Tanner staging of breast development. *Arch. Argent. Pediatr.* **2014**, *112*, 65–70. [[CrossRef](#)]
161. Randelović, G.; Mladenović, V.; Ristić, L.; Otašević, S.; Branković, S.; Mladenović-Antić, S.; Bogdanović, M.; Bogdanović, D. Microbiological aspects of vulvovaginitis in prepubertal girls. *Eur. J. Pediatr.* **2012**, *171*, 1203–1208. [[CrossRef](#)]
162. Jones, R. Childhood vulvovaginitis and vaginal discharge in general practice. *Fam. Pract.* **1996**, *13*, 369–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Cox, R.A. *Haemophilus influenzae*: An underrated cause of vulvovaginitis in young girls. *J. Clin. Pathol.* **1997**, *50*, 765–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Bumbuliene, Ž.; Venclavičiute, K.; Ramašauskaite, D.; Arlauskiene, A.; Bumbul, E.; Drasutiene, G. Microbiological findings of vulvovaginitis in prepubertal girls. *Postgrad. Med. J.* **2014**, *90*, 8–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Yilmaz, A.E.; Celik, N.; Soyulu, G.; Donmez, A.; Yuksel, C. Comparison of clinical and microbiological features of vulvovaginitis in prepubertal and pubertal girls. *J. Formos. Med. Assoc.* **2012**, *111*, 392–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Africa, C.W. Efficacy of methods used for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Expert Opin. Med. Diagn.* **2013**, *7*, 189–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Amsel, R.; Totten, P.A.; Spiegel, C.A.; Chen, K.C.S.; Eschenbach, D.; Holmes, K.K. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* **1983**, *74*, 14–22. [[CrossRef](#)]
168. Silva Cunha, A.; Grossiord, J.L.; Seiller, M. Pharmaceutical applications. In *Multiple Emulsions: Structure, Properties and Applications*; Grossiord, J.L., Seiller, M., Eds.; Editions de Sante: Paris, France, 1996; pp. 279–312. ISBN 9782864111191.




169. Morimoto, Y.; Sugibayashi, K.; Yamaguchi, Y.; Kato, Y. Detoxication capacity of a multiple (w/o/w) emulsion for the treatment of drug overdose: Drug extraction into the emulsion in the gastro-intestinal tract of rabbits. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 3188–3192. [[CrossRef](#)]
170. Trussell, J.; Kost, K. Contraceptive Failure in the United States: A Critical Review of the Literature. *Stud. Fam. Plann.* **1987**, *18*, 237. [[CrossRef](#)]
171. Weir, S.S.; Roddy, R.E.; Zekeng, L.; Feldblum, P.J. Nonoxynol-9 use, genital ulcers, and HIV infection in a cohort of sex workers. *Genitourin. Med.* **1995**, *71*, 78–81. [[CrossRef](#)]
172. D’Cruz, O.J.; Samuel, P.; Uckun, F.M. Conceival, a novel noncontraceptive vaginal vehicle for lipophilic microbicides. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, E56–E64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## II. Publikacja B

**Smoleński Michał**, Muschert Susanne\*, Haznar-Garbacz Dorota, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: *Nanoemulsion loaded with clotrimazole based on rapeseed oil for potential vaginal application – development, initial assessment, and pilot release studies*, *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, nr 5, art.1437 [24 s.], DOI:10.3390/pharmaceutics15051437

## Article

# Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies

Michał Smoleński <sup>1</sup>, Susanne Muschert <sup>2,\*</sup>, Dorota Haznar-Garbacz <sup>1</sup>  
and Katarzyna Małolepsza-Jaromłowska <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Drug Form Technology, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211A, 50-556 Wrocław, Poland

<sup>2</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008, F-59000 Lille, France

\* Correspondence: susanne.muschert@univ-lille.fr

**Abstract:** Vaginal candidiasis (VC) is an emerging global hardly treated health issue affecting millions of women worldwide. In this study, the nanoemulsion consisting of clotrimazole (CLT), rapeseed oil, Pluronic F-68, Span 80, PEG 200, and lactic acid was prepared using high-speed and high-pressure homogenization. Yielded formulations were characterized by an average droplet size of 52–56 nm, homogenous size distribution by volume, and a polydispersity index (PDI) < 0.2. The osmolality of nanoemulsions (NEs) fulfilled the recommendations of the WHO advisory note. NEs were stable throughout 28 weeks of storage. The stationary and dynamic (USP apparatus IV) pilot study of the changes of free CLT over time for NEs, as well as market cream and CLT suspension as references, were conducted. Test results of the changes in the amount of free CLT released from the encapsulated form were not coherent; in the stationary method, NEs yielded up to 27% of the released CLT dose within 5 h, while in the USP apparatus IV method, NEs released up to 10% of the CLT dose. NEs are promising carriers for vaginal drug delivery in the treatment of VC; however, further development of the final dosage form and harmonized release or dissolution testing protocols are needed.

**Keywords:** nanoemulsion; clotrimazole; vaginal drug carriers; vaginal candidiasis; EVDF; vaginal drug delivery



**Citation:** Smoleński, M.; Muschert, S.; Haznar-Garbacz, D.; Małolepsza-Jaromłowska, K. Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1437. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051437>

Academic Editors: José Catita and Carla M. Lopes

Received: 11 April 2023

Revised: 3 May 2023

Accepted: 5 May 2023

Published: 8 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Vaginal fungal infections (vaginitis) are emerging health issues in adult women, sexually active female adolescents, and young girls with comorbidities, e.g., type 1 diabetes or immune deficiency, as well as during antibiotic therapy [1–3]. Untreated or improperly treated vaginitis in pregnant women may also pose a serious risk to neonates due to invasive fungal infections that can be transmitted from mother to newborn [4]. Vaginal infections caused by the strains of *Candida* spp., mostly by *C. albicans* (more than eight out of ten cases), are called vaginal candidiasis (VC) [1,3]. A majority of women suffer from candidiasis at least once in their lifetime [5,6]. These infections are often recurrent and difficult to treat. Denning et al. and Foxman et al. highlighted the problem of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVC), which is described as at least three or four following vaginitis caused by *C. albicans* per year. It is estimated that 15% of VC cases progress to RVC, resulting in 138 million women per year suffering from this disease [1,7,8]. Due to the limited and unclear information available on the treatment of RVC, extensive research is needed on new dosage forms, especially nanoforms, as well as drugs with higher antifungal activity and lower risks of side effects, e.g., ibrexafungerp and oteseconazole [9–11].

The most common and widely available drugs used in the treatment of VC are imidazole derivatives, such as fluconazole and clotrimazole (CLT) [12,13]. However, improper and extensive use of fluconazole has led to fungal resistance and therapeutic failures [1,13].

CLT is a weak base (pKa—4.7 and 6.0) with a molecular weight of 344.8 g/mol [14]. Despite its high antifungal activity, its applications are limited due to its poor water solubility (0.49 mg/L) and lipophilic properties (log P—6.1) [15,16]. The current recommendation for the treatment of uncomplicated VC with 1% CLT cream includes 5 g intravaginal daily application for 7 to 14 days [10]. Frej-Madrzak et al. determined the susceptibility of the 125 isolates of *Candida* spp. to clotrimazole. Samples were obtained from the genitourinary tract of female patients and the minimal inhibitory concentrations (MIC) were measured. The MIC inhibiting the growth of 88% of yeasts was found to be <1 µg/mL, while MIC established for all tested isolates of *Candida* spp. was measured at 8 µg/mL [1].

The use of vaginal drug delivery, among its benefits such as rich vascularization bypassing hepatic circulation and a relatively high absorption area of 390 cm<sup>2</sup>, is a challenging route of drug administration [17,18]. Difficulties arise from small amounts (average 2 mL) of vaginal discharge typically present on vaginal mucosa, which strongly limits drug solubility [19]. Additionally, formulations are steadily washed out from the vaginal lumen by vaginal discharge due to its constant secretion (approx. 6 mL per day). It is necessary to design bioadhesive drug carriers able to deliver active pharmaceutical ingredients (APIs) in dissolved form to increase drug bioavailability and to prolong formulation residual time on the vaginal mucosa. Emulsion-based vaginal dosage forms (EVDF), an emerging and intensively developing research area, meet these criteria [20]. Different types of emulsions and emulgels are investigated as potential drug carriers for APIs [21–26]. Bachhav and Patravale [27], as well as Soriano-Ruiz et al. [23,28], have developed microemulsion-based gel, nanoemulsion (NE), and multiple-emulsion with CLT [23,28]. These formulations exhibited more favorable properties such as higher effectiveness against VC *in vitro* and in a small pilot study with patients (nanoemulsion), as well as a higher retention time in a vagina compared to market creams with CLT, i.e., Candid-V<sup>®</sup> gel (Glenmark Pharmaceuticals Limited, Mumbai, India), Canesten<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Germany), and Gine-canesten<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Germany). However, there is still a strong need to continue to develop, improve, and investigate EVDF with CLT.

Most of the studies on EVDF are still in the initial laboratory phases and researchers are using unharmonized methods in the assessment of EVDF as European Pharmacopoeia (PhEur) does not provide detailed recommendations [20,29]. Therefore, the development of formulations and their evaluation methods is a parallel process. Among implemented dissolution/release/API availability testing protocols for NEs, dialysis bags are commonly used to determine the *in vitro* release/dissolution profile or simply the amount of available free API released from the encapsulated form in NE [30–35]. Based on a previous literature review, dialysis bags have been also used by several researchers in the evaluation of drug release in the case of local and systemic drug delivery via the vaginal route [20,23,36–39]. In the case of local drug delivery, dialysis bags might be considered questionable for the purpose of simulating biological membranes; however, as of now, there is no better alternative providing separation of free API from the encapsulated form in NEs' oil droplets.

The research described in this paper is a matter of an international patent application (WO 2023/287309), and it has been recognized by the International Searching Authority as fulfilling the criteria of a novel, inventive step with industrial applicability [40]. NE and other types of emulsions for vaginal application are often converted into emulsion-based gels due to their low viscosity. The dosage form of emulgel is characterized by increased bioadhesion and vaginal residual time [26,36,41–43]. The aim of this study is to design and develop a nanoemulsion loaded with clotrimazole for vaginal application in VC, consisting of a safe and easily available lipophilic phase based on rapeseed oil as the basic, initial dosage form for further development towards the final clinical dosage form. Rapeseed oil has been chosen as a widely available natural source of omega-3,6,9 fatty acids, valuable phytosterols, and antioxidants [44]. Fatty acids are well known due to their anti-inflammatory properties and facilitation of tissue regeneration [45–47]. Moreover, rapeseed oil is stable at higher temperatures, unlike most vegetable oils; therefore, it is considered compatible with industrial manufacturing methods. The key factors affecting



biopharmaceutical performance are the mean size of droplets (z-average), their uniformity, physiological pH, and osmolality; therefore, the optimal NE should have: (a) the droplet size < 90 nm to increase gravitational stability (phase separation due to coalescence and flocculation), (b) the absolute value of  $\zeta$ -potential of 20 or higher to prevent droplets aggregation, (c) polydispersity index < 0.3 to provide sufficient uniformity, (d) physiological pH between 3.5 and 4.5, and (e) osmolality < 1200 mOsm/kg [48–51]. The droplet size lower than 100 nm will also prolong the residual time within the mucus mesh [52]. The first part of the paper includes an investigation of NE composition and the implementation of technological methods feasible to transfer to an industrial scale in the manufacturing of NE with CLT and the initial assessment of NE physicochemical properties. The second part of this research covers in-house designed pilot studies of the in vitro release of the free CLT from the encapsulated form in NEs' oil droplets. Yielded NEs were compared with a market reference in terms of the cumulative release of API and the measured concentrations of free API with MIC of *Candida* spp.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

CLT was purchased from Pol-Aura (Różanowo, Poland). Castor oil was supplied from Microfarm (Zabierzów, Poland). Rapeseed oil was purchased from Bunge Polska Sp. z o.o. (Kruszwica, Poland). In addition, 90% Lactic acid, Poloxamer 188 (Pluronic F-68) was purchased from Pol-Aura (Różanowo, Poland). Poloxamer 407 (Pluronic F-127), poly(ethylene glycol) 200 (PEG200), sorbitan monooleate (Span 80), and polyoxyethylene-sorbitan monooleate (Tween 80) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA or Steinheim, Germany). Propylene glycol was supplied by Firma Chempur (Piekary Śląskie, Poland).

Acetonitrile for HPLC (ACN) was purchased from S.Witko (Łódź, Poland). Acetone, methanol, and potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) were obtained from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). Isopropanol was purchased from Pol-Aura (Różanowo, Poland). Milli-Q water (<0.05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), used in batches manufacturing and all experiments, was self-produced from Hydrolab Ultra UV (Hydrolab Sp z o.o., Straszyn, Poland). All the chemicals and reagents used in this study were analytical grade.

Market reference, i.e., 1% CLT cream, MycoHydralin (Bayer Healthcare, Loos, France), was purchased in a local retail pharmacy in France.

### 2.2. Selection of the Formulation and Manufacturing Methods

The semiquantitative solubility of CLT in the different components was initially assessed. Approximately 1 g of the respective component was accurately weighed into the test vial, and 100 mg of CLT was added. The vial was vortexed for 2 min. The mixture was heated up to 60 °C and kept at this temperature for 15 min. Then, samples were again vortexed for 5 min and left for equilibration overnight. Approximately 100 mg of the mixture was accurately weighed into a 10 mL volumetric flask and dissolved in 6 mL of solvent made with acetone and methanol (40:60). The flask was filled up to the mark. The samples were analyzed with the HPLC method described in Section 2.10.

In order to screen for composition and manufacturing techniques providing a nanoemulsion, 22 formulations of different compositions and manufacturing methods were prepared. Rapeseed oil has been used as a lipid fraction of the potential nanoemulsions. Tween 80, Span 80, and Poloxamer F-127/F-68 were tested as potential surfactants and cosurfactants. Propylene glycol, PEG 200, and lactic acid were added to formulations as additional excipients. Within manufacturing techniques, high energy methods were used either alone or in combination with a low-energy method (initial mixing), or with another high energy method. The initial mixing of ingredients was performed with a magnetic stirrer (IKA Industrie und Kraftfahrzeugausrüstung GmbH, Königswinter, Germany). High-speed homogenization, HSH, (PRO250, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA)

and high-pressure homogenization, HPH, (GEA PandaPLUS 2000 lab homogenizer, GEA Mechanical Equipment Italia S.p.A, Parma, Italy) were used as high-energy methods.

The compositions and manufacturing methods were designed using the general approach of the one-factor-at-a-time method.

### 2.3. Qualification of the Formulations for Further Studies

The qualification process was designed for initial fast screening and evaluation of optimal composition and manufacturing method(s). Visual appearance and stability in a centrifuge test were chosen as initial discriminatory criteria in the process of selection of the formulations.

Compositions of oil, surfactant, cosurfactant, demineralized water, and additional excipients were initially mixed using a magnetic stirrer, and then processed with (a) the high-energy method (high-pressure homogenization), (b) a combination of a low-energy (mixing with homogenizer PRO250 at 1500 rpm) and a high-energy method, or (c) a combination of both high-energy methods (HSH followed by HPH).

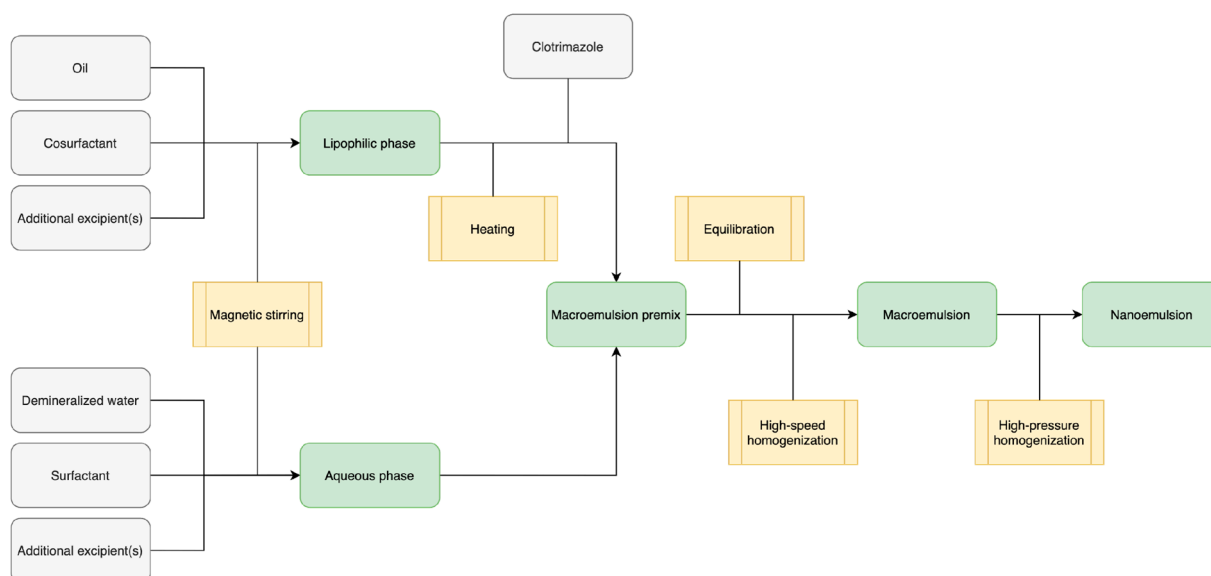
The visual appearance of a batch was assessed after equilibration, i.e., one day after the end of the manufacturing process—Criteria 1. Criteria 1 was used to reject macroemulsion and formulations exhibiting immediate phase separation. White and non-translucent batches were rejected. In the next step, the kinetic stability test of a nanoemulsion was performed—Criteria 2. The centrifuge test has been previously used by Wik et al. to initially assess the stability of NE by an acceleration of emulsion phase separation [53]. The test was implemented to reject formulations of low kinetic stability (metastable) by stress test, enhancing droplets aggregation and phase separation. Briefly, 1 mL of a formulation was placed in the Eppendorf tubes ( $n = 3$ ). Samples were centrifuged for 30 min at 15,000 rpm in the thermostatic conditions of 25 °C using an Eppendorf Centrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Batches with no signs of phase separation were qualified for further studies.

### 2.4. Optimization of High-Pressure Homogenization Process

The high-pressure homogenization (HPH) process was evaluated in terms of CLT loss. The minimum pressure value required for NE formation of the qualified batch was found to be  $1200 \pm 100$  bar. To establish maximum pressure values of the HPH process used for further reduction and providing homogeneity of NEs' oil droplets, the NE premixes of S9:1-CLT, S8:2-CLT, and S7:3-CLT prepared according to Section 2.5 were homogenized using 3 different pressure levels—(a)  $1300 \pm 100$  bar; (b)  $1500 \pm 100$  bar; (c)  $1700 \pm 100$  bar. Then, the obtained NEs were processed following the procedure described in Section 2.9 and the CLT concentration measurements using the HPLC method (Section 2.10) were performed. All measurements were taken in triplicate.

### 2.5. Manufacturing of Experimental S9:1, S8:2, and S7:3 Blank Formulations and Corresponding Batches with CLT for Further Assessment

The optimized blank NEs were prepared following the protocol in Figure 1. The premix of lipid fraction and cosurfactant was mixed and preheated to approximately 50 °C. Selected surfactant was added to the demineralized water and dissolved under magnetic stirring. Then, the aqueous phase and lipophilic phase were slowly mixed under magnetic stirring (approximately 600–1000 rpm). The obtained macroemulsion was left for at least 24 h at room temperature for equilibration. In the next step, the macroemulsion was homogenized using a high-speed homogenizer at  $13,000 \pm 200$  rpm. The batch was cooled down to room temperature and, subsequently, high-pressure homogenization was performed. High-pressure homogenization was conducted in duplicate. The pressure was set to  $1300 \pm 100$  bar. Batches with CLT were prepared using the same protocol (Figure 1), where the prescribed amount of the clotrimazole was accurately weighed and added to the lipid fraction premix and mixed on a magnetic stirrer for approximately 60 min.



**Figure 1.** Manufacturing process of selected for further investigation and optimized formulation (S9:1, S8:2, S7:3 and S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT).

## 2.6. Osmolality and pH-Level

Measurements of the osmolality of nanoemulsions with clotrimazole were performed using a Micro-osmometer Loeser TYP 6 (Loeser Messtechnik, Berlin, Germany). The batches were assessed 24 h after manufacturing. Samples were diluted two times with Milli-Q water before tests. All measurements were taken in triplicate.

The acidity of the batches was measured using a calibrated Mettler Toledo Seven-Multi S40 (Mettler-Toledo LLC, Columbus, OH, USA) pH-meter equipped with a glass electrode. All measurements were performed at room temperature and conducted by direct immersion of the electrode in the glass bottles with NEs until a stable result was yielded. All measurements were taken in triplicate. A range of pH of 3.5 to 4.5 was considered physiological.

## 2.7. DLS Droplet Size Determination and Zeta Potential Measurements

The average droplet size (z-average), droplet size distribution by volume, polydispersity index (PDI), and zeta potential ( $\zeta$ -potential) of the obtained nanoemulsions were measured at  $25 \pm 0.1$  °C by Dynamic Light Scattering (droplet size and PDI) and Electrophoretic Light Scattering ( $\zeta$ -potential) methods using Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). The Non-Invasive Back Scatter method, i.e., 173 degrees laser configuration, was used. Samples were diluted 50 times with Milli-Q water to fit the instrument's sensitivity range and measured within 30 min after dilution to prevent the possible agglomeration or precipitation of nanoemulsion components. All measurements were taken in triplicate.

## 2.8. Stability Test

The stability test of batches was carried out in the conditions of  $25 \pm 2$  °C and relative humidity of 30–65%, protected from light for 28 weeks. Then,  $200 \pm 5$  g of each NE was placed in 250 mL borosilicate glass 3.3 lab bottles with high-temperature-resistant screw caps and sealed using parafilm to avoid the influence of humidity on the stability. Visual appearance (to screen for macroscopic signs of phase separation, precipitation of components, etc.), z-average, size distribution by volume, PDI,  $\zeta$ -potential, and pH level were evaluated. The following parameters were assessed in 3-time points: (a) 24 h after manufacturing (0-time), (b) after 4 weeks, and (c) after 28 weeks. All measurements were taken in triplicate.

### 2.9. Sample Treatment in CLT Assay

Approximately 1000 mg of NE was exactly weighed into a 25 mL volumetric flask. The solvent (1:1 mixture of isopropanol and acetone) was added to the flask and mixed until the NE was fully dissolved. The flask was filled up to the mark with the solvent. Then, 1 mL of the obtained solution was transferred to the 5 mL volumetric flask and filled up to the mark with acetonitrile (ACN). Samples were filtered with 25 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ , syringe filters made of regenerated cellulose.

### 2.10. HPLC Method for CLT Determination

The concentration of CLT in various media was determined by the reverse phase HPLC method. The analysis was performed using a Shimadzu LC-2050C (Shimadzu U.S.A Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) equipped with a DAD detector and Phenomenex Gemini C18, 150 mm  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$  column. Elution was isocratic and the mobile phase consisted of ACN and 20 mM phosphate buffer pH 6.8 (60:40), the flow rate was 1.5 mL/min. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . CLT detection was recorded at a retention time of approximately 5 min at 265 nm. The method was validated within concentrations of 2–300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with a linearity of  $R^2 = 0.9999$  in terms of accuracy, precision, repeatability, specificity, and linearity according to EMA and ICH guidelines (ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Note CPMP/ICH/381/95 for Assay).

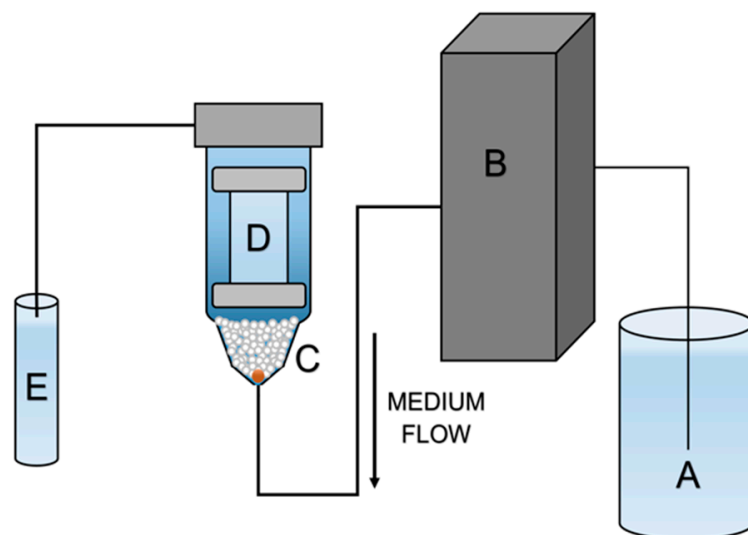
### 2.11. The Pilot Study of the Changes in the Amount of Free CLT Released from Encapsulated Form—Stationary Method

The study was designed in-house and performed with batches S9:1-CLT, S8:2-CLT, S7:3-CLT, and references—1% CLT cream (MycoHydralin, Bayer Healthcare, Loos, France) and 1% suspension of API powder with MilliQ water as the vehicle. Servapor dialysis bags made of regenerated cellulose with a 10,000–12,000 Daltons cut-off and 2.5 nm pores (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) were used to separate the free CLT from the encapsulated form. The test setup consisted of cylinder-shaped vessels placed in a heating bath and a magnetic stirrer under the bath. Then, 300 mL of 50 mM phosphate buffer pH 3.5 was used as a dissolution medium. The bath temperature was set to 37  $^{\circ}\text{C}$  and the stirring speed was set to 100 rpm. The pilot study test was conducted for 5 h to simulate a short contact time of formulation with the vaginal mucosa. The following study protocol was developed: 7-cm long dialysis bags were conditioned for 1 h in the medium prior to the test; 5 mL of the formulation was put into the dialysis bag and the membrane was sealed with clips. Then, the bags were transferred to the vessels. Samples were withdrawn every 30 min of the test. The single sample volume was set to 5 mL. Samples exhibiting disruption of membrane integrity were rejected. The same volume of fresh medium was added to the vessels after collecting every sample. Samples were diluted 1:1 with ACN and filtered with 25 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ , syringe filters made of regenerated cellulose. The concentration of CLT was analyzed using the HPLC method described in Section 2.10. The test was conducted in triplicate for each formulation.

### 2.12. The Pilot Study of the Changes in the Amount of Free CLT Released from Encapsulated Form—Dynamic Method with USP IV

Additional tests of all batches and references—1% CLT cream (MycoHydralin, Bayer Healthcare, Loos, France) and 1% suspension of API powder were performed using the USP apparatus IV setup; i.e., flow-through cell to simulate dynamic conditions. The setup consisted of flow-through cells (22.6 mL cell, CE 1, Sotax AG, Basel, Switzerland) conditioned at 37  $^{\circ}\text{C}$  by means of a water bath and a piston pump (CY 7-50, Sotax AG) to provide a stable flow rate of 2 mL/min. The test was conducted for 5 h. We used an open circuit to provide fresh 50 mM phosphate buffer pH 3.5 to the samples to increase CLT solubility and mimic the wash out conditions. Then, 2 mL of the NE formulation was put in the dialysis bag, as described in Section 2.11. The scheme of the apparatus is presented

in Figure 2. Each batch and reference were tested in triplicate. The samples were collected every 10 min in the first hour of the experiment and, later, every 30 min up to 5 h. Samples were processed and analyzed as described for the stationary method.



**Figure 2.** Scheme of flow-through method apparatus. A—medium reservoir, B—piston pump, C—flow-through cells with glass beads, D—dialysis bag with NE inside, E—test tube.

### 2.13. Statistical Analysis

All experiments were conducted in triplicate. The mean values and standard deviations were calculated for the results of all conducted experiments. The ANOVA test was carried out at  $p \leq 0.05$  for the results of pilot studies of the changes in the amount of free CLT released from encapsulated form. The analysis was performed using the built-in tools of Microsoft Excel software.

## 3. Results

### 3.1. Process of Developing the Formulation Composition, Manufacturing Method, and Selection of Obtained Nanoemulsions for Further Studies

The results of the semiquantitative determination of CLT solubility in tested components are presented in Table 1.

**Table 1.** Semiquantitative determination of CLT solubility in tested formulation components.

Solubility Range	<1 mg/g	1–10 mg/g	10–60 mg/g	>60 mg/g
Components	10% Pluronic F-68, 10% Pluronic F-127	Rapeseed oil	Tween 80	PEG 200, Propylene glycol Span 80

The initial assumption was that the amount of oil in the formulation should provide sufficient solubility of CLT (10 mg of API per 1 g of formulation). Therefore, the minimum concentration of rapeseed oil was set to 20% ( $w/w$ ) of the formulation. The addition of CLT solubilizer (PEG 200 or propylene glycol) has been considered at different levels from 0.5% ( $w/w$ ) for PEG 200/propylene glycol and 6.6%, 10%, and 20% for PEG 200 only. The sets of formulations are presented in Tables 2–9. All compositions were balanced with MilliQ water up to 100% ( $w/w$ ).

**Table 2.** Compositions and manufacturing methods of the first set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
1	40.0	10.0	-	-	-	-	HPH 400	Rejected, Criteria 1
2	40.0	10.0	-	-	-	-	HPH 800	Rejected, Criteria 1
3	40.0	10.0	-	-	-	-	HPH 1200	Rejected, Criteria 1
4	30.0	10.0	-	-	-	-	HPH 800	Rejected, Criteria 1
5	30.0	10.0	-	-	-	-	HPH 1200	Rejected, Criteria 1

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HPH—high pressure homogenization; 400—400 ± 100 bar; 800—800 ± 100 bar; 1200—1200 ± 100 bar.

**Table 3.** Compositions and manufacturing methods of the second set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
6	10.0	-	10.0	-	-	-	IM + HSH	Rejected, Criteria 1
7	10.0	10.0	-	-	-	-	IM + HSH	Rejected, Criteria 1

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; IM—initial mixing with HSH at low speed—1500 rpm.

**Table 4.** Compositions and manufacturing methods of the third set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
8	40.0	10.0	-	-	20.0	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1
9	40.0	20.0	-	-	10.0	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; HPH—high pressure homogenization; 800—800 ± 100 bar.



**Table 5.** Compositions and manufacturing methods of the fourth set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
10	40.0	10.0	10.0	-	-	-	HPH 400	Rejected, Criteria 1
11	30.0	5.0	5.0	-	-	-	HPH 800	Rejected, Criteria 1

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HPH—high pressure homogenization; 400—400 ± 100 bar; 800—800 ± 100 bar.

**Table 6.** Compositions and manufacturing methods of the fifth set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
12	20.0	4.5	-	4.5	0.5	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1
13	40.0	5.0	-	5.0	-	0.5	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1
14	20.0	4.5	-	4.5	-	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; HPH—high pressure homogenization; 800—800 ± 100 bar.

**Table 7.** Compositions and manufacturing methods of the sixth set of batches.

Number	Oil (% w/w)	Surfactant(s) (% w/w)			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
15	40.0	18.0	-	2.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 1
16	30.0	18.0	-	2.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Rejected, Criteria 2

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; HPH—high pressure homogenization; 800—800 ± 100 bar; 1200—1200 ± 100 bar.

The first set of formulations is presented in Table 2. The high molecular weight poloxamer (Pluronic F-127) was used as a surfactant due to its low irritating properties, vast industrial applicability, and bioadhesive properties. HPH was used as the first manufacturing high-energy method at three levels: 400 ± 100 bar, 800 ± 100 bar, and 1200 ± bar.

As the obtained formulations failed to meet criteria 1, the second set of formulations was designed (Table 3). The high-energy method (HSH) was preceded by initial mixing at a low speed of 1500 rpm using a homogenizer PRO 250. The amount of oil was reduced to assess the applicability of the methods.

**Table 8.** Compositions and manufacturing methods of the seventh set of batches.

Number	Oil (% <i>w/w</i> )	Surfactant(s) (% <i>w/w</i> )			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection <sup>a</sup>
	Rapeseed	Pluronic F-127	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
17	20.0	18.0	-	2.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Rejected, gelling
18	20.0	16.0	-	4.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Rejected, gelling
19	20.0	14.0	-	6.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Rejected, gelling

<sup>a</sup>—if the formulation was rejected, the rejection criterion is given referring to Section 2.3, i.e., Criteria 1 (translucent/transparent visual appearance) or Criteria 2 (centrifuge stability); HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; HPH—high pressure homogenization; 800—800 ± 100 bar.

**Table 9.** Compositions and manufacturing methods of the eighth set of batches.

Number	Oil (% <i>w/w</i> )	Surfactant(s) (% <i>w/w</i> )			Additional Excipient(s)		Manufacturing Method(s)	Selection or Rejection
	Rapeseed	Pluronic F-68	Tween 80	Span 80	PEG 200	Propylene Glycol		
20	20.0	18.0	-	2.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Selected
21	20.0	16.0	-	4.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Selected
22	20.0	14.0	-	6.0	6.6	-	HSH + HPH 800	Selected

HSH—High Speed Homogenization at 13,000 ± 200 rpm; HPH—high pressure homogenization; 800—800 ± 100 bar.

Due to the failure to comply with criteria 1, the third set was designed, where two high-energy methods, i.e., HSH and HPH, were used. The results are presented in Table 4. PEG 200 was included as a CLT solubilizer to investigate the influence of API addition on the formulation.

Despite two high-energy manufacturing methods, formulations 8 and 9 failed to meet criteria 1. We concluded that the use of a single surfactant was the reason for the failure. The fourth set (Table 5) was prepared. The fourth row of formulations was characterized by the addition of Tween 80 as the second surfactant in a 1:1 mass ratio and the single high-energy method (HPH).

As all formulations among the fourth set failed to comply with criteria 1. We concluded that the cosurfactant of a low HLB number might be more favorable; therefore, we replaced Tween 80 with Span 80. The combination of two high-energy methods was also implemented to provide more kinetic energy into the system. The fifth set (Table 6) was designed. The concentration of rapeseed oil was tested at two levels—20 and 40% (*w/w*).

As the results were unsatisfactory, we decided to increase the total amount of surfactant mix (see Table 7).

Formulation 16 was able to meet criteria 1, but failed to meet criteria 2 (centrifuge stability test). This suggested that the amount of rapeseed oil in the system was too high. We decided to reduce the concentration to the lowest, i.e., 20% (*w/w*), and prepared the seventh set of formulations—Table 8.

We obtained NE, fulfilling criteria 2 yet characterized by an inhomogeneous structure due to the gelling of Pluronic F-127 as the result of high temperature during HPH. To resolve that issue, we replaced Pluronic F-127 with one of lower molecular weight—Pluronic F-68 (Table 9).

The compositions of selected blank nanoemulsions were further optimized. The final composition of the selected batches is presented in Table 10 and the corresponding batches loaded with clotrimazole are summarized in Table 11. The selected nanoemulsions differed



in terms of their surfactant to cosurfactant ratio, i.e., 9:1 (batch S9:1), 8:2 (batch S8:2), and 7:3 (batch S7:3).

**Table 10.** Compositions of blank NEs.

Ingredients [% w/w]	Batch		
	S9:1	S8:2	S7:3
Rapeseed oil	20.0	20.0	20.0
Demineralized water	52.8	52.8	52.8
88.9% Lactic acid	0.6	0.6	0.6
Pluronic F-68	18.0	16.0	14.0
Span 80	2.0	4.0	6.0
PEG 200	6.6	6.6	6.6

**Table 11.** Compositions of NEs with CLT.

Ingredients [% w/w]	Batch		
	S9:1-CLT	S8:2-CLT	S7:3-CLT
Rapeseed oil	20.0	20.0	20.0
Clotrimazole	1.0	1.0	1.0
Demineralized water	51.8	51.8	51.8
88.9% Lactic acid	0.6	0.6	0.6
Pluronic F-68	18.0	16.0	14.0
Span 80	2.0	4.0	6.0
PEG 200	6.6	6.6	6.6

The results of the drug loading efficiency depending on different levels of pressure during HPH (following procedures 2.5 and 2.9) are presented in Table 12. The results showed a significant impact on CLT loading in the NEs. The rising of the pressure level over 1300 bar during the HPH resulted in the loss of the drug. Therefore, the manufacturing process was adjusted as described in Section 2.5.

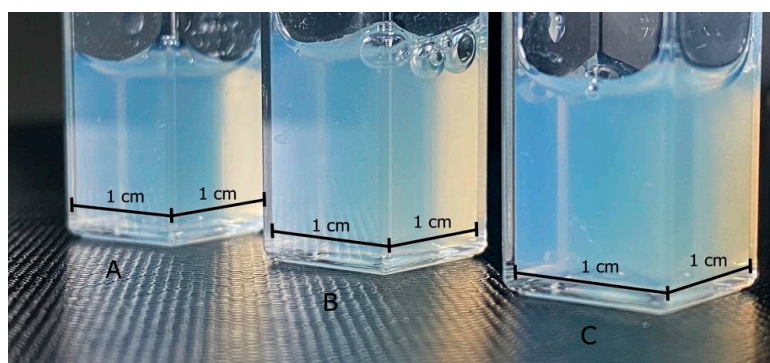
**Table 12.** The efficiency of CLT loading. Data expressed as mean value (MV)  $\pm$  standard deviation (SD) of CLT loading of S9:1-CLT, S8:2-CLT, and S7:3-CLT.

Pressure Level [bar]	Efficiency of CLT Loading [%]
1300 $\pm$ 100	97 $\pm$ 2
1500 $\pm$ 100	53 $\pm$ 2
1700 $\pm$ 100	47 $\pm$ 4

### 3.2. Physico-Chemical Evaluation of the Batches

All yielded batches were translucent and opalescent (see Figure 3), suggesting favorable properties of the small size of NEs' droplets [48,54–56]. The exact values of the physico-chemical parameters of the obtained batches right after manufacturing are presented in Table 13. All formulations were characterized by relatively small droplet diameters within the range of 100 nm, confirming visual observations. The obtained blank formulations were homogenous and the recorded PDI was within a range of 0.089 to 0.147 with narrow standard deviations. The results of a more in-depth investigation of droplet diameters and uniformity are presented in Figure 4A. Batch S8:2 had the smallest mean droplet diameter, as well as the narrowest size distribution by volume among blank NEs. The largest droplets

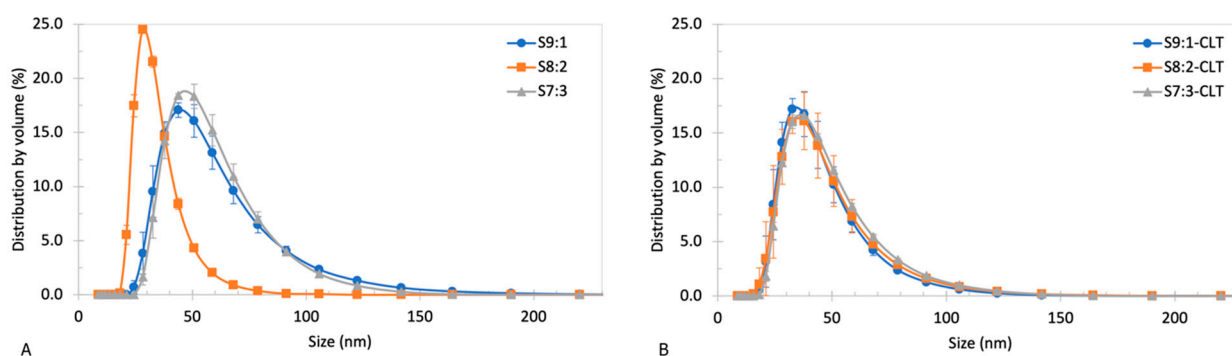
were  $\leq 100$  nm, while most of the droplets were  $\leq 50$  nm. S9:1 and S7:3 were characterized by similar and wider droplet size distributions by volume than S8:2. The largest droplets were  $\leq 175$  nm, while most of the droplets were  $\leq 100$  nm. Higher differences between blank NEs and NEs with CLT were observed for  $\zeta$ -potential levels. Batches S9:1 and S7:3 had low negative values of  $\zeta$ -potential close to the neutral, contrary to S8:2, where a positive value of approximately 16.5 mV was recorded. The acidity level of blank NEs was within the physiological range.



**Figure 3.** The visual appearance of NEs with CLT. Batches: S9:1-CLT (A, left), S8:2-CLT (B, centre), S7:3-CLT (C, right).

**Table 13.** Physico-chemical properties of the blank NEs and NEs with CLT (MV  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Batch	Z-Average [nm]	PDI	$\zeta$ -Potential [mV]	Osmolality [mOsm/kg]	pH
S9:1	67.39 $\pm$ 0.32	0.130 $\pm$ 0.007	-4.63 $\pm$ 0.34	-	3.61
S9:1-CLT	52.16 $\pm$ 0.30	0.145 $\pm$ 0.010	22.00 $\pm$ 1.86	871 $\pm$ 25	4.18
S8:2	58.13 $\pm$ 0.34	0.147 $\pm$ 0.008	16.50 $\pm$ 0.25	-	3.55
S8:2-CLT	55.49 $\pm$ 0.44	0.159 $\pm$ 0.009	19.70 $\pm$ 1.50	852 $\pm$ 17	4.06
S7:3	64.01 $\pm$ 0.11	0.089 $\pm$ 0.012	-2.50 $\pm$ 0.15	-	3.49
S7:3-CLT	56.11 $\pm$ 0.27	0.132 $\pm$ 0.005	22.90 $\pm$ 0.27	758 $\pm$ 5	4.01



**Figure 4.** Droplet size distribution by volume of (A) blank NEs and (B) NEs with CLT. Data expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (MV  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

The addition of CLT had a significant impact on the z-average, the distribution of droplet size by volume,  $\zeta$ -potential levels, and the pH level. In all three formulations, mean droplet diameters decreased by approximately 5–22%. The most significant difference was observed for the NE with a 9:1 surfactant-to-cosurfactant ratio. The distribution of droplet size in all three batches with CLT was unified and almost identical (Figure 4B). The largest recorded droplets were  $\leq 150$  nm, while most of the droplets were  $\leq 75$  nm. The addition of

API to the formulations slightly elevated PDIs in batches S9:1 and S8:2; the most significant change was observed in batch S7:3, where PDI increased by approximately 50%. It had also noticeably increased the levels of  $\zeta$ -potential, changing the values of approximately +22 mV, +20 mV, and +23 mV in the case of formulations S9:1-CLT, S8:2-CLT, and S7:3-CLT, respectively. The change in  $\zeta$ -potential corresponded with higher pH of approximately 4.0–4.2 compared to blank NEs. In general, the acidity of formulations was influenced by the surfactant-to-cosurfactant ratio. The pH decreased with the increasing content of Span 80.

The osmolality was measured for NEs with CLT. All batches were characterized by osmolality within the range of 750–880 mOsm/kg. The highest value of osmolality was recorded for batch S9:1-CLT, while the lowest was for S7:3-CLT.

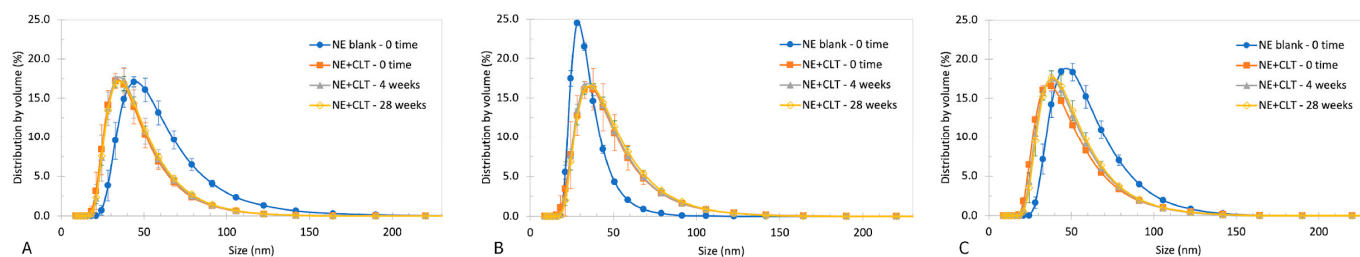
### 3.3. Results of the Stability Test

The change in the physico-chemical properties of tested batches is summarized in Table 14. The visual appearance of the NEs with CLT did not markedly change and no macroscopic signs of precipitation or phase separation were recorded.

**Table 14.** Physico-chemical properties of NEs with CLT vs. time (MV  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Batch	Time [Weeks]	Z-Average [nm]	PDI	$\zeta$ -Potential [mV]	pH
S9:1-CLT	0	52.16 $\pm$ 0.30	0.145 $\pm$ 0.010	22.00 $\pm$ 1.86	4.18
	4	52.80 $\pm$ 0.06	0.141 $\pm$ 0.008	17.40 $\pm$ 0.10	4.17
	28	53.22 $\pm$ 0.17	0.143 $\pm$ 0.014	21.60 $\pm$ 1.49	4.13
S8:2-CLT	0	55.49 $\pm$ 0.44	0.159 $\pm$ 0.009	19.70 $\pm$ 1.50	4.06
	4	54.62 $\pm$ 0.27	0.140 $\pm$ 0.010	18.40 $\pm$ 0.79	4.06
	28	55.61 $\pm$ 0.15	0.131 $\pm$ 0.006	24.20 $\pm$ 0.97	4.07
S7:3-CLT	0	56.11 $\pm$ 0.27	0.132 $\pm$ 0.005	22.90 $\pm$ 0.27	4.01
	4	56.20 $\pm$ 0.20	0.119 $\pm$ 0.004	22.20 $\pm$ 0.81	4.02
	28	56.77 $\pm$ 0.31	0.116 $\pm$ 0.006	23.50 $\pm$ 2.46	3.93

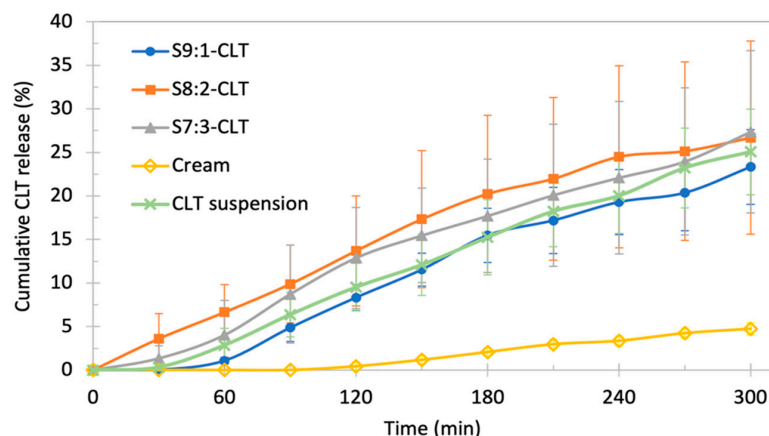
The mean droplet diameter had no tendency to increase or decrease within 28 weeks. PDI values of batches S8:2-CLT and S7:3-CLT dropped. However, those changes had no visible impact on size distribution by volume over time (Figure 5), which remained constant for all tested batches.  $\zeta$ -potential showed greater variability over time. After one month,  $\zeta$ -potential decreased by 0.7 mV (S7:3-CLT) to 4.6 mV (S9:1-CLT), which was not related to changes in the acidity, as pH values did not significantly shift during the same period.  $\zeta$ -potential increased close to initial values after 28 weeks in the case of S9:1-CLT and S7:3-CLT. For the batch S8:2-CLT, an increase in  $\zeta$ -potential of 4.5 mV from the initial value was observed, reaching 24.20 mV. Although the S7:3-CLT had the smallest variation in values over the 28 weeks of observation, there was a high standard deviation at the last time point. During the measurement of  $\zeta$ -potential, two fractions of the droplets with positive and negative surface charges were recorded. A slight change over time in the pH levels was observed in the S7:3-CLT batch.



**Figure 5.** Changes in droplet size distribution by volume for (A) S9:1-CLT, (B) S8:2-CLT, (C) S7:3-CLT. Data expressed as  $MV \pm SD$  ( $n = 3$ ).

### 3.4. Pilot Study of the Changes in the Amount of Free CLT Released from Encapsulated Form—Stationary Method

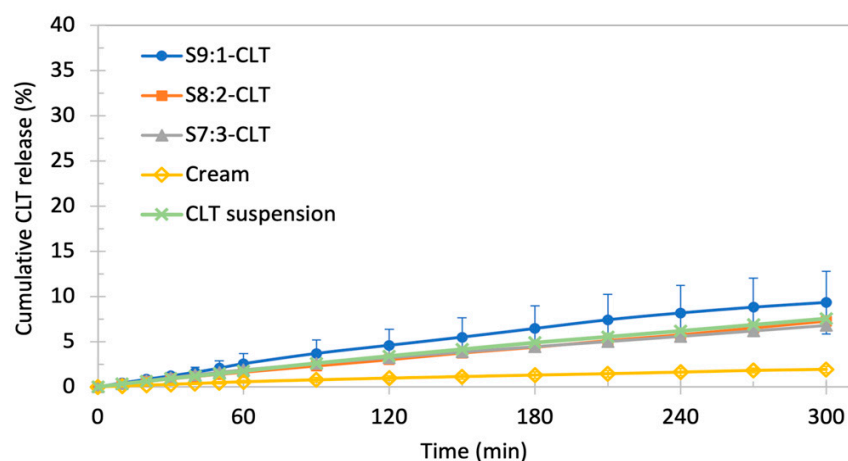
The results of the pilot study of the changes in the amount of free CLT over time are presented in Figure 6. The release kinetics are similar for all tested NE batches ( $p = 0.51$ ). All NEs yielded a mean maximum amount of released nonencapsulated API of approximately 25% in 300 min. Despite similarities, some tendencies were observed. The mean maximum amount of released API for batch S9:1-CLT was slightly lower when compared to other NEs. A high standard deviation for each NE was noticed, the highest was observed for batch S8:2-CLT, while the lowest standard deviation was recorded for batch S9:1-CLT. NE, with a 9:1 surfactant-to-cosurfactant ratio, started to release the API through the membrane in approximately 60 min, while in the case of the other batches, CLT in the medium was recorded within 30 min. Additionally, 1% suspension of CLT powder used as a reference presented similar kinetics to NEs-CLT batches ( $p = 0.67$ ), in contrast to cream with 1% CLT, which released only 5% API of the total dose in 5 h. The cream was significantly different from NE batches and 1% CLT suspension ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Results of the stationary pilot study—the amount of released API (cumulative) over time. The values are presented as the mean % of released API. Data expressed as  $MV \pm SD$  ( $n = 3$ ).

### 3.5. Pilot Study of the Changes in the Amount of Free CLT Released from Encapsulated Form—USP IV Method

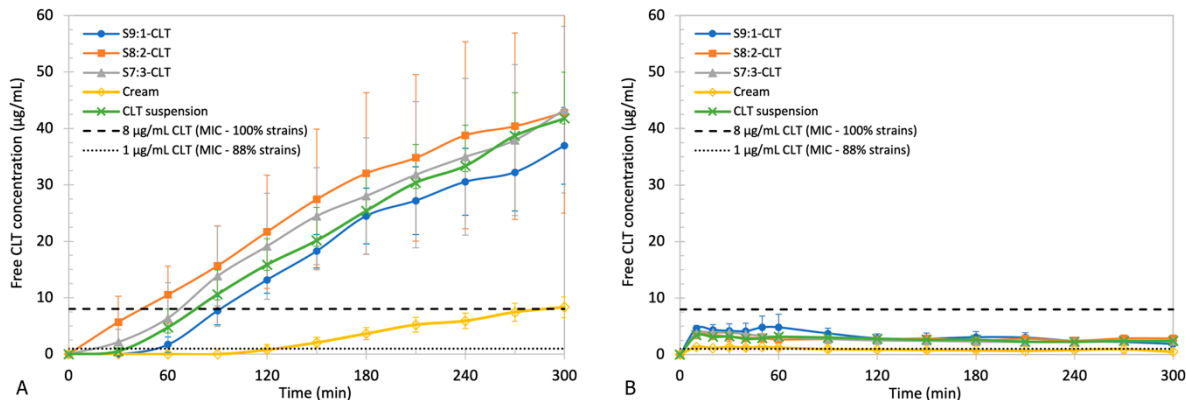
The results of the pilot study conducted with the USP IV setup are presented in Figure 7. The profiles of changes in the free CLT concentration of tested batches are similar and characterized by the incomplete release of the API ( $p = 0.35$ ). The standard deviations were low in all tested formulations, except for batch S9:1-CLT, which also reached the highest level of released CLT, up to 10% of the dose; however, those differences were statistically insignificant. The performance of batches S8:2, S7:3, and 1% suspension were similar and yielded slightly lower levels compared to the S9:1-CLT ( $p = 0.74$ ) and significantly higher than 2–3% of the released dose of API in the case of cream with CLT ( $p < 0.05$ ). We recorded the almost immediate onset of the release of the CLT for all batches.



**Figure 7.** Results of USP IV pilot test—the amount of released API (cumulative) over time. The values are presented as the mean % of released API. Data expressed as MV  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

### 3.6. Comparison of Changes in Free API Concentration over Time with MIC

The measured concentrations of nonencapsulated CLT are presented in Figure 8. In the stationary method, significantly higher levels were recorded. S8:2-CLT and S7:3-CLT reached a concentration higher than 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 30 min, while S9:1-CLT and CLT reached suspension in 60 min. Market reference required a significantly longer time ( $p < 0.05$ ); i.e., 120 min to achieve that level. Concentrations higher than 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were reached by (a) S8:2-CLT within 30 min; (b) S7:3-CLT and 1% CLT suspension within 60 min; (c) S9:1-CLT within 90 min; and (d) MycoHydralin cream within 120 min.



**Figure 8.** Comparison of the changes in free CLT concentration obtained over time using (A) the stationary method and (B) the USP IV method with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CLT MIC (88% isolated strains susceptible) and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CLT MIC (100% isolated strains susceptible). Data expressed as MV  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

The concentrations measured in flow-through experiments were significantly lower than those observed in the stationary method. The level of MIC CLT 88% was recorded within 10 min of the experiment in the case of all tested samples. None of the tested formulations were able to reach the concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A similar and almost constant level of 3–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was observed for NEs batches and 1% CLT suspension. The cream with CLT reached a significantly lower ( $p < 0.05$ ) and constant concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It is worth noting that this method was performed under a constant renewal of the dissolution medium.

## 4. Discussion

According to the established testing protocol (Section 2.3), the most promising composition consisted of rapeseed oil and Span 80 as the lipophilic phase and an aqueous solution



of Pluronic F-68 as the hydrophilic phase of nanoemulsion. The addition of lactic acid and PEG 200 to the formulation improved the physiological parameters of the formulation and the cross-mixing of components, respectively. HSH and HPH turned out to be a suitable combination of high energy methods in the manufacturing of NEs with CLT. However, the implementation of HPH requires confirmation of drug loading due to possible loss of some API [57]. The acceptable deviation was assumed at  $\pm 5\%$ . In this work, the maximum pressure value not influencing the drug loading was found to be 1300 bars, where 97% of the initial dose was observed. A further increase in pressure level resulted in a significant loss of the API to approximately 50% of initial drug loading. The exact mechanism of the CLT loss was not investigated by us. Possibly, when a formulation is pushed through a microns-sized homogenization gap under high pressure, the batch is subjected to extreme kinetic forces resulting from acceleration to a very high velocity. This stress causes disruption of the larger oil droplets into the nano-sized ones. A part of the energy is also transferred into heat. The higher the pressure applied, the more disruptive forces act on the formulation, which might result in unfavorable processes, such as the aggregation of droplets or other particles, coalescence, water evaporation, and other interactions [57–59]. Pressure exceeding a critical level might lead to precipitation of the API and, consequently, the CLT could be filtered out by the narrow homogenization gap and/or interaction with the tubing system. However, this needs to be confirmed by the appropriate experiments.

The yielded blank and drug-loaded NEs were acceptably homogenous based on low PDI values and small standard deviations [60]. The mean droplet diameter of blank and loaded NEs was smaller than 100 nm. Particles with a size < 100 nm are expected to enter and slowly penetrate vaginal mucus. Larger droplets (200–500 nm) would penetrate to vaginal mucosa more rapidly, and hence, increase absorption of the CLT to the circulatory system, which, in this case, is not considered beneficial due to the possible systemic side effects [18]. Entrapment of CLT in the mucus mesh could increase its residual time and, consequently, enhance the antifungal therapy of vaginitis. Within blank NEs, the most promising properties were observed in the case of batch S8:2, as its z-average was the lowest and the most homogenous based on droplet size distribution by volume. The  $\zeta$ -potential of blank batches S9:1 and S7:3 indicates their possible instability, as the values were less than  $\pm 10$  mV and close to the point of zero charges [49]. Batch S8:2 yielded the highest  $\zeta$ -potential of approximately +16.50 mV, indicating its relative stability and the most favorable composition among the blank batches. The addition of CLT had a strong influence on the NEs properties, as it affected the z-average and  $\zeta$ -potential, narrowed the size distribution by the volume of batches, and shifted the distribution peaks towards smaller diameters (except S8:2). The unique properties and differences in terms of the z-average, size distribution by volume, PDI, and  $\zeta$ -potential of batch S8:2 might be a result of the surfactant-to-cosurfactant ratio. Zeng et al. described that the surfactant-to-cosurfactant ratio might contribute to a decrease in the interfacial tension and an increase in surfactant layer flexibility, which results in a system of higher entropy [61]. After the addition of the API, the shape and values of the droplet size distribution by volume of the tested batches became almost identical (see Figure 4). In our opinion, the increased absolute value of  $\zeta$ -potential, together with changes in mean droplet size, suggest that CLT has stabilizing properties on these NEs compositions. In nanoemulsion loaded with clotrimazole obtained by Soriano-Ruiz et al., the addition of CLT also affected the size of the droplets by increasing their diameter [23]. Borhade et al. studied the influence of the CLT, the composition of NEs, and the pH of the media on the properties of NEs. Authors have discovered the significant impact of CLT loading on NEs. In some cases, especially in media at a pH of 1.2, CLT decreased the mean size of the droplet of NE. This phenomenon was explained by the protonated imidazole group of CLT in the acidic media, which resulted in increased CLT solubility [14]. Although clotrimazole increased the absolute value of the  $\zeta$ -potential of NEs, values lower than  $\pm 30$  mV may not guarantee long-term stability, yet ranges  $\pm 10$  mV to  $\pm 20$  mV and  $\pm 20$  mV to  $\pm 30$  mV may be considered relatively stable and moderately stable [49]. The API, as a weak base, has also elevated the pH of the formulations to

mid-values (approximately 4.0) of the physiological range of 3.8 to 4.5 [50]. Change in acidity is one of the major factors affecting  $\zeta$ -potential, and therefore, the observed changes in the  $\zeta$ -potential values may result from the CLT ionized form in acidic pH [14]. This observation may also suggest that a part of the API dose is localized close to the lipophilic phase boundary.

Evaluation of the osmolality of a vaginal formulation is an important factor, as hyperosmolal formulations have been reported to have irritating properties on vaginal mucosa, and therefore, could cause unacceptable side effects [62]. To the best of our knowledge, this is the first study which investigated the osmolality of EVDF. Developed batches meet the World Health Organization advisory note on the "Use and procurement of additional lubricants for male and female condoms: WHO/UNFPA/FHI360", as measured osmolality was lower than 1200 mOsm/kg, yet higher than the ideal < 380 mOsm/kg [51]. When considering osmolality levels, the irritation potential on membranes decreases in a series of S9:1-CLT, S8:2-CLT, and S7:3-CLT from approximately 870 mOsm/kg to approx. 760 mOsm/kg. PEG 200, Pluronic F-68, and lactic acid, and possibly CLT, have been identified as significant osmotic agents [63–66]. The concentrations of PEG 200, lactic acid, and CLT were constant for NEs. Only the levels of Pluronic F-68 varied between tested batches. Osmolality values corresponded with the Pluronic F-68 loading as the highest osmolality ( $871 \pm 25$  mOsm/kg) was recorded for S9:1-CLT, which contained 18% *w/w* of poloxamer, while the lowest osmolality ( $758 \pm 5$  mOsm/kg) was measured for batch S7:3-CLT, containing 14% *w/w* of the excipient. Despite the osmolality of NEs fulfilling the recommendations of the WHO, the potential irritating properties of components were investigated. Surfactants in high concentrations have been recognized as potentially irritating or even toxic substances [67]. The implementation of Pluronic F-68 in high content (>20%) in a vaginal formulation containing nanoparticles was previously investigated by Zhang et al. [68], where no irritating properties of this excipient were observed in vivo on rabbits. The safety of Span-80 was evaluated by Minamisakamoto et al. [69] in the study of noisome, where insignificant toxicity of a high (46.5%) concentration of the surfactant was observed. This indicates NEs should not exhibit irritating properties on vaginal mucosa, as the concentration of surfactants used in our study is lower than reported in previous research.

The evaluation of the stability of NE is one of the most important formulation properties to evaluate, as nanoemulsion will eventually separate into oil and aqueous phases. In ideal NE, this phase separation process is slow enough to not have an impact on the formulation performance in the pharmaceutical industry. The main processes involved are flocculation, coalescence, and Ostwald ripening [48,54–56,70]. In general, these processes lead to aggregation or combining of the droplets, and consequently, creaming and phase separation [48,54–56,70]. Increasing the mean droplet size (z-average), PDI, and size distribution could be one of the markers indicating NE disruption. Changes in  $\zeta$ -potential values (especially a drop in absolute value or the appearance of opposite charges) associated with variations in pH levels might accelerate or initiate emulsion destabilization. During the stability studies, the variability over time in terms of visual appearance, z-average, PDI, mean droplet size distribution by volume,  $\zeta$ -potential, and pH-value was assessed to monitor early signs of NE destabilization. Within the first month, batches exhibited acceptable stability and no significant changes were observed in the evaluated properties and parameters, except for  $\zeta$ -potential. The decrease by approximately 21%, 7%, and 3% of  $\zeta$ -potential values, compared to their initial values of batches S9:1-CLT, S8:2-CLT and S7:3-CLT, respectively, indicates that destabilizing processes might have occurred in the batches. Variations in  $\zeta$ -potential values did not correspond with constant pH levels. However, no signs of API precipitation, phase separation, or flocculation were observed. After 28 weeks, an increase in  $\zeta$ -potential values was observed in all three NEs with CLT. The previous drop in  $\zeta$ -potential levels might have been related to the equilibration of the formulations. Higher values of  $\zeta$ -potential compared to the initial levels of batch S8:2-CLT with no change in the pH suggest that this composition is more favorable when compared

to 9:1 and 7:3 surfactant and cosurfactant ratios. Although the values of  $\zeta$ -potential in the case of S9:1-CLT returned to around initial values, a higher standard deviation was observed. The increase in acidity was at the limit of acceptable variability of  $\pm 0.05$ . In the case of S7:3-CLT, an increase by 0.6 mV compared to initial values of  $\zeta$ -potential was recorded after 28 weeks. Despite the small change in value, an increase in the standard deviation was observed resulting from the separation of the surface charge peaks into fractions with positive and negative charges. These changes were accompanied by a decrease in pH of 0.08. These together indicate the onset of destabilizing processes and the inability of the 7:3 surfactant-to-cosurfactant ratio to provide stability for NEs in the long term. Analysis of the droplet size distributions over time revealed no significant changes for all NEs with CLT, which may be related to the stabilizing phenomena of the API.

Published studies regarding emulsion-based vaginal dosage forms (EVDF) are highly variable [20]. The volume of approximately 2 mL of vaginal discharge present in the vaginal lumen is 250–500 times less than the volume in commonly used apparatus such as USP I and USP II. Several researchers have tried to reduce this difference by designing a new simple setup consisting of dialysis bags with EVDF inside and a vessel/container with dissolution media [36,71]. In our pilot study, the dialysis bag was used to separate free CLT in medium from encapsulated form, but not to simulate systemic absorption. Another issue with a simulation of physiological conditions is related to the constant wash-out of the formulation from the vaginal lumen. This could be simulated by replacing the withdrawn sample volume with fresh media. In the case of pilot studies, we chose a 50 mM phosphate buffer as simulated vaginal fluid. The pH was adjusted to 3.5 to increase CLT solubility (based on our previous R&D studies). Due to the poor solubility of clotrimazole in aqueous media, we had to increase the volume of the buffer to 300 mL to avoid a possible limitation of the study due to the risk of the saturated medium. The study was designed using standardized apparatus and equipment to provide methods transferable to industrial protocols and to enable a focus on the technological aspects of NEs. No significant differences were observed between the batches ( $p > 0.05$ ), which showed high standard deviations. The high impact of the membrane of the dialysis bag was one of the major factors resulting in variability in drug release between the three samples analyzed. The selection of a dialysis membrane for the pilot studies was based on the formulation properties, and the purpose was not to simulate vaginal mucosa. Yet, this membrane was chosen due to the low sorption of CLT to regenerated cellulose and a small pore diameter of 2.5 nm, preventing an uncontrolled passage of NEs to the phosphate buffer. However, the obtained NEs revealed significant osmolality resulting in osmotic pressure between the NEs inside the dialysis bags and phosphate buffer outside, which created an influx of dissolution medium to the formulation. Changes in osmotic pressure have been described in several reports on colloids or nanomaterials encapsulated in dialysis bags [72–74]. In fact, we observed a swelling of the dialysis bags exclusively in samples containing NEs and did not record any swelling in the case of CLT suspension and cream (data not shown). Osmotic pressure may have caused micro-damages in the structure of the membrane and resulted in high standard deviations. Comparatively high SDs were not observed for the suspension and cream. Therefore, further investigation is necessary to avoid the influence of osmotic pressure on dialysis membrane integrity. Despite this fact, we were able to observe some insignificant differences in the release curves. The highest level of released API was observed in batch S7:3-CLT and S8:2-CLT (about 27% of CLT dose). Suspension of the CLT reached a similar level of released API to the S9:1-CLT batch (approximately 25% of the initial CLT loading). However, this difference is considered statistically insignificant ( $p > 0.05$ ), which is also visualized in overlapping standard deviations. Cream with CLT presented a significantly lower performance ( $p < 0.05$ ) in the pilot stationary test and released only approximately 5% of the initial dose of CLT. It is obvious that suspension is not considered a potential intravaginal formulation due to the almost immediate wash out from the vaginal lumen, the poor solubility caused by limited vaginal discharge, and possible irritating properties. The market reference—cream with CLT—yielded a limited



release of API, possibly due to the poor and slow diffusion of API through the formulation and the reduced penetration of the medium/vaginal discharge into the cream.

The stationary method was not discriminatory to distinguish the release kinetics of free CLT from the encapsulated form of the different batches. An additional test with a USP apparatus IV setup was performed to evaluate the resistance of the NEs to the wash out by vaginal discharge, the sensibility to stress conditions, and the role of the hydrophilic/lipophilic surfactants ratio in solubility kinetics and membrane permeability. The constant flow of medium in an open circuit simulates the potential of the formulations to confirm their activity, i.e., the constant availability of API. Surprisingly, despite the higher total volume of the medium ( $\approx 600$  mL per single sample), the levels of free API transferred to the medium were significantly lower by approximately 2.5 times compared to the stationary method. The statistical results for the NE batches and 1% CLT suspension obtained using the stationary and flow-through methods are significantly different ( $p < 0.05$ ), whereas, in the case of cream with CLT, the results are similar ( $p = 0.10$ ). However, the dynamic release method provided more consistent profiles due to the low standard deviations. The small variations are explainable by the fact that the latter were placed inside the flow-through cell which, due to its small volume of 18 mL, prevents the membrane from expanding. In the flow-through method, the most favorable performance was exhibited by the S9:1-CLT batch, while the batches S8:2-CLT and S7:3-CLT yielded similar and slightly lower concentrations in contrast to the stationary method, where S9:1-CLT presented the lowest mean values of released API among NEs, and S7:3-CLT had the highest concentration. This phenomenon is worth further investigation. One of our hypotheses involves the role of the compositions of the surfactants. CLT is more soluble in Span 80 than in poloxamers, and Span 80 as a hydrophobic surfactant is less miscible with water. The constant flow of fresh medium reduces the concentration of Span 80 in the medium on the outer side of the membrane, reducing the ratio of CLT penetration through the membrane of the dialysis bag. Pluronic F-68, as a hydrophilic surfactant, can diffuse more rapidly to the phosphate buffer medium and provide enhanced solubility compared to the pure phosphate buffer. The highest concentrations reached by S9:1-CLT might support this thesis. However, Pluronic F-68 is not able to solubilize CLT as much as Span 80, which resulted in lower levels of free API despite the overall larger volume of the acceptor medium. In the stationary method, where the medium was not entirely replaced with fresh buffer, the higher concentration of the lipophilic surfactant provided higher solubility of CLT, resulting in the batch S7:3 reaching the highest concentrations. However, this hypothesis requires further investigation in more discriminatory conditions to confirm the strong influence of surfactant composition on the differences in free API release kinetics. Another factor that may have had an impact is osmotic pressure, yet in both pilot tests, comparable swelling of the dialysis bag was observed. CLT cream reached the lowest and similar concentrations in both tests. This confirms that NEs are drug carriers feasible to provide higher doses of lipophilic substances compared to vastly used creams in the treatment of vaginal candidiasis.

The results of the pilot release studies were also presented in the form of CLT concentration in the medium of phosphate buffer. The purpose was to compare the free API levels obtained in the tested formulation depending on the release method used. Bearing in mind that the tests were not designed to simulate physiological conditions, the aim of these studies is to assess the kinetics of the release of free CLT from encapsulated form. Additionally, the concentrations were compared with MIC of *Candida* spp. for CLT. The increasing concentration among the experiments in the stationary method proves that the amount of medium was providing sufficient solubility for the CLT. NEs provide higher availability of the nonencapsulated CLT form when compared to cream. This short method was tested as a potential replacement for the time-consuming diffusion agar plate tests when the MIC was previously established. The MIC values were only used as the reference points. An additional benefit of this method is the lack of analytical difficulties related to the extraction of the API from the agar during sample preparation, e.g., HPLC measurements

or the selection of the sampling point on the agar plate. In the stationary method, we recorded the free CLT concentration ( $>8 \mu\text{g/mL}$ ) effective against all isolated yeast strains by Frej-Mądrzak et al. [1] after 30–90 min in the case of NEs and CLT suspension, or at the end of the experiment in case of MycoHydralin cream. Although the antifungal level of CLT for the majority of strains ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) was reached within 1 h of the test for all formulations, except the market reference, less favorable observations were recorded in the dynamic pilot study. The highest measured concentration of CLT did not reach the value of  $8 \mu\text{g/mL}$ . However, using the flow-through method, we observed the rapid release of free CLT within 10 min, in the amount providing MIC against most of the strains. In the stationary method, it must be taken into consideration that the total volume of the medium was 150 times greater than that found in physiological conditions, therefore potential concentrations in physiological conditions could be higher. However, this pilot release test was designed to assess the technological properties of NEs, such as release kinetics considering limited CLT solubility. Consequently, the excess of the medium was reduced from 500 times greater than physiological to 150 times. In the USP apparatus IV setup, the effective volume of phosphate buffer inside the flow-through cell (capacity of the cell minus the glass beads) was approximately 18 mL, which was only six times higher than physiological, but the highest concentration of CLT was only  $4 \mu\text{g/mL}$ . This might be due to the high flow of the medium; i.e.,  $2 \text{ mL/min}$  resulting from the pump properties. However, this experiment confirmed that part of the dose of free CLT is instantly available in contrast to the cream-based formulation. When considering future tests simulating physiological conditions, it would be beneficial to prepare the setup providing a slower flow of the medium inside the cells to simulate physiological conditions of the vagina more accurately, yet the total volume of the medium should enable sufficiently frequent sampling.

In summary, the obtained NEs met the initial requirements resulting from key factors of biopharmaceutical performance, i.e., a z-average of 50–60 nm, a narrow size distribution (high uniformity of the droplet size), a physiological pH of approximately 4.0, and osmolality within the range of 700–900 mOsm/kg. The most important factors characterizing the NEs performance within the study of the release of free CLT from the encapsulated form are the fast onset of CLT release from NE and the ability to reach MIC or a higher CLT concentration. Although all of the NEs-CLT batches presented similar performances, the formulation S8:2-CLT seemed the most promising, as it exhibited slightly lower variability of  $\zeta$ -potential between blank and drug-loaded formulations, the highest  $\zeta$ -potential and, unlike S7:3-CLT, did not show peaks of a negative charge after 28 weeks of stability evaluation. S8:2-CLT showed a fast onset of the release of the free CLT and reached the concentration  $> 8 \mu\text{g/mL}$  of CLT considerably earlier than other batches in the stationary method.

Another problem which has been noticed in our study is the lack of recommended methods for evaluation of the release of a free drug form from vaginal drug carriers. We used two methods of dissimilar dynamic and medium flow. We observed inconsistent results and none of the methods were discriminatory for tested batches. These methods together and alone could not simulate physiological conditions; i.e., the volume and secretion rate of vaginal discharge. It is important to develop a method that more accurately simulates the vaginal environment, i.e., the low volume of the ambient medium in the test cell, yet provides a sufficient amount for the collection of samples and a medium flow simulating the physiological exchange of vaginal discharge ( $6 \text{ mL/24 h}$ ) [75–77].

## 5. Conclusions

This study investigated the technological aspects of NEs with CLT. Tested batches were manufactured using methods feasible to transfer to an industrial scale. Stable NEs with favorable properties (mean droplet size, homogeneity, physiological pH, and osmolality) were obtained. Although the obtained NEs were similar, the most promising properties revealed batch S8:2-CLT as being suitable for future development. NEs are emerging potential drug carriers in the treatment of local vaginal conditions. There are no recommendations

for API release or the dissolution testing of EVDF. Stationary and flow-through methods provided incoherent results. It is crucial to develop a robust drug release testing protocol which will provide more discriminatory results and simulate physiological conditions. While the NEs provide greater availability of the nonencapsulated CLT form, future studies on the development of the final dosage form of mucoadhesive properties are required to extend vaginal residual time.

## 6. Patents

National and PCT patent applications have been filed for the inventions presented in this publication. Applications have been registered with numbers: P.438501 for UPRP—polish notational patent application and PCT/PL2022/000039 (publication number WO 2023/287309) for PCT patent application.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.M.-J. and M.S.; methodology, M.S., D.H.-G., S.M. and K.M.-J.; validation, M.S., D.H.-G. and S.M.; formal analysis, M.S.; investigation, M.S.; resources, K.M.-J., D.H.-G., S.M. and M.S.; data curation, M.S.; writing—original draft preparation, M.S.; writing—review and editing, M.S., D.H.-G., S.M. and K.M.-J.; visualization, M.S.; supervision, D.H.-G., S.M. and K.M.-J.; project administration, M.S.; funding acquisition, K.M.-J., S.M. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was financially supported by the Ministry of Health subvention according to the number of STM.D140.20.067 from the IT Simple system of Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland; MOBLILEX scholarship programme of the University of Lille, France.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** M.S. would like to thank the University of Lille as my host University during the MOBLILEX scholarship. M.S. would like to acknowledge Jadwiga Paszkowska for guidelines in the development of the HPLC method. The authors would like to thank Physiolution Polska sp. z. o.o. for support and for providing the HPLC equipment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Frej-Mądrzak, M.; Golec, S.; Włodarczyk, K.; Choroszy-Król, I.; Nawrot, U. Susceptibility to Clotrimazole of *Candida* Spp. Isolated from the Genitourinary System—A Single Center Study. *Pathogens* **2021**, *10*, 1142. [\[CrossRef\]](#)
2. Loveless, M.; Myint, O. Vulvovaginitis—Presentation of More Common Problems in Pediatric and Adolescent Gynecology. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *48*, 14–27. [\[CrossRef\]](#)
3. Mtibaa, L.; Fakhfakh, N.; Kallel, A.; Belhadj, S.; Belhaj Salah, N.; Bada, N.; Kallel, K. Les Candidoses Vulvovaginales: Étiologies, Symptômes et Facteurs de Risque. *J. Mycol. Med.* **2017**, *27*, 153–158. [\[CrossRef\]](#)
4. Ishiwada, N.; Kitajima, H.; Morioka, I.; Takeuchi, N.; Endo, M.; Watanabe, A.; Kamei, K. Nationwide Survey of Neonatal Invasive Fungal Infection in Japan. *Med. Mycol.* **2018**, *56*, 679–686. [\[CrossRef\]](#)
5. Lirio, J.; Giraldo, P.C.; Amaral, R.L.; Sarmiento, A.C.A.; Costa, A.P.F.; Goncalves, A.K. Antifungal (Oral and Vaginal) Therapy for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review Protocol. *BMJ Open* **2019**, *9*, e027489. [\[CrossRef\]](#)
6. Kendirci, M.; Koç, A.N.; Kurtoglu, S.; Keskin, M.; Kuyucu, T. Vulvovaginal Candidiasis in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2004**, *17*, 1545–1549. [\[CrossRef\]](#)
7. Denning, D.W.; Kneale, M.; Sobel, J.D.; Rautemaa-Richardson, R. Global Burden of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e339–e347. [\[CrossRef\]](#)
8. Foxman, B.; Muraglia, R.; Dietz, J.P.; Sobel, J.D.; Wagner, J. Prevalence of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis in 5 European Countries and the United States: Results from an Internet Panel Survey. *J. Low. Genit. Tract Dis.* **2013**, *17*, 340–345. [\[CrossRef\]](#)
9. Cooke, G.; Watson, C.; Deckx, L.; Pirotta, M.; Smith, J.; van Driel, M.L. Treatment for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis (Thrush). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, *2022*, CD009151. [\[CrossRef\]](#)
10. Nyirjesy, P.; Brookhart, C.; Lazenby, G.; Schwebke, J.; Sobel, J.D. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, S162–S168. [\[CrossRef\]](#)
11. Sobel, J.D.; Nyirjesy, P. Oteseconazole: An Advance in Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Future Microbiol.* **2021**, *16*, 1453–1461. [\[CrossRef\]](#)

12. Bhesania, A.H.; Narayankhedkar, A. Vulvovaginal Candidosis. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 240–250. [[CrossRef](#)]
13. Barnes, K.N.; Yancey, A.M.; Forinash, A.B. Ibrexafungerp in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Ann. Pharmacother.* **2023**, *57*, 99–106. [[CrossRef](#)]
14. Borhade, V.; Pathak, S.; Sharma, S.; Patravale, V. Clotrimazole Nanoemulsion for Malaria Chemotherapy. Part I: Preformulation Studies, Formulation Design and Physicochemical Evaluation. *Int. J. Pharm.* **2012**, *431*, 138–148. [[CrossRef](#)]
15. Balata, G.; Bakera, R.; Mahdi, M. Improvement of Solubility and Dissolution Properties of Clotrimazole by Solid Dispersions and Inclusion Complexes. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73*, 517. [[CrossRef](#)]
16. Bolla, P.K.; Meraz, C.A.; Rodriguez, V.A.; Deaguero, I.; Singh, M.; Yellepeddi, V.K.; Renukuntla, J. Clotrimazole Loaded Ufosomes for Topical Delivery: Formulation Development and In-Vitro Studies. *Molecules* **2019**, *24*, 3139. [[CrossRef](#)]
17. Srikrishna, S.; Cardozo, L. The Vagina as a Route for Drug Delivery: A Review. *Int. Urogynecol. J.* **2013**, *24*, 537–543. [[CrossRef](#)]
18. Das Neves, J.; Palmeira-de-Oliveira, R.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Rodrigues, F.; Sarmiento, B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. In *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*; Khutoryanskiy, V.V., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014; Volume 9781119941, pp. 99–132. ISBN 9781118794203.
19. Katz, D.F.; Yuan, A.; Gao, Y. Vaginal Drug Distribution Modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *92*, 2–13. [[CrossRef](#)]
20. Smoleński, M.; Karolewicz, B.; Gołkowska, A.M.; Nartowski, K.P.; Małolepsza-Jarmołowska, K. Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6455. [[CrossRef](#)]
21. Campaña-Seoane, M.; Peleteiro, A.; Laguna, R.; Otero-Espinar, F.J. Bioadhesive Emulsions for Control Release of Progesterone Resistant to Vaginal Fluids Clearance. *Int. J. Pharm.* **2014**, *477*, 495–505. [[CrossRef](#)]
22. Tedajo, G.M.; Bouttier, S.; Fourniat, J.; Grossiord, J.L.; Marty, J.P.; Seiller, M. Release of Antiseptics from the Aqueous Compartments of a w/o/w Multiple Emulsion. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 63–72. [[CrossRef](#)]
23. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Capmany, A.C.; Cañadas-Enrich, C.; de Febrer, N.B.; Suñer-Carbó, J.; Souto, E.B.; Clares-Naveros, B. Biopharmaceutical Profile of a Clotrimazole Nanoemulsion: Evaluation on Skin and Mucosae as Anticandidal Agent. *Int. J. Pharm.* **2019**, *554*, 105–115. [[CrossRef](#)]
24. Campaña-Seoane, M.; Pérez-Gago, A.; Vázquez, G.; Conde, N.; González, P.; Martínez, A.; Martínez, X.; García Varela, L.; Herranz, M.; Aguiar, P.; et al. Vaginal Residence and Pharmacokinetic Preclinical Study of Topical Vaginal Mucoadhesive W/S Emulsions Containing Ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* **2019**, *554*, 276–283. [[CrossRef](#)]
25. Bachhav, Y.G.; Patravale, V.B. Microemulsion Based Vaginal Gel of Fluconazole: Formulation, In Vitro and In Vivo Evaluation. *Int. J. Pharm.* **2009**, *365*, 175–179. [[CrossRef](#)]
26. Khattab, A.; Ismail, S. Formulation and Evaluation of Oxiconazole Nitrate Mucoadhesive Nanoemulsion Based Gel for Treatment of Fungal Vaginal Infection. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *8*, 33–40.
27. Bachhav, Y.G.; Patravale, V.B. Microemulsion-Based Vaginal Gel of Clotrimazole: Formulation, In Vitro Evaluation, and Stability Studies. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 476–481. [[CrossRef](#)]
28. Soriano-Ruiz, J.L.; Suñer-Carbó, J.; Calpena-Campmany, A.C.; Bozal-de Febrer, N.; Halbaut-Bellowa, L.; Boix-Montañés, A.; Souto, E.B.; Clares-Naveros, B. Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsion as Anticandidal Agent: Characterization and Evaluation on Skin and Mucosae. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 166–174. [[CrossRef](#)]
29. Vaginal preparations. In *European Pharmacopoea*, 11th ed.; EDQM Council of Europe: Strasbourg, France, 2023; Volume 1, pp. 1006–1008, *Ph. Eur.* 10.0, 1164 (01/2008).
30. Parveen, R.; Baboota, S.; Ali, J.; Ahuja, A.; Vasudev, S.S.; Ahmad, S. Oil Based Nanocarrier for Improved Oral Delivery of Silymarin: In Vitro and In Vivo Studies. *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 245–253. [[CrossRef](#)]
31. Sampathi, S.; Mankala, S.K.; Wankar, J.; Dodoala, S. Nanoemulsion Based Hydrogels of Itraconazole for Transdermal Drug Delivery. *J. Sci. Ind. Res.* **2015**, *74*, 88–92.
32. Ferreira, L.M.; Sari, M.H.M.; Cervi, V.F.; Gehrcke, M.; Barbieri, A.V.; Zborowski, V.A.; Beck, R.C.R.; Nogueira, C.W.; Cruz, L. Pomegranate Seed Oil Nanoemulsions Improve the Photostability and in Vivo Antinociceptive Effect of a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *144*, 214–221. [[CrossRef](#)]
33. Ahmad, J.; Mir, S.R.; Kohli, K.; Chuttani, K.; Mishra, A.K.; Panda, A.K.; Amin, S. Solid-Nanoemulsion Preconcentrate for Oral Delivery of Paclitaxel: Formulation Design, Biodistribution, and  $\gamma$  Scintigraphy Imaging. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 984756. [[CrossRef](#)]
34. Mahamat Nor, S.B.; Woi, P.M.; Ng, S.H. Characterisation of Ionic Liquids Nanoemulsion Loaded with Piroxicam for Drug Delivery System. *J. Mol. Liq.* **2017**, *234*, 30–39. [[CrossRef](#)]
35. Sessa, M.; Balestrieri, M.L.; Ferrari, G.; Servillo, L.; Castaldo, D.; D’Onofrio, N.; Donsì, F.; Tsao, R. Bioavailability of Encapsulated Resveratrol into Nanoemulsion-Based Delivery Systems. *Food Chem.* **2014**, *147*, 42–50. [[CrossRef](#)]
36. Kaur, A.; Saxena, Y.; Bansal, R.; Gupta, S.; Tyagi, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Panda, A.K.; Gabrani, R.; Dang, S. Intravaginal Delivery of Polyphenon 60 and Curcumin Nanoemulsion Gel. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18*, 2188–2202. [[CrossRef](#)]
37. Song, R.; Yan, F.; Cheng, M.; Dong, F.; Lin, Y.; Wang, Y.; Song, B. Ultrasound-Assisted Preparation of Exopolysaccharide/Nystatin Nanoemulsion for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 2027–2044. [[CrossRef](#)]
38. Atinderpal, K.; Kapoor, N.; Gupta, S.; Tyag, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Gabrani, R.; Dang, S. Development and Characterization of Green Tea Catechins and Ciprofloxacin-Loaded Nanoemulsion for Intravaginal Delivery to Treat Urinary Tract Infection. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 442–452. [[CrossRef](#)]



39. Özer, Ö.; Özyazici, M.; Tedajo, M.; Taner, M.S.; Köseoglu, K. W/O/W Multiple Emulsions Containing Nitroimidazole Derivates for Vaginal Delivery. *Drug Deliv.* **2007**, *14*, 139–145. [[CrossRef](#)]
40. Małolepsza-Jarmołowska, K.; Smoleński, M. Pharmaceutical Composition in the Form of Vegetable Oil-Based Nanoemulsion, Multiphase Composition and Method of Preparation of These Compositions 2022, PCT/PL2022/000039. Available online: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2023287309> (accessed on 4 May 2023).
41. Dos Santos, M.K.; Kreutz, T.; Danielli, L.J.; De Marchi, J.G.B.; Pippi, B.; Koester, L.S.; Fuentefria, A.M.; Limberger, R.P. A Chitosan Hydrogel-Thickened Nanoemulsion Containing Pelargonium Graveolens Essential Oil for Treatment of Vaginal Candidiasis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *56*, 101527. [[CrossRef](#)]
42. Kaur, A.; Gupta, S.; Tyagi, A.; Sharma, R.K.; Ali, J.; Gabrani, R.; Dang, S. Development of Nanoemulsion Based Gel Loaded with Phytoconstituents for the Treatment of Urinary Tract Infection and in Vivo Biodistribution Studies. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 611–619. [[CrossRef](#)]
43. Mirza, M.A.; Ahmad, S.; Mallick, M.N.; Manzoor, N.; Talegaonkar, S.; Iqbal, Z. Development of a Novel Synergistic Thermosensitive Gel for Vaginal Candidiasis: An In Vitro, In Vivo Evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 275–282. [[CrossRef](#)]
44. Skowron, M.; Zalejska-Fiolka, J.; Błaszczuk, U.; Birkner, E. Pro-Health Properties of Rapeseed and Olive Oil. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2018**, *72*, 1104–1113. [[CrossRef](#)]
45. Paik, B.; Tong, L. Topical Omega-3 Fatty Acids Eyedrops in the Treatment of Dry Eye and Ocular Surface Disease: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13156. [[CrossRef](#)]
46. Ishak, W.M.W.; Katas, H.; Yuen, N.P.; Abdullah, M.A.; Zulfakar, M.H. Topical Application of Omega-3-, Omega-6-, and Omega-9-Rich Oil Emulsions for Cutaneous Wound Healing in Rats. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2019**, *9*, 418–433. [[CrossRef](#)]
47. Fu, Y. Marine N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Diseases. *Adv. Diet. Lipids Human. Health* **2022**, *56*, 225–242. [[CrossRef](#)]
48. McClements, D.J. Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729. [[CrossRef](#)]
49. Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential-What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. [[CrossRef](#)]
50. Valea, F.A. Reproductive Anatomy Gross and Microscopic, Clinical Correlations. In *Comprehensive Gynecology*; Lobo, R.A., Gershenson, D.M., Lentz, G.M., Valea, F.A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2017; pp. 48–77. ISBN 978-0-323-32287-4.
51. WHO; UNFPA; FHI. *Advisory Note Use and Procurement of Additional Lubricants for Male and Female Condoms: WHO/UNFPA/FHI360 Advisory Note*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
52. Lai, S.K.; O'Hanlon, D.E.; Harrold, S.; Man, S.T.; Wang, Y.-Y.; Cone, R.; Hanes, J. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1482–1487. [[CrossRef](#)]
53. Wik, J.; Bansal, K.K.; Assmuth, T.; Rosling, A.; Rosenholm, J.M. Facile Methodology of Nanoemulsion Preparation Using Oily Polymer for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 1228–1240. [[CrossRef](#)]
54. Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. Nano-Emulsions. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* **2005**, *10*, 102–110. [[CrossRef](#)]
55. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841. [[CrossRef](#)]
56. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-Emulsions and Micro-Emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 978–985. [[CrossRef](#)]
57. Najlah, M.; Suliman, A.S.; Tolaymat, I.; Kurusamy, S.; Kannappan, V.; Elhissi, A.M.A.; Wang, W. Development of Injectable PEGylated Liposome Encapsulating Disulfiram for Colorectal Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 610. [[CrossRef](#)]
58. Mitri, K.; Shegokar, R.; Gohla, S.; Anselmi, C.; Müller, R.H. Lipid Nanocarriers for Dermal Delivery of Lutein: Preparation, Characterization, Stability and Performance. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414*, 267–275. [[CrossRef](#)]
59. Mehnert, W. Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization and Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 165–196. [[CrossRef](#)]
60. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [[CrossRef](#)]
61. Zeng, L.; Xin, X.; Zhang, Y. Development and Characterization of Promising Cremophor EL-Stabilized o/w Nanoemulsions Containing Short-Chain Alcohols as a Cosurfactant. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 19815–19827. [[CrossRef](#)]
62. Lacey, C.J.; Woodhall, S.; Qi, Z.; Sawant, S.; Cowen, M.; McCormack, S.; Jiang, S. Unacceptable Side-Effects Associated with a Hyperosmolar Vaginal Microbicide in a Phase 1 Trial. *Int. J. STD AIDS* **2010**, *21*, 714–717. [[CrossRef](#)]
63. Zhao, M.; Thuret, G.; Piselli, S.; Pipparelli, A.; Acquart, S.; Peoc'h, M.; Dumollard, J.-M.; Gain, P. Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2008**, *49*, 550. [[CrossRef](#)]
64. Pham Le Khanh, H.; Nemes, D.; Rusznyák, A.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives. *Polymers* **2022**, *14*, 279. [[CrossRef](#)]
65. Camargo, D.A.; Carreras, M.R.; Montoya, E.G.; Lozano, P.P.; Ramon, J.; Grau, T.; Maria, J.; Negre, S. Osmolality Predictive Models of Different Polymers as Tools in Parenteral and Ophthalmic Formulation Development. *Int. J. Pharm.* **2018**, *543*, 190–200. [[CrossRef](#)]

66. Tian, X.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S. L-Lactic Acid Production Benefits from Reduction of Environmental Osmotic Stress through Neutralizing Agent Combination. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 1917–1923. [[CrossRef](#)]
67. Vieira, O.V.; Hartmann, D.O.; Cardoso, C.M.P.; Oberdoerfer, D.; Baptista, M.; Santos, M.A.S.; Almeida, L.; Ramalho-Santos, J.; Vaz, W.L.C. Surfactants as Microbicides and Contraceptive Agents: A Systematic In Vitro Study. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2913. [[CrossRef](#)]
68. Zhang, S.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Guo, T.; Hou, X.; He, Z.; He, Z.; Shen, L.; Feng, N. Temperature-Sensitive Gel-Loaded Composite Nanomedicines for the Treatment of Cervical Cancer by Vaginal Delivery. *Int. J. Pharm.* **2020**, *586*, 119616. [[CrossRef](#)]
69. Minamisakamoto, T.; Nishiguchi, S.; Hashimoto, K.; Ogawara, K.I.; Maruyama, M.; Higaki, K. Sequential Administration of PEG-Span 80 Niosome Enhances Anti-Tumor Effect of Doxorubicin-Containing PEG Liposome. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *169*, 20–28. [[CrossRef](#)]
70. Sanfeld, A.; Steinchen, A. Emulsions Stability, from Dilute to Dense Emulsions-Role of Drops Deformation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *140*, 1–65. [[CrossRef](#)]
71. Mirani, A.; Kundaikar, H.; Velhal, S.; Patel, V.; Bandivdekar, A.; Degani, M.; Patravale, V. Tetrahydrocurcumin-Loaded Vaginal Nanomicrobicide for Prophylaxis of HIV/AIDS: In Silico Study, Formulation Development, and in Vitro Evaluation. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2019**, *9*, 828–847. [[CrossRef](#)]
72. Robbes, A.S.; Cousin, F.; Mériguet, G. Osmotic Stress on Concentrated Colloidal Suspensions: A Path towards Equilibrium? *Braz. J. Phys.* **2008**, *39*, 156–162. [[CrossRef](#)]
73. Briones, E.; Colino, C.I.; Lanao, J.M. Study of the Factors Influencing the Encapsulation of Zidovudine in Rat Erythrocytes. *Int. J. Pharm.* **2010**, *401*, 41–46. [[CrossRef](#)]
74. Liao, J.; Pham, K.A.; Breedveld, V. Dewatering Cellulose Nanomaterial Suspensions and Preparing Concentrated Polymer Composite Gels via Reverse Dialysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 9671–9679. [[CrossRef](#)]
75. Arany, P.; Papp, I.; Zichar, M.; Regdon, G.; Béres, M.; Szalóki, M.; Kovács, R.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Vecsernyés, M.; et al. Manufacturing and Examination of Vaginal Drug Delivery System by Fdm 3d Printing. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1714. [[CrossRef](#)]
76. Tietz, K.; Klein, S. In Vitro Methods for Evaluating Drug Release of Vaginal Ring Formulations—A Critical Review. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 538. [[CrossRef](#)]
77. Tietz, K.; Klein, S. Simulated Genital Tract Fluids and Their Applicability in Drug Release/Dissolution Testing of Vaginal Dosage Forms. *Dissolut Technol.* **2018**, *25*, 40–51. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### III. Publikacja C

**Smoleński Michał**, Haznar-Garbacz Dorota\*, Florin-Muschert Susanne, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: *Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego*, Farmacja Polska, 2022, vol. 78, nr 12, s. 675-684, DOI:10.32383/farmpol/165925



TOM 78 · NR 12  
ROK 2022  
GRUDZIEŃ  
ISSN 2544-8552

# farmacja polska

czasopismo Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego

Index Copernicus: ICV=70,21  
punkcja MEN: 70 pkt

**TEMAT**  
numeru

## **BADANIE DOSTĘPNOŚCI FARMACEUTYCZNEJ CLOTRIMAZOLUM Z LEKÓW DOPOCHWOWYCH**

Rak płuca – terapia pembrolizumabem • Wytwarzanie leków  
personalizowanych metodą FDM • Nasiona kakaowca – składniki bioaktywne



# Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego

Michał Smoleński<sup>1</sup>, Dorota Haznar-Garbacz<sup>1</sup>, Susanne Florin-Muschert<sup>2</sup>,  
Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008, F-59000 Lille, France

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

## Adres do korespondencji

Dorota Haznar-Garbacz,  
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska;  
e-mail: dorota.haznar-garbacz@umw.edu.pl

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## Źródła finansowania

Prezentowane wyniki badań zrealizowano w ramach tematu ujętego w systemie Simple pod nr STM.D140.20.067. Badania zrealizowano w ramach grantu Mobilix przyznanego przez Université de Lille we Francji.

## Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2023.04.15

Zaakceptowano: 2023.05.05

Opublikowano on-line: 2023.05.05


## DOI

10.32383/farmpol/165925


## ORCID

Michał Smoleński –  0000-0002-6075-9866


Dorota Haznar-Garbacz

–  0000-0002-0626-6067

Susanne Florin-Muschert

–  0000-0001-7111-6105

Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska

–  0000-0002-0127-835X

## Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

## Development of the method for the pharmaceutical availability testing of clotrimazole from multiphase semi-solid vaginal dosage forms

**Introduction.** The intravaginal drug administration enables treatment of the local and systemic diseases. The anatomy and physiology of a vagina provide several difficulties for drug technologists due to the small amount and continuous production of vaginal discharge, especially in the case of lipophilic drugs often characterized by insufficient solubility. The application of poorly soluble drug substances in the form of nanoemulsions improves their availability. However, in the case of nanoemulsion-based vaginal dosage forms, no standardized methods have been defined for testing the amount of a drug released from encapsulated form.

**Aim of the study.** Comparison and development of a method for testing the availability of active pharmaceutical substances from vaginal nanoemulsion-based drug forms.

**Materials and methods.** The nanoemulsion and reference products (cream and suspension) were placed in a dialysis bag separating them from the acceptor medium. The changes in the concentration of the free fraction of the model active substance – clotrimazole were assessed. The experiments were performed using 2 static methods of different mixing method (magnetic stirring and USP apparatus III) and 2 dynamic methods including the flow of the medium through the flow-through cell at 2 mL/min and 2 mL/h. The experiments were conducted for 5 h.

**Results.** Incomplete release of the active pharmaceutical ingredient was observed for all tested formulations over the experiment. Despite

the delivery of a fresh portion of the medium, low concentrations of the free clotrimazole fraction were observed for both flow-through methods i.e., a maximum of about 7.5% of the dose for the 2 mL/min flow rate and 5% for the 2 mL/h flow rate. In stationary methods, the maximum recorded concentrations of the free fraction of the drug corresponded to approx. 25% of the initial amount. For the pilot stationary method, high standard deviations (SD) were observed, which affected the low discriminatory properties of the method. The method based on the reciprocating cylinder dissolution apparatus provided results exhibiting smaller SD and more significant differences between the tested formulations. The highest concentrations among the evaluated formulations were observed for nanoemulsion or nanoemulsion and suspension, depending on the used test technique. Significantly lower doses of the drug were released from the cream in almost every test.

**Conclusions.** The selection of the method used to assess the pharmaceutical availability of an active pharmaceutical ingredient has a crucial impact on the release profiles obtained. The stationary method using a reciprocating cylinder apparatus (USP apparatus III) had the highest measurement precision and provided the most discriminatory results.

**Keywords:** dissolution, dosage forms, vagina, nanoemulsion, clotrimazole.

© Farm Pol, 2022, 78 (12): 675–684

## Przedmiot badań

Dopochwowe podanie umożliwia precyzyjne miejscowe leczenie zakażeń bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych, jak również może być wykorzystane do systemowego podawania leków z pominięciem krążenia wątrobowego [1–5]. Jednakże, opracowanie dopochwowych formuacji stanowi trudność z uwagi na fizjologiczne uwarunkowania miejsca podania. Pierwszą trudnością tej drogi podania jest niewielka ilość wydzieliny pochwy obecna w świetle pochwy, wynosząca około 2 mL, i ograniczająca rozpuszczanie substancji leczniczych, kolejną trudnością jest klirens tej wydzieliny w ilości do 6 mL/24 h, co jest przyczyną krótkiego czasu kontaktu leku z błoną śluzową i może wpływać na ograniczenie czasu przebywania substancji leczniczej w miejscu podania [6–8].

Formuacje dopochwowe oparte na nanoemulsjach stanowią dynamicznie rozwijający się dział technologii postaci leków dopochwowych. Zastosowanie nanoemulsji w tej drodze podania dostarcza korzyści, takich jak: a) możliwość jednoczesnego podania leków lipofilowych i hydrofilowych, b) zwiększoną adhezję do błony śluzowej pochwy, c) możliwości dostosowania wielkości fazy rozproszonej do potrzeb

terapeutycznych związanych z przenikaniem przez warstwę wydzieliny pochwy i warstw ściany pochwy [9].

Pomimo dużego zainteresowania postacią leku, wciąż brakuje usystematyzowanych metod pozwalających testować dostępność farmaceutyczną leku z postaci emulsyjnych w dopochwowym podaniu leku. Dotychczasowe rekomendacje *Food and Drug Administration* (FDA) oraz komitetu *United States Pharmacopeia* (USP) określają metody badawcze głównie dla tabletek i krążków dopochwowych obejmujące wykorzystanie urządzeń farmakopealnych, takich jak aparaty koszykowe, łopatkowe, aparat USP typu VII, lub metod niekonwencjonalnych, takich jak wytrząsarki i inkubatory [10–13]. Modele farmakopealne znajdują zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako narzędzia służące do porównania technologii, jednak nie są w stanie symulować warunków fizjologicznych. Kale *et al.* podjęli starania w celu zaadaptowania modelu Setnikar i Fantelli do prowadzenia badań dostępności farmaceutycznej postaci dopochwowych w skali zbliżonej do warunków fizjologicznych [14, 15]. Model ten nie znajduje zastosowania w badaniu formuacji emulsyjnych. Oddzielenie postaci leku od medium akceptorowego za pomocą błony półprzepuszczalnej, pozwala na oznaczanie wolnej frakcji leku niezwiązanej z fazą lipofilową nanoemulsji, co wydaje się istotne z punktu widzenia skuteczności leczenia [16, 17].

## Cel pracy

Celem pracy jest opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej substancji czynnej (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) z dopochwowych wielofazowych postaci na bazie emulsyjnej, tj. kinetyki przechodzenia leku do fazy wodnej z fazy olejowej, w której jest związany. Jako substancję czynną zastosowano clotrimazolom (CLT), w przypadku klasyfikacji BCS dotyczącej doustnego podania leków, zaliczaną do grupy BCS II, cechującą się niską rozpuszczalnością i wysoką przenikalnością. Do badań wykorzystano nanoemulsję własnej receptury, będącą przedmiotem zgłoszenia patentowego [18].

Pożądana metoda badania dostępności farmaceutycznej powinna zapewniać warunki dyskryminujące dla 3 badanych formuacji – nanoemulsji zawierającej *clotrimazolom* (NE-CLT), zawiesiny i komercyjnego produktu referencyjnego (kremu), jednocześnie zapewniając warunki zbliżone do fizjologicznych. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem dwóch metod stacjonarnych i dwóch metod

przeplwyowych z wykorzystaniem aparatury opisanej w Farmakopei, jak również metod niekonwencjonalnych.

## Materiały i metody

### Materiały

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zastosowano następujące materiały i odczynniki chemiczne: *clotrimazolum* (CLT) Pol-Aura (Różanowo, Polska); olej rzepakowy Bunge Polska Sp. z o.o. (Kruszwica, Poland); 90% kwas mlekowy, poloxamer 188 (Pluronic F-68) Pol-Aura (Różanowo, Polska); poloxamer 407 (Pluronic F-127), glikol polietylenowy 200 (PEG200), monooleinian sorbitanu (Span 80) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA lub Steinheim, Niemcy).

Acetonitryl HPLC gradient (ACN) z S.Witko (Łódź, Polska). Diwodorofosforan (V) potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Wodę do HPLC (< 0,05 μS/cm) użytą do przygotowania formulacji i wszystkich eksperymentów wyprodukowano w laboratorium z wykorzystaniem urządzenia Hydrolab Ultra UV (Hydrolab Sp z o.o., Straszyn, Polska).

Wszystkie zastosowane odczynniki chemiczne były klasy „czysty do analizy”.

Komercyjny produkt referencyjny 1% krem z CLT, MycoHydralin (Bayer Healthcare, Loos, Francja) zakupiono w lokalnej aptece ogólnodostępnej we Francji.

### Metody

#### Otrzymywanie nanoemulsji zawierającej clotrimazolum do badań

W celu przygotowania nanoemulsji przepisana ilość oleju rzepakowego, Spanu 80 i PEG 200 wymieszano wstępnie korzystając z mieszadła magnetycznego. Następnie, wskazaną ilość substancji czynnej rozpuszczono w uprzednio podgrzanej frakcji lipofilowej, po czym kroplami wprowadzono roztwór Poloxameru 188 i kwasu mlekowego. Uzyskaną makroemulsję pozostawiono na 24 h do ustabilizowania, mieszając z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Formulację poddano homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora szybkoobrotowego (PRO250, PRO Scientific Inc., Oxford, USA; 13 000 ± 200 obr./min, 10 min), następnie dwóm cyklom homogenizacji wysokociśnieniowej (GEA PandaPLUS 2000, GEA Mechanical Equipment Italia S.p.A, Parma, Włochy; 1300 ± 100 bar).

Skład formulacji nanoemulsji zawierającej *clotrimazolum* (NE-CLT) przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Skład nanoemulsji zawierającej clotrimazolum.

**Table 1.** Composition of nanoemulsion loaded with clotrimazole.

Składnik	Zawartość [% w/w]
<i>Clotrimazolum</i>	1,0
Olej rzepakowy	20,0
Kwas mlekowy	0,6
Pluronic F-68	16,0
PEG 200	6,6
Span 80	4,0
Woda do HPLC	51,8

#### Pomiar wielkości kropli oleju, współczynnika polidispersyjności, potencjału zeta, pH i osmolalności

Otrzymaną formulację poddano badaniu na analizatorze wielkości cząstek Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., Worcester-shire, UK) metodą dyfrakcji laserowej (ang. *DLS - Dynamic Light Scattering*) i elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *ELS - Electrophoretic light scattering*), wykorzystując ustawienie lasera pod kątem 173°. Badanie przeprowadzono w temperaturze 25 ± 0,1°C. Badaną nanoemulsję rozcieńczono 50-krotnie w wodzie do HPLC. Zmierzono średnią średnicę kropli oleju (ang. *z-average*), współczynnik polidispersyjności (ang. *Polydispersity index, PDI*) i wartość potencjału zeta (ang. *z-potential*).

Pomiar pH przeprowadzono za pomocą pH-metru Mettler Toledo SevenMulti S40 (Mettler-Toledo LLC, Columbus, USA) wyposażonego w elektrodę szklaną.

Pomiar osmolalności wykonano z użyciem Micro-osmometru Loeser TYP 6 (Loeser Messtechnik, Berlin, Germany). Próbkę rozcieńczono dwukrotnie przed pomiarem osmolalności.

Wszystkie pomiary przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

#### Przygotowanie zawiesiny z CLT

Zawiesinę CLT, jako jedną z formulacji referencyjnych, przygotowano poprzez zawieszenie zmikronizowanej substancji czynnej w wodzie do HPLC. Dla przygotowania 100 g zawiesiny odważono 1,0 g CLT, który następnie wprowadzono do 99,0 g wody do HPLC. Mieszaninę poddano intensywnemu wytrząsaniu przez 15 minut do pokonania napięcia powierzchniowego. Zawiesinę wstępnie wymieszano na mieszadle magnetycznym przez 10 min z prędkością 350–500 obr./min. Następnie, zawiesinę poddano sonikacji przez 15 min i pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym, utrzymując 350–500 obr./min.

**Badanie zmiany stężenia  
wolnej frakcji CLT z nanoemulsji  
i formulacji referencyjnych –  
pilotażowa metoda stacjonarna  
z wykorzystaniem mieszadła  
magnetycznego**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji metodą stacjonarną zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatury składającej się z łaźni wodnej (Erweka GmbH, Langen, Niemcy), w której zanurzono szklane naczynia (zlewki) o cylindrycznym kształcie (Erweka GmbH, Langen, Niemcy). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. 300 mL medium umieszczono w szklanych naczyniach i termostatowano w warunkach 37°C, jednocześnie mieszając przy prędkości 100 obr./min z wykorzystaniem wielostanowiskowego mieszadła magnetycznego. Badanie przeprowadzono dla 3 formulacji, tj. nanoemulsji z CLT (NE-CLT), 1% zawiesiny i kremu MycoHydralin. Dla oddzielenia frakcji CLT związanej w formulacji od wolnego CLT wykorzystano worki dializacyjne Servapor, wykonane z regenerowanej celulozy o wartości odcięcia masy cząsteczkowej do 12 000 Da i porach o średnicy 2,5 nm. Dla ujednolicenia postępowania do badań przyjęto długość worka dializacyjnego wynoszącą 7 cm przy średnicy 16 mm. Błony kondycjonowano w medium przez 1 h przed badaniem. Do worka dializacyjnego wprowadzano po 5 mL badanych preparatów (formulacji nanoemulsji, zawiesiny i kremu z CLT). Worki dializacyjne zostały zabezpieczone na obu końcach klipsami, które utrzymywały badane formulacje w medium w pozycji wertykalnej. Badanie prowadzono przez 5 h, pobierając próbki co 30 min. Objętość pojedynczej próbki ustalono na 5 mL, którą każdorazowo zastępowano jednakową objętością świeżego medium. Pobrane próbki rozcieńczano 1:1 z ACN celem zapewnienia odpowiedniej stabilności, filtrowano przez filtry strzykawkowe z regenerowanej celulozy (25 mm; 0,22 µm) i analizowano metodą HPLC opisaną w rozdziale *Oznaczanie stężenia CLT metodą RP-HPLC*.

**Badanie zmiany stężenia  
wolnej frakcji CLT z nanoemulsji  
i formulacji referencyjnych –  
metoda stacjonarna z wykorzystaniem  
aparatu USP III**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą stacjonarną zostało również przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu z ruchomym cylindrem, znanym również jako aparat typu III według USP [19, 20]. W tym celu zastosowano

aparat Varian Bio-Dis Dissolution System z pompą VK 750D (Varian Inc., Weston Parkway, Cary, USA). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. W szklanych cylindrycznych zlewkach o pojemności 300 mL umieszczono 200 mL medium i termostatowano w warunkach 37°C. Celem oddzielenia formulacji od medium akceptorowego wykorzystano worki dializacyjne opisane w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na mniejszy rozmiar komórki objętość pojedynczej próbki zredukowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formulacji, tj. nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny i kremu MycoHydralin. Prędkość ruchu posuwistego cylindrów zawierających formulacje ustalono na 5 zanurzeń na minutę celem zapewnienia odpowiedniego mieszania próbek. Badanie prowadzono przez 5 h, pobierając próbki co 30 min. Próbkę przygotowano do analizy zgodnie z metodą opisaną w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*.

**Badanie zmiany stężenia  
wolnej frakcji CLT z nanoemulsji  
i formulacji referencyjnych – metoda  
przepływowa z wykorzystaniem  
aparatu USP IV**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą dynamiczną, przepływową zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu przepływowego (znanego również jako USP apparatus IV). Zestaw składał się z celki przepływowej o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel, Szwajcaria) i pompy tłokowej (CY 7-50, Sotax AG, Basel, Szwajcaria). Jako medium akceptorowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy o pH 3,5. Pojemność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględniającą objętość zajmowaną przez złożone szklanych kulek, ustalono na 18 mL. Badanie prowadzono w układzie otwartym. Przepływ medium ustalono na 2 mL/min, które stanowiło najmniejszą prędkość przepływu medium gwarantującą stabilną pracę pompy tłokowej. Celki przepływowe termostatowano w warunkach 37°C. Celem oddzielenia formulacji od medium akceptorowego wykorzystano worki dializacyjne opisane w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredukowano



do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla 3 formu-  
lacji tj., nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny i kremu  
MycHydralin. Badanie prowadzono przez 5 h.  
Próbki pobierano co 10 min przez 1 h eksper-  
ymentu, następnie co 30 min do końca testu. Próbki  
przygotowano do analizy zgodnie z metodą opi-  
saną w rozdziale *Badanie zmiany stężenia wolnej  
frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyj-  
nych – pilotażowa metoda stacjonarna z wyko-  
rzystaniem mieszadła magnetycznego*.

#### **Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych – metoda przepływowa z wykorzystaniem aparatu USP IV i pompy strzykawkowej**

Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT  
z nanoemulsji i produktów referencyjnych metodą  
dynamiczną, przepływową zostało przeprowa-  
dzone z wykorzystaniem celki przepływowej  
o pojemności 22,6 mL (CE 1, Sotax AG, Basel,  
Szwajcaria), wchodzącej w skład aparatu przepły-  
wowego (USP apparatus IV), oraz pompy strzy-  
kawkowej (PhD2000 Infusion, Harvard Apparatus,  
Holliston MA, USA) [19, 20]. Jako medium akcep-  
torowe zastosowano 50 mM bufor fosforanowy  
o pH 3,5. Rezerwuuar medium akceptorowego sta-  
nowiły strzykawki o pojemności 30 mL. Pojem-  
ność rzeczywistą celki pomiarowej, uwzględnia-  
jącą objętość zajmowaną przez złożone szklanych  
kulek, ustalono na 18 mL. Przepływ medium  
ustalono na 2 mL/h, które stanowiło najmniej-  
szą prędkość przepływu medium gwarantującą  
stabilną pracę pompy tłokowej. Celki przepły-  
wowe termostatowano w warunkach 37°C. Celem  
oddzielenia formulacji od medium akceptorowego  
wykorzystano worki dializacyjne opisane w roz-  
dziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji  
CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych  
– pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzy-  
staniem mieszadła magnetycznego*. Z uwagi na  
rozmiar celki objętość pojedynczej próbki zredu-  
kowano do 2 mL. Badanie przeprowadzono dla  
3 formuacji, tj. nanoemulsji z CLT, 1% zawiesiny  
i kremu MycoHydralin. Badanie prowadzono przez  
5 h, pobierając próbki co 60 min. Próbki przygoto-  
wano do analizy zgodnie z metodą opisaną w roz-  
dziale *Badanie zmiany stężenia wolnej frakcji  
CLT z nanoemulsji i formulacji referencyjnych –  
pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzysta-  
niem mieszadła magnetycznego*.

#### **Oznaczanie stężenia CLT metodą RP-HPLC**

Oznaczanie stężenia CLT przeprowadzono za  
pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

w układzie faz odwróconych (ang. *Reversed phase  
– High-Performance Liquid Chromatography,  
RP-HPLC*) z wykorzystaniem aparatu Shima-  
dzu LC-2050C (Shimadzu U.S.A Manufacturing  
Inc., Canby, USA), wyposażonego w detektor typu  
DAD (ang. *Diode Array Detector*). Zastosowano  
kolumnę chromatograficzną Gemini C18 o wymia-  
rach 150 mm x 4,6 mm, 3 µm. Badanie prowadzono  
w warunkach elucji izokratycznej z użyciem fazy  
ruchomej składającej się z acetonitrylu i 20 mM  
buforu fosforanowego o pH 6,8 w stosunku 60: 40  
(v/v). Prędkość przepływu wynosiła 1,5 mL/min.  
Objętość nastrzyknięcia ustalono na 20 µL. Detek-  
cję CLT prowadzono przy długości fali wynoszącej  
265 nm. Czas retencji wynosił ok. 5 min. W zakre-  
sie stężeń 2–300 µg/mL uzyskano liniowy zakres  
detekcji o współczynniku  $R^2 = 0,999$ .

#### **Analiza statystyczna**

Wszystkie analizy przeprowadzono w 3 pomia-  
rach. Zostały dla nich obliczone odchylenia stan-  
dardowe (SD). Dokonano analizy statystycznej  
wyników za pomocą metody analizy warian-  
cji (ANOVA) dla poziomu ufności 95%. Obliczeń  
dokonano korzystając z wbudowanego narzędzia  
„Analiza danych” w oprogramowaniu Microsoft  
Excel.

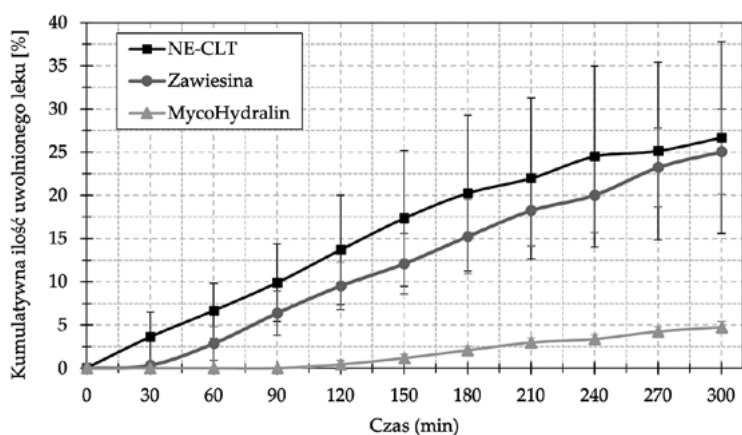
#### **Wyniki**

##### **Pomiar średniej wielkości kropli oleju, potencjału zeta i współczynnika polidispersyjności**

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów  
uzyskano średnią wielkość kropli oleju ( $z$ -average)  
wynoszącą  $55,49 \pm 0,44$  nm, współczynnik poli-  
dispersyjności ( $PDI$ ) –  $0,159 \pm 0,009$  oraz poten-  
cjał zeta ( $z$ -potential) wynoszący  $19,70 \pm 1,50$  mV.  
Średnia wartość pH badanej nanoemulsji wynosiła  
 $4,06 \pm 0,05$ , natomiast osmolalność zmierzono na  
poziomie  $852 \pm 17$  mOsm/kg.

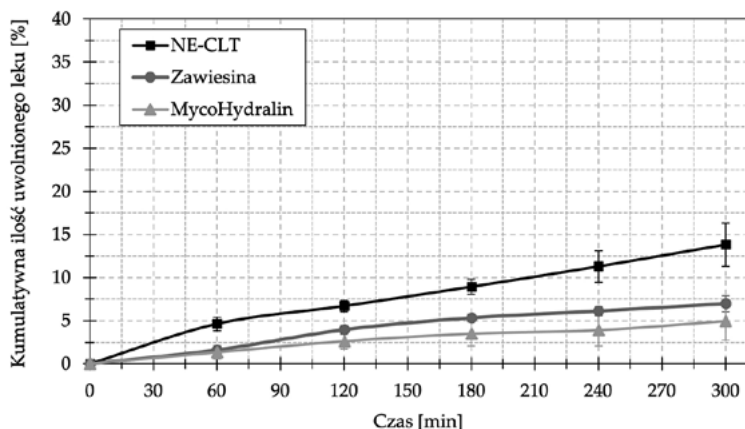
##### **Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – pilotażowa metoda stacjonarna z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego**

Wyniki uzyskanych profili zmiany kumulowa-  
nych ilości wolnej frakcji leku w czasie z postaci  
związanej z formulacją przedstawiono na **ryci-  
nie 1**. Obserwowane profile wskazują na niepełne  
uwolnienie wolnego API z postaci leku. Wyniki  
uzyskane dla NE-CLT i zawiesiny cechowały się  
wysokim odchyleniem standardowym, w prze-  
ciwienństwie do kremu MycoHydralin. Obie for-  
mulacje osiągnęły średnie wartości wolnej frakcji  
CLT na poziomie 22,5–25,0% dawki leku w czasie



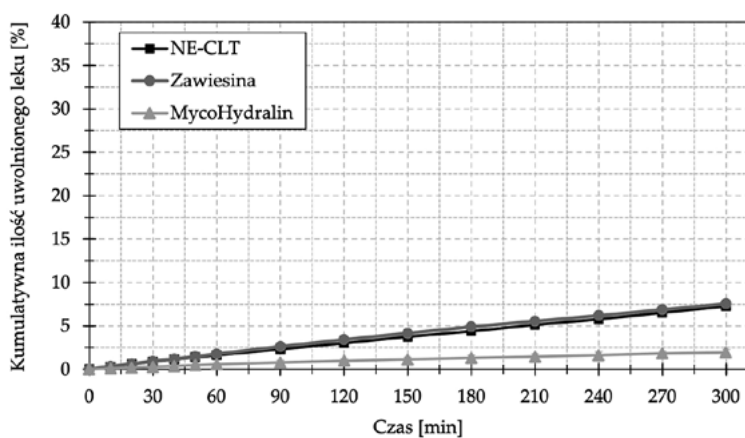
**Rycina 1.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulacyjny procent dawki leku – oznaczenie metodą stacjonarną (n = 3).

**Figure 1.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – stationary method (n = 3).



**Rycina 2.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulacyjny procent dawki leku – oznaczenie metodą USP III (n = 3).

**Figure 2.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – USP III method (n = 3).



**Rycina 3.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulacyjny procent dawki leku – oznaczenie metodą przepływową USP IV (n = 3).

**Figure 3.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – USP IV flow-through method (n = 3).

5 h. Otrzymane profile cechowały się istotnie większymi wartościami w porównaniu z kremem MycoHydralin ( $p < 0,05$ ), dla którego zaobserwowano stężenie wolnej frakcji CLT odpowiadające 5% dawki leku. Między NE-CLT a zawiesiną nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie ( $p = 0,40$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla NE-CLT w 30 min, zawiesiny w 60 min, zaś kremu w 120 min.

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda USP III

Wyniki uzyskanych profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w metodzie z wykorzystaniem aparatu USP III, również wskazują na niepełne uwolnienie wolnego API z postaci leku (**rycina 2**). Zaobserwowano znacząco mniejsze odchylenie standardowe niż w przypadku pilotażowej metody stacjonarnej. W tej metodzie NE-CLT osiągnęła maksymalne stężenie odpowiadające średniemu uwolnieniu około 15% dawki CLT w ciągu 5 h. O połowę mniejszy wynik (średnia około 7,5%) odnotowano w przypadku zawiesiny. Komercyjna formuła MycoHydralin odnotowała podobny wynik jak w pilotażowej metodzie stacjonarnej (średnia około 5%). Między obserwowanymi profilami odnotowano istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda przepływową USP IV

Wyniki profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w czasie, uzyskane w metodzie przepływowej, zostały przedstawione na **rycynie 3**. Dane wskazują na niepełne uwolnienie wolnego API z postaci leku w badanym czasie. Zaobserwowano znacząco mniejsze odchylenie standardowe niż w przypadku pilotażowej metody stacjonarnej. W tej metodzie NE-CLT i zawiesina osiągnęły jednakowe maksymalne stężenie odpowiadające średniemu uwolnieniu około 7,5% dawki CLT w ciągu 5 h. Istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) i trzykrotnie mniejszą ilość uwolnionego leku – około 2,5% dawki, zarejestrowano w przypadku komercyjnej formuły MycoHydralin. Między obserwowanymi profilami NE-CLT i zawiesiny nie odnotowano istotnych statystycznie różnic ( $p = 0,79$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla wszystkich

formulacji w jednakowym czasie (tj. 10 min), aczkolwiek obserwowane stężenia były na bardzo niskim poziomie w przypadku kremu.

### Wyniki badania zmiany kumulowanych ilości wolnej frakcji CLT w funkcji czasu – metoda przepływowa z pompą strzykawkową

Wyniki profili zmiany stężenia wolnej frakcji leku w czasie, uzyskane w metodzie przepływowej z zastosowaniem pompy strzykawkowej, zostały przedstawione na **rycynie 4**. Dane również wskazują na niepełne uwolnienie API w badanym czasie. Zaobserwowano niewielkie odchylenie standardowe. W metodzie tej, z najmniejszą objętością medium, tj. 18 mL wewnątrz celki, i przepływie najbardziej zbliżonym do fizjologicznego (2 mL/h), NE-CLT osiągnęła wyższy od obu formułacji referencyjnych stopień wolnej frakcji CLT na poziomie 5% dawki API w ciągu 5 h. Niższe ilości uwolnionej wolnej frakcji leku zaobserwowano dla zawiesiny i kremu MycoHydralin – około 2,5% w czasie 5 h, aczkolwiek różnica okazała się być nieistotna statystycznie ( $p = 0,29$ ). Początek wzrostu stężenia wolnej frakcji CLT zaobserwowano dla wszystkich formułacji w jednakowym czasie, tj. 120 min.

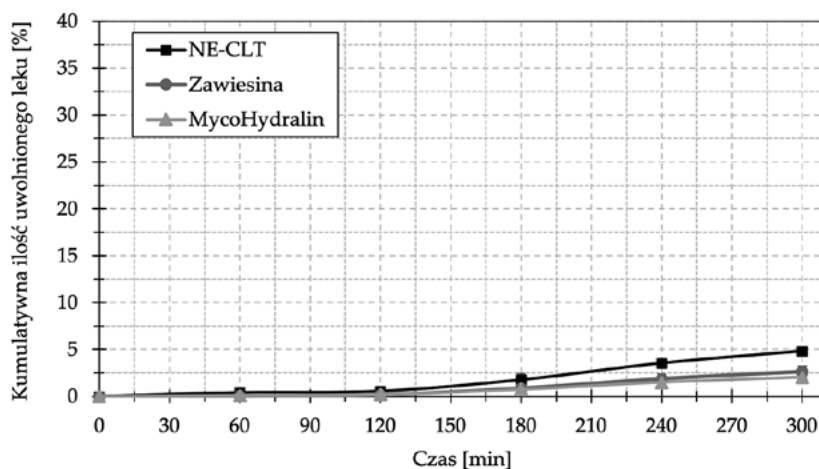
### Dyskusja

Otrzymana nanoemulsja, zawierająca *clotrimazolum* jako substancję czynną, cechuje się wielkością kropli oleju gwarantującą penetrację postaci leku przez warstwy śluzu i wydzieliny pochwo-wej pokrywających błonę śluzową, jak również wydłużony czas przebywania formułacji w miejscu podania [21–23]. Wysoka homogenność formułacji gwarantuje niewielki rozrzut wyników w badaniach z wykorzystaniem struktur dializacyjnych o ustalonych porach [24]. Zmierzona wartość potencjału z znajduje się w przedziale  $\pm 10$ –20 mV, na podstawie danych literaturowych świadczy to o krótkookresowej stabilności formułacji [25]. Wartość pH mieści się w fizjologicznym zakresie, zaś osmolalność nanoemulsji spełnia wymagania dla dopochwowych formułacji, co świadczy o niskim potencjale drażniącym błonę śluzową pochwy [21, 26].

Stosowane przez badaczy metody badania dostępności substancji czynnej z dopochwowych formułacji na bazie emulsji są nieusystematyzowane i oparte głównie na metodach farmakopealnych wykorzystujących aparaty koszyczkowy i łopatkowy [9, 20].

Dominujące metody farmakopealne znane z doustnych postaci leku mogą być uzasadnione potrzebami porównania technologii na standaryzowanej aparaturze, jednakże nie dają możliwości predykcji właściwości formułacji w warunkach fizjologicznych. Stosowana objętość medium akceptorowego jest 250–500 razy większa od objętości wydzieliny pochwo-wej. Wynika to również z faktu, że „Farmakopea Europejska” nie precyzuje w monografii *Vaginalia* badań dostępności farmaceutycznej typowych dla tej specyficznej postaci leku [27].

W pierwszej z zastosowanych metod, pilotażowej metodzie stacjonarnej, zredukowano objętość medium akceptorowego do 150-krotności objętości fizjologicznej. Wynika to z faktu konieczności zapewnienia rozpuszczalności dla substancji czynnej *clotrimazolum*. Zrezygnowano z możliwości zastosowania surfaktantów, które mogłyby zwiększyć rozpuszczalność przy jednoczesnej dalszej redukcji objętości medium, z uwagi na ryzyko uszkodzenia błony i wpły-nięcia na stabilność nanoemulsji. Zaobserwo- wano niską precyzję układu. Zwiększona liczba powtórzeń nie spowodowała poprawy precyzji. Otrzymane wyniki nie dostarczają dostatecz- nie dyskryminujących warunków oceny formu- lacji, co jest związane ze znacznymi odchylen- niami standardowymi (niską powtarzalnością wyników) generującymi relatywne odchylenie standardowe aż do 40%. Jedyna, istotna staty- stycznie, obserwowana różnica została wyka- zana dla NE-CLT i zawiesiny w stosunku do komercyjnego produktu referencyjnego. Biorąc pod uwagę rozdzielczość metody, dane pozwa- lają jedynie na szacunkową ocenę rzędu wolnej



**Rycina 4.** Wyniki zmiany wolnej frakcji CLT w zależności od czasu wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku – oznaczenie metodą przepływową z pompą strzykawkową ( $n = 3$ ).

**Rycina 4.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively – flow-through syringe method ( $n = 3$ ).

frakcji substancji czynnej. Wysoka zmienność wyników może być wynikiem stresu mechanicznego, jakiemu poddane zostały worki dializacyjne, powodując mikrouszkodzenia struktury membrany. Źródłem stresu mechanicznego jest ciśnienie osmotyczne, które powodowało napływ medium do formulacji, jak również obracające się mieszadło magnetyczne, które mogło w sytuacji losowego kontaktu z membraną wywierać nacisk.

Połączenie metody stacjonarnej i jednocześnie dalsze zredukowanie objętości do 100-krotności objętości fizjologicznej uzyskano w wyniku wykorzystania aparatu z ruchomym cylindrem, znanym jako aparat typu III według USP. Zaobserwowano zdecydowanie większą precyzję pomiarów niż w przypadku pilotażowej metody. Uzyskano istotne statystycznie różnice między badanymi formulacjami. Formuacja NE-CLT wykazała większą ilość wolnej frakcji leku uwolnionej w czasie w stosunku do zawiesiny i kremu. Jednak, w porównaniu do metody stacjonarnej z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego zaobserwowano niższe o około 1/3 wartości w przypadku NE-CLT i zawiesiny. Koresponduje to ze zmniejszeniem objętości medium akceptorowego o 1/3. Należy podkreślić, że nie bez znaczenia jest też inny mechanizm mieszania medium akceptorowego, które wywołane było ruchem posuwistym cylindra z umieszczoną wewnątrz formulacją. W metodzie tej wyeliminowano wpływ stresu mechanicznego związanego z kontaktem mieszadła magnetycznego z membraną. Powyższe czynniki nie pozostają bez wpływu na poziom wolnej frakcji API. Wynik dla formulacji MycoHydralin obserwowany był na podobnym poziomie, co wskazuje na mniej dynamiczny proces dyfuzji CLT przez membranę.

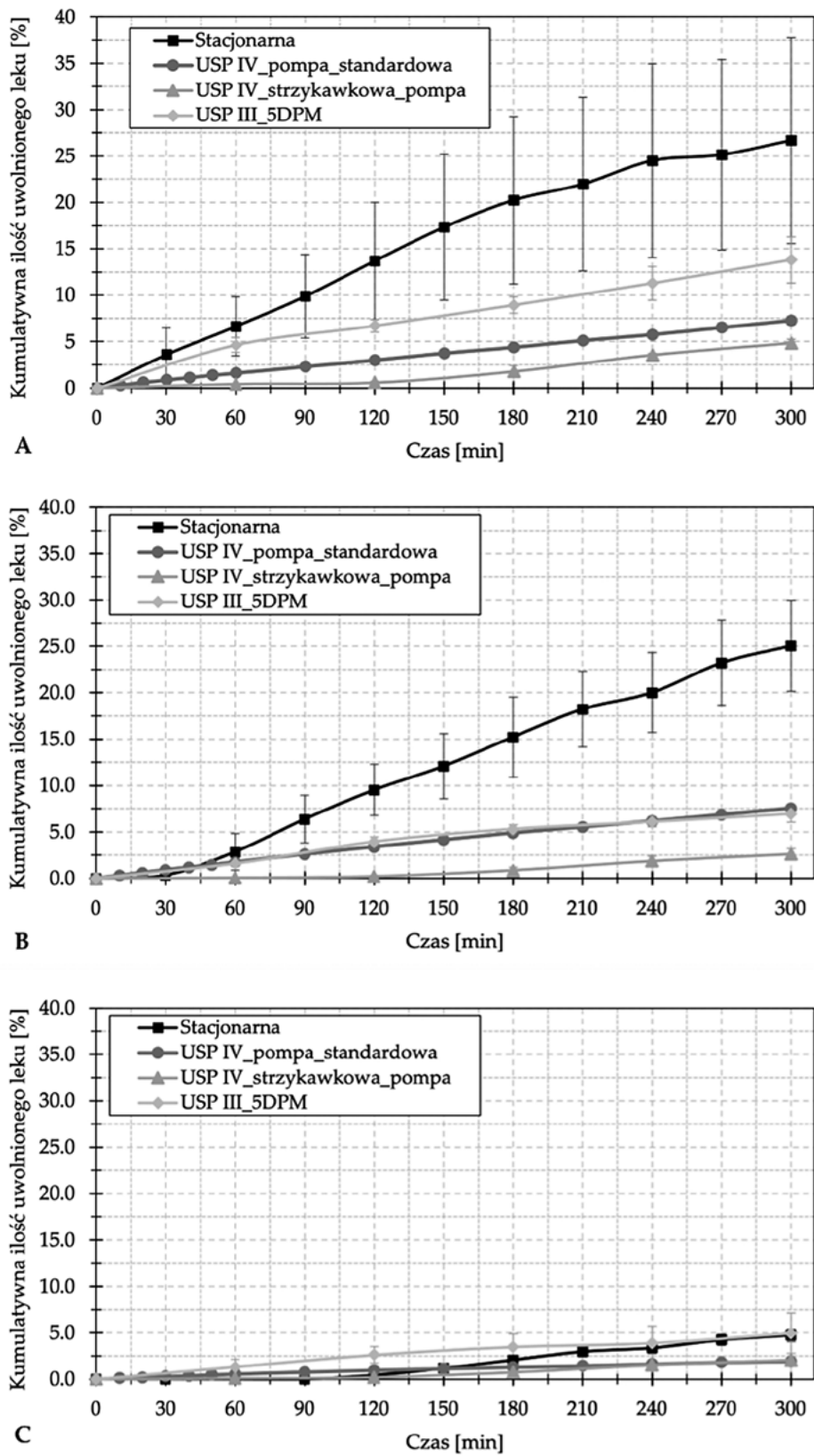
W celu zweryfikowania wpływu medium jako czynnika ograniczającego uzyskiwane stężenia przeprowadzono badanie zmiany stężenia wolnej frakcji CLT w funkcji czasu metodą przepływową. W tej metodzie sumaryczna objętość medium dla każdej próbki wynosiła 600 mL, co stanowi 300-krotność warunków fizjologicznych. Pomimo zapewniania stałego dopływu nienasyconego API medium akceptorowego, uzyskano mniejsze stężenia wolnej frakcji CLT dla wszystkich 3 analizowanych formulacji. Wartości obserwowane dla zawiesiny i NE-CLT były jednakowe i wynosiły 7,5% dawki leku w ciągu 5 h. W przypadku NE-CLT kluczowe znaczenie mogą mieć surfaktanty, które w stacjonarnej metodzie zapewniają większą rozpuszczalność API w medium akceptorowym. Surfaktanty obecne w formulacji ułatwiają dyfuzję *clotrimazolum* do

buforu fosforanowego. W metodzie przepływowej surfaktanty te są stale wymywane przez napływające świeże medium akceptorowe, co spowalnia proces dyfuzji substancji czynnej przez membranę i ogranicza jej rozpuszczalność. Wskutek powyższych czynników, obserwowana kumulatywna ilość wolnej frakcji *clotrimazolum* obserwowana dla NE-CLT i zawiesiny w metodzie przepływowej z wykorzystaniem USP IV jest podobna oraz zależna od charakteru substancji i właściwości membrany wpływających na proces dyfuzji. Dla zawiesiny zaobserwowano jednakowe profile uwalniania jak w przypadku metody USP III, pomimo 3-krotnie większej sumarycznej objętości medium. Wskazuje to na fakt, że długość czasu kontaktu błony półprzepuszczalnej z medium ma kluczowe znaczenie dla procesu przechodzenia wolnej frakcji CLT do medium akceptorowego.

Mając na uwadze powyższe wyniki zaprojektowano eksperyment uwzględniający cechy metod stacjonarnych i przepływowych, tj. długi kontakt medium akceptorowego z błoną, powolny przepływ medium, niewielka objętość symulująca warunki fizjologiczne. W tym celu pompę tłokową w metodzie przepływowej zastąpiono pompą strzykawkową, która jest w stanie zasymulować przepływ na poziomie 2 mL/h. Wartość przepływu została ustalona na takim poziomie, aby zapewnić możliwość poboru próbek na wyjściu z celki pomiarowej, ponieważ jej konstrukcja uniemożliwia pobór bez otwierania obudowy. Sumaryczna objętość medium była 14-krotnie większa od fizjologicznej, co znalazło znaczące odzwierciedlenie w obserwowanej ilości wolnej frakcji CLT, która maksymalnie osiągnęła 5% dawki w ciągu 5 h w przypadku NE-CLT. Stanowi to 2-krotność ilości obserwowanych w przypadku zawiesiny i kremu. Potwierdza to pozytywny wpływ formulacji opartych na nanoemulsji, która w małych objętościach jest w stanie uzyskać wyższe stężenie od zawiesiny. Jednak, analiza statystyczna wskazuje, że obserwowane różnice nie mają znaczenia statystycznego. W tym wypadku należy wydłużyć czas trwania eksperymentu lub zwiększyć częstotliwość próbkowania (kosztem większego przepływu), gdyż w początkowym etapie nie obserwowano znacznych różnic pomiędzy stężeniami. Nie bez znaczenia w tej metodzie jest również długość odcinka przewodu doprowadzającego medium akceptorowe do kolektora frakcji, która powinna być jak najkrótsza, aby nie obserwować zaniżonych wyników wynikających z opóźnienia medium zatrzymanego w przewodzie.

Dla lepszego porównania metod, na **rycynie 5** przedstawiono porównanie uzyskanej ilości wolnej frakcji CLT w zależności od zastosowanej





**Rycina 5.** Wyniki zmiany w czasie wolnej frakcji CLT w zależności od zastosowanej metody wyrażone jako kumulatywny procent dawki leku. A – NE-CLT, B – zawiesina, C – krem MycoHydralin.

**Figure 5.** Results of the amount of free API released over time, cumulatively depending of the used method. A – NE-CLT, B – suspension, C – MycoHydralin cream.

metody dla każdej z badanych formuacji. Dla NE-CLT różnice pomiędzy zastosowanymi metodami są wyraźnie widoczne i istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Świadczy to o fakcie, że dobór metody badawczej w przypadku nanoemulsji ma kluczowe znaczenie. Mniej wyraźne różnice zaobserwowano dla zawiesiny, gdzie wyniki dla metody stacjonarnej USP III pokrywały się z metodą przepływową USP IV, jednak analiza wszystkich profili potwierdza istotne statystyczne różnice ( $p < 0,05$ ). Dla kremu MycoHydralin obserwowano najmniejsze różnice, jednak wciąż istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) pomiędzy obserwowanymi profilami, szczególnie w przypadku obu metod przepływowych. Ważnym kryterium limitującym możliwości analizy kremu jest fakt zastosowania błony półprzepuszczalnej, jak również jego konsystencji, które ograniczają możliwość równomiernego wnikiwania medium akceptorowego w całej objętości próbki. Niemniej, zastosowanie jednakowej metody badawczej umożliwia porównanie tych formuacji.

### Wnioski

Zastosowana metoda badania zmiany stężenia wolnej frakcji leku w medium akceptorowym w funkcji czasu ma znaczący wpływ na uzyskane profile. W metodach stacjonarnych, dla nanoemulsji obserwowano wyższe stężenia wolnego leku niż w przypadku metod przepływowych, dodatkowo pomiary wykonane z wykorzystaniem aparatu o posuwistym ruchu cylindra (USP III) cechowały się znacznie wyższą precyzją pomiarową w stosunku do metody pilotażowej. Metody przepływowe w układzie otwartym zapewniły mniejszy stopień uwolnienia wolnej frakcji CLT, co wskazuje na istotę czasu kontaktu medium z badaną formuacją. Opracowana metoda przepływowa z wykorzystaniem pompy strzykawkowej zapewniła warunki najbliższe do fizjologicznych, jednak z uwagi na niskie stężenia leku dalsza analiza efektów jest niemożliwa. Najbardziej dyskryminujące warunki zapewniła metoda stacjonarna z wykorzystaniem aparatu typu USP III (Bio-Dis). Ponadto, metoda jest możliwa do zastosowania w przemyśle z uwagi na wykorzystanie standaryzowanej aparatury.

### Piśmiennictwo

- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, et al. Why Consider Vaginal Drug Administration? *Fertil Steril*. 2004; 82: 1–12. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.01.025.
- Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J. New Strategies for Local Treatment of Vaginal Infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 92: 105–122. doi:10.1016/j.addr.2015.06.008.
- De Araújo Pereira RR, Bruschi ML. Vaginal Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012; 38: 643–652. doi:10.3109/03639045.2011.623355.
- Major I, McConville C. Vaginal Drug Delivery for the Localised Treatment of Cervical Cancer. *Drug Deliv Transl Res*. 2017; 7: 817–828. doi:10.1007/s13346-017-0395-2.
- Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, et al. Studies and Methodologies on Vaginal Drug Permeation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 92: 14–26. doi:10.1016/j.addr.2015.02.003.
- Srikrishna S, Cardozo L. The Vagina as a Route for Drug Delivery: A Review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2013; 24: 537–543. doi:10.1007/s00192-012-2009-3.
- Valea FA. Reproductive Anatomy Gross and Microscopic, Clinical Correlations. W: *Comprehensive Gynecology*; Lobo RA, Gershenson DM, Lentz GM, Valea FA, Eds.; Elsevier: Philadelphia. 2017; pp. 48–77. ISBN 978-0-323-32287-4.
- D'Amati G, di Gioia CR, Proietti Pannunzi L, et al. Functional Anatomy of the Human Vagina. *J Endocrinol Invest*. 2003; 26: 92–96.
- Smoleński M, Karolewicz B, Gólkowska AM, et al. Emulsion-Based Multicompartment Vaginal Drug Carriers: From Nanoemulsions to Nanoemulgels. *Int J Mol Sci*. 2021; 22. doi:10.3390/ijms22126455.
- Tietz K, Klein S. In Vitro Methods for Evaluating Drug Release of Vaginal Ring Formulations: A Critical Review. *Pharmaceutics* 2019; 11. doi:10.3390/pharmaceutics11100538.
- Boyd P, Variano B, Spence P, et al. In Vitro Release Testing Methods for Drug-Releasing Vaginal Rings. *Journal of Controlled Release* 2019; 313: 54–69. doi:10.1016/j.jconrel.2019.10.015.
- Jug M, Hafner A, Lovrić J, et al. An Overview of in Vitro Dissolution/Release Methods for Novel Mucosal Drug Delivery Systems. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 147: 350–366. doi:10.1016/j.jpba.2017.06.072.
- Jug M, Hafner A, Lovrić J, et al. In Vitro Dissolution/Release Methods for Mucosal Delivery Systems. *ADMET DMPK*. 2017; 5: 173–182. doi:10.5599/admet.5.3.425.
- Kale V, Trivedi R, Muley P. Proposed Design of a Dissolution Apparatus for Vaginal Formulations Containing Probiotics. *Dissolut Technol*. 2008; 15: 27–29. doi:10.14227/DT150208P27.
- Setnikar I, Fantelli S. Liquefaction Time of Rectal Suppositories. *J Pharm Sci*. 1962; 51: 566–571. doi:10.1002/jps.2600510616.
- Kaur A, Saxena Y, Bansal R, et al. Intravaginal Delivery of Polyphenon 60 and Curcumin Nanoemulsion Gel. *AAPS PharmSciTech*. 2017; 18: 2188–2202. doi:10.1208/s12249-016-0652-6.
- Atinderpal K, Kapoor N, Gupta S, et al. Development and Characterization of Green Tea Catechins and Ciprofloxacin-Loaded Nanoemulsion for Intravaginal Delivery to Treat Urinary Tract Infection. *Indian J Pharm Sci*. 2018; 80: 442–452. doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000377.
- Maholepsza-Jarmołowska K, Smoleński M. Pharmaceutical Composition in the Form of Vegetable Oil-Based Nanoemulsion, Multiphase Composition and Method of Preparation of These Compositions 2022, PCT/PL2022/000039.
- <711> Dissolution Test USP 28, 2nd Supplement, Official 1 August 2005; 2.9.3 (01/2016:20903). In *Farmakopea Polska XII*; 2020.
- Neves J. das, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, et al. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. W: *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*; Khutoryanskiy V V, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, United Kingdom. 2014; 9781119941: 99–132. ISBN 9781118794203.
- Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, et al. Rapid Transport of Large Polymeric Nanoparticles in Fresh Undiluted Human Mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104: 1482–1487. doi:10.1073/pnas.0608611104.
- Wang Y-Y, Lai SK, Suk JS, et al. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles That “Slip” through the Human Mucus Barrier. *Angewandte Chemie International Edition* 2008; 47: 9726–9729. doi:10.1002/anie.200803526.
- Danaei M, Dehghankhold M, Atefi S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018; 10: 1–17. doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- Bhattacharjee S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* 2016; 235: 337–351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- WHO/UNFPA/FHI *Advisory Note Use and Procurement of Additional Lubricants for Male and Female Condoms: WHO/UNFPA/FHI360 Advisory Note*; 2011.
- Ph. Eur. 10.0, 1164 (01/2008)*.

#### IV. Oświadczenia współautorów

Wrocław, 14.06.2023 r.  
*miejsowość, data*

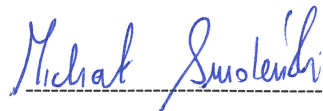
mgr farm. Michał Smoleński  
*tytuł, imię i nazwisko*

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
*miejsce zatrudnienia*

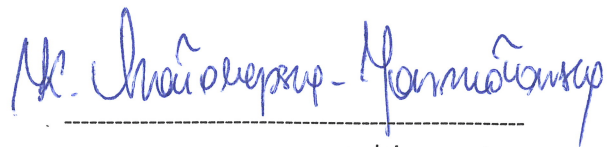
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Smoleński M, Karolewicz B, Gołkowska AM, Nartowski KP, Małolepsza-Jarmołowska K. Emulsion-based multicompartement vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 6455. doi:10.3390/ijms22126455**  
*(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)*

mój udział polegał na współudziale w opracowywaniu koncepcji artykułu, współtworzeniu i edytowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego ostatecznej wersji, zarządzaniu projektem oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.



*podpis współautora*



*podpis promotora*

Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

mgr farm. Michał Smoleński  
tytuł, imię i nazwisko

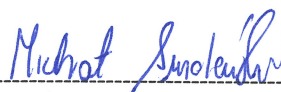
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

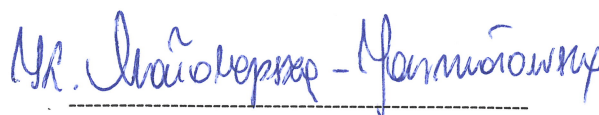
Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M, Muschert S, Haznar-Garbacz D, Małolepsza-Jarmołowska K. Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies. Pharmaceutics. 2023; 15(5): 1437. doi: 10.3390/pharmaceutics15051437**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w opracowywaniu koncepcji badań, tworzeniu pierwotnej wersji manuskryptu, współudziale korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, współudziale w opracowaniu metodologii i jej walidacji, wykonaniu zaplanowanych eksperymentów, gromadzeniu i analizowaniu danych eksperymentalnych, zarządzaniu projektem oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.



-----  
podpis współautora



-----  
podpis promotora

Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

mgr farm. Michał Smoleński  
tytuł, imię i nazwisko

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M**, Haznar-Garbacz D, Florin-Muschert S, Małolepsza-Jarmołowska K. *Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego*. Farmacja Polska 2022; 78(12): 675–684. doi: 10.32383/farmpol/165925

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w opracowywaniu koncepcji badań, tworzeniu pierwotnej wersji manuskryptu, współudziale korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, współudziale w opracowaniu metodologii i jej walidacji, wykonaniu zaplanowanych eksperymentów, gromadzeniu i analizowaniu danych eksperymentalnych, zarządzaniu projektem oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

Michał Smoleński

-----  
podpis współautora

Mr. Małolepsza-Jarmołowska

-----  
podpis promotora

Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

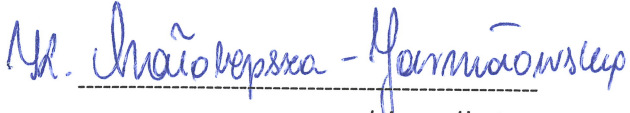
dr hab. Katarzyna Małolepsza-Jaromołowska  
tytuł, imię i nazwisko

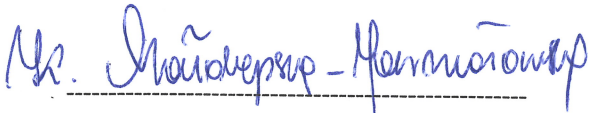
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Smoleński M, Karolewicz B, Gołkowska AM, Nartowski KP, Małolepsza-Jaromołowska K. Emulsion-based multicompartement vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels.** International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 6455. doi:10.3390/ijms22126455  
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w opracowywaniu koncepcji artykułu, współtworzeniu i edytowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego ostatecznej wersji, zarządzaniu projektem oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

  
-----  
podpis współautora

  
-----  
podpis promotora



Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

dr hab. Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska  
tytuł, imię i nazwisko

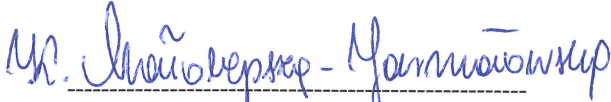
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

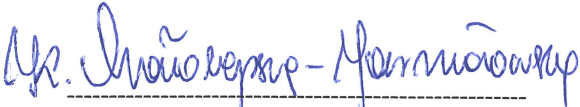
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M, Muschert S, Haznar-Garbacz D, Małolepsza-Jarmołowska K. Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies. Pharmaceutics. 2023; 15(5): 1437. doi: 10.3390/pharmaceutics15051437**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w opracowywaniu koncepcji badań, korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów (część technologiczna), współudziale w opracowaniu metodologii oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

  
-----  
podpis współautora

  
-----  
podpis promotora



Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

dr hab. Katarzyna Małolepsza-Jaromłowska  
tytuł, imię i nazwisko

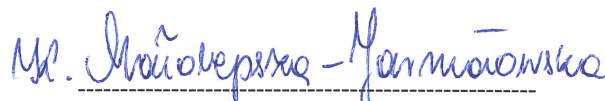
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

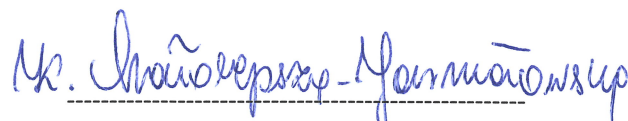
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M, Haznar-Garbacz D, Florin-Muschert S, Małolepsza-Jaromłowska K. Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego.** Farmacja Polska 2022; 78(12): 675–684. doi: 10.32383/farmpol/165925

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów, współudziale w opracowaniu metodologii (część technologiczna) oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

  
-----  
podpis współautora

  
-----  
podpis promotora

Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

dr n. farm. Dorota Haznar-Garbacz  
tytuł, imię i nazwisko

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

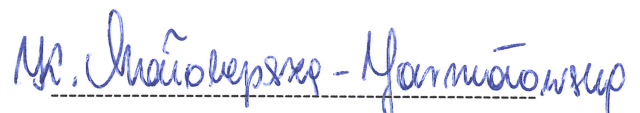
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M**, Muschert S, Haznar-Garbacz D, Małolepsza-Jarmołowska K. *Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies*. *Pharmaceutics*. 2023; 15(5): 1437. doi: 10.3390/pharmaceutics15051437

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w tworzeniu, korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów, współudziale w opracowaniu metodologii (badania uwalniania) i jej walidacji.

  
-----  
podpis współautora

  
-----  
podpis promotora

Wrocław, 14.06.2023 r.  
miejsowość, data

dr n. farm. Dorota Haznar-Garbacz  
tytuł, imię i nazwisko

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Smoleński M**, Haznar-Garbacz D, Florin-Muschert S, Małolepsza-Jarmołowska K. *Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego*. Farmacja Polska 2022; 78(12): 675–684. doi: 10.32383/farmpol/165925

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w tworzeniu, korekcie edytorskiej i merytorycznej ostatecznej wersji manuskryptu, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów, współudziale w opracowaniu metodologii (badania uwalniania) i jej walidacji.

*Dorota Haznar-Garbacz*

-----  
podpis współautora

*Mk. Małolepsza-Jarmołowska*

-----  
podpis promotora

Lille, 06.05.2023 r.  
miejsowość, data  
place, date

Dr Susanne Florin-Muschert, PhD  
tytuł, imię i nazwisko  
title, name and surname

Université de Lille,  
Inserm, CHU Lille, U1008,  
F-59000 Lille, France  
miejsce zatrudnienia  
place of employment

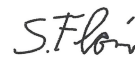
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA CO-AUTHOR'S STATEMENT

Oświadczam, że w pracy / I hereby declare that in the publication: **Smoleński M**, Muschert S, Haznar-Garbacz D, Małolepsza-Jarmołowska K. *Nanoemulsion Loaded with Clotrimazole Based on Rapeseed Oil for Potential Vaginal Application—Development, Initial Assessment, and Pilot Release Studies*. *Pharmaceutics*. 2023; 15(5): 1437. doi: 10.3390/pharmaceutics15051437

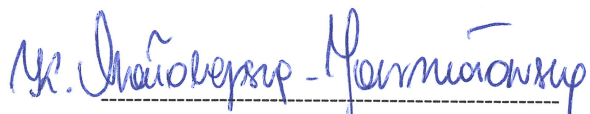
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)  
(authors, year, title, journal name, volume, pages)

mój udział polegał na współudziale w tworzeniu ostatecznej wersji manuskryptu, korekcie edytorskiej i merytorycznej, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów (badania uwalniania), współudziale w opracowaniu metodologii (badania uwalniania) oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

My involvement included participation in the drafting of the final manuscript, review and editing of the final version of manuscript, supervision of the planned experiments (release studies), participation in the development of the methodology (release studies), and funding acquisition.



-----  
podpis współautora / Co-author's signature



-----  
podpis promotora / Promoter signature

Lille, 06.05.2023 r.  
miejsowość, data  
place, date

Dr Susanne Florin-Muschert, PhD  
tytuł, imię i nazwisko  
title, name and surname

Université de Lille,  
Inserm, CHU Lille, U1008,  
F-59000 Lille, France  
miejsce zatrudnienia  
place of employment

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA CO-AUTHOR'S STATEMENT

Oświadczam, że w pracy / I hereby declare that in the publication: **Smoleński M**, Haznar-Garbacz D, Florin-Muschert S, Małolepsza-Jarmołowska K. *Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolum z wielofazowych półstałych postaci leku dopochwowego*. Farmacja Polska 2022; 78(12): 675–684. doi: 10.32383/farmpol/165925

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)  
(authors, year, title, journal name, volume, pages)

mój udział polegał na współudziale w orękcje edytorskiej i merytorycznej, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów (badania uwalniania), współudziale w opracowaniu metodologii (badania uwalniania) oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

My involvement included participation in the review and editing of the final version of manuscript, supervision of the planned experiments (release studies), participation in the development of the methodology (release studies), and funding acquisition.

S. Florin

-----  
podpis współautora / Co-author's signature

Mr. Małolepsza-Jarmołowska

-----  
podpis promotora / Promoter signature

Wrocław, 24.05.2023 r.  
*miejsowość, data*

dr hab. Bożena Karolewicz, prof. UMW  
*tytuł, imię i nazwisko*

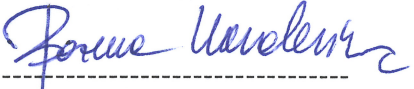
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
*miejsce zatrudnienia*

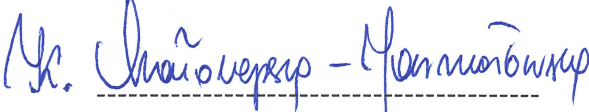
## OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Smoleński M**, Karolewicz B, Gołkowska AM, Nartowski KP, Małolepsza-Jarmołowska K. *Emulsion-based multicompartment vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels*. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 6455. doi:10.3390/ijms22126455

*(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)*

mój udział polegał na współdziale w opracowywaniu koncepcji artykułu, współtworzeniu i edytowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego ostatecznej formy, pozyskaniu źródeł finansowania opłaty publikacyjnej i współzarządzaniu projektem.

  
-----  
*podpis współautora*

  
-----  
*podpis promotora*



Wrocław, 24.05.2023 r.  
miejsowość, data

mgr farm. Anna M. Gołkowska  
tytuł, imię i nazwisko

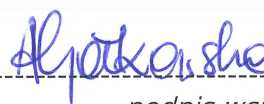
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
miejsce zatrudnienia

## OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

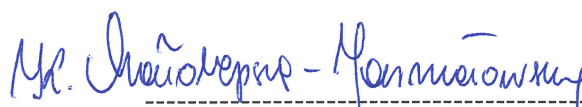
Oświadczam, że w pracy **Smoleński M**, Karolewicz B, Gołkowska AM, Nartowski KP, Małolepsza-Jarmołowska K. *Emulsion-based multicompartement vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels*. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 6455. doi:10.3390/ijms22126455

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na współudziale w korekcie edytorskiej manuskryptu.



-----  
podpis współautora



-----  
podpis promotora



V. Wykaz publikacji potwierdzony przez bibliotekę

Michał Smoleński

## 1. Publikacje w czasopismach naukowych

### 1.1 Publikacje w czasopiśmie z IF

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1	Karłowicz-Bodalska Katarzyna, Han Stanisław, Freier Julia, <b>Smoleński Michał</b> , Bodalska Agnieszka: Curcuma longa as medicinal herb in the treatment of diabetic complications, Acta Poloniae Pharmaceutica, 2017, vol. 74, nr 2, s. 605-610	0,531	15
2	<b>Smoleński Michał</b> , Karolewicz Bożena, Gołkowska Anna M., Nartowski Karol P., Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Emulsion-based multicompartiment vaginal drug carriers: from nanoemulsions to nanoemulgels, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 12, art.6455 [39 s.], DOI:10.3390/ijms22126455	6,208	140
3	<b>Smoleński Michał</b> , Muschert Susanne, Haznar-Garbacz Dorota, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Nanoemulsion loaded with clotrimazole based on rapeseed oil for potential vaginal application - development, initial assessment, and pilot release studies, Pharmaceutics, 2023, vol. 15, nr 5, art.1437 [24 s.], DOI:10.3390/pharmaceutics15051437	6,525*	100
	Podsumowanie	13,264	255

\*IF 2021

### 1.2 Publikacje w czasopiśmie bez IF

Lp.	Opis bibliograficzny	Punkty
1	Karłowicz-Bodalska Katarzyna, Han Stanisław, Bodalska Agnieszka, Freier Julia, <b>Smoleński Michał</b> : Przeciwwzpalne właściwości wybranych roślin zawierających związki irydoidowe, Postępy Fitoterapii, 2017, vol. 18, nr 3, s. 229-234, DOI:10.25121/PF.2017.18.3.229	7
2	<b>Smoleński Michał</b> , Haznar-Garbacz Dorota, Florin-Muschert Susanne, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Opracowanie metody badania dostępności farmaceutycznej clotrimazolom z wielofazowych powstałych postaci leku dopochwowego, Farmacja Polska, 2022, vol. 78, nr 12, s. 675-684, DOI:10.32383/farmpol/165925	70
3	<b>Smoleński Michał</b> , Haznar-Garbacz Dorota: Ocena możliwości podawania wziewnych preparatów budezonidu za pomocą inhalatorów siateczkowych - badania wstępne, Terapia, 2022, vol. 30, nr 5, s. 41-43, [Publikacja w czasopiśmie spoza listy MNiSW]	5
	Podsumowanie	82

## 3. Abstrakty

Lp.	Opis bibliograficzny
1	Karłowicz-Bodalska Katarzyna, Bodalska Agnieszka, Freier Julia, <b>Smoleński Michał</b> , Han Stanisław: Natural substances in diabetes complications treatment, W: 2 <sup>nd</sup> International Young Scientists Symposium "Plants in pharmacy and nutrition". Wrocław, 15-17 September 2016. Book of abstracts, Wrocław 2016, Wrocław Medical University, 100 poz.PS-44, ISBN 978-83-7055-591-7

2	<b>Smoleński Michał</b> , Pytel Paulina, Rakowska Żaneta, Karłowicz-Bodalska Katarzyna: Winorośl właściwa, masło shea - nowe spojrzenie na znane surowce, W: II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego w farmacji i medycynie". Wrocław, 20 maja 2016 r. Książka abstraktów 2016, s. 20
3	<b>Smoleński Michał</b> , Rakowska Żaneta, Fereir Julia, Karłowicz-Bodalska Katarzyna: Metody analityczne stosowane w oznaczaniu żelaza w doustnych formułacjach liposomowych, W: II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 3 kwietnia 2017 r. Książka abstraktów 2017, 44 poz.P28
4	<b>Smoleński Michał</b> , Freier Julia, Bodalska Agnieszka, Karłowicz-Bodalska Katarzyna: Cornus mas fruit as natural antiinflammatory drug, W: International Students' Conference "Medicinal plants - history and contemporaneity". Hradec Kralove, Kuks, Czech Republic, 14th October 2017. The book of abstracts 2017, s. 13
5	<b>Smoleński Michał</b> , Rakowska Żaneta, Karłowicz-Bodalska Katarzyna: Zastosowanie metod analitycznych w ocenie heterogenności strukturalnej ścian komórkowych roślin, W: III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 9 kwietnia 2018 r. Książka abstraktów 2018, s. 12, [[Dostęp 12.04.2018]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%CC%85%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%CC%85%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf</a> ]
6	<b>Smoleński Michał</b> , Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Hydrogels as potential forms for Central Nervous System drug delivery, W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 159 poz.P105, ISBN 978-83-65932-64-8
7	Szyposz Aneta, <b>Smoleński Michał</b> , Haznar-Garbacz Dorota, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Badania żeli farmaceutycznych metodami przeznaczonymi do oceny półstałych postaci leku, W: IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 12 kwietnia 2019 r. Książka abstraktów 2019, [11], [[Dostęp 18.04.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf</a> ]
8	Bodalska Agnieszka, Kowalczyk Adam, <b>Smoleński Michał</b> , Fecka Izabela: Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią mas w analizie związków polifenolowych, W: IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 12 kwietnia 2019 r. Książka abstraktów 2019, [15], [[Dostęp 18.04.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf</a> ]
9	<b>Smoleński Michał</b> , Szyposz Aneta, Bodalska Agnieszka, Haznar-Garbacz Dorota, Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Zastosowanie metod analitycznych w badaniu dopochwowych postaci leku, W: IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 12 kwietnia 2019 r. Książka abstraktów 2019, [39], [[Dostęp 18.04.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksia%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf</a> ]
10	<b>Smoleński Michał</b> , Małolepsza-Jarmołowska Katarzyna: Nanoemulsions in the treatment of the vaginal infections, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 216-217, ISBN 978-83-66489-37-0
11	<b>Smoleński Michał</b> : Mikroemulsje w leczeniu stanów zapalnych pochwy - aktualny stan wiedzy, W: I Ogólnopolska Doktorancka Konferencja Interdyscyplinarna. Wrocław, 19.09.2020 r. Księga abstraktów, Wrocław 2020, 27 poz.22

12	Małolepsza-Jarołowska Katarzyna, <b>Smoleński Michał</b> : Wielokompartmentowe dopochwowe postaci leku na bazie układów emulsyjnych, W: XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Online, 22-24 września 2021. Streszczenia wykładów i prezentacji posterowych, Lublin 2021, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, s. 45, ISBN 978-83-64968-24-2
----	---

**Impact factor:** 13,264

**Punktacja ministerialna:** 337,0

7.06.2023  
Piotr Ornowicz

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Biblioteka Główna  
DZIAŁ BIBLIOGRAFII I BIBLIOMETRII  
ul. Marcinkowskiego 2-6, 50-368 Wrocław  
tel. 71 784 19 25, faks 71 784 19 31

## VI. Dodatkowe osiągnięcia

### **Polskie zgłoszenia patentowe**

1. Małolepsza-Jarmołowska K., Smoleński M. Kompozycja farmaceutyczna na bazie oleju roślinnego i trójblokowego kopolimeru, kompozycja wielofazowa w postaci emulżelu oraz sposób wytwarzania kompozycji, **P.438500**, 16.07.2021.
2. Małolepsza-Jarmołowska K., Smoleński M. Kompozycja w postaci nanoemulsji na bazie oleju roślinnego, kompozycja wielofazowa oraz sposób wytwarzania tych kompozycji, **P.438501**, 16.07.2021.

### **Międzynarodowe zgłoszenia patentowe**

1. Małolepsza-Jarmołowska K., Smoleński M. Pharmaceutical composition in the form of vegetable oil-based nanoemulsion, multiphase composition and method of preparation of these compositions, PCT/PL2022/000039, 15.07.2022.
2. Małolepsza-Jarmołowska K., Smoleński M. Pharmaceutical composition based on a vegetable oil and a triblock copolymer, a multiphase composition in the form of an emulgel and a method for preparing the composition, PCT/PL2022/000040, 15.07.2022.

### **Staże zagraniczne**

1. *Intravaginal Drug Dissolution - designing a uniform testing strategy to characterize vaginal dosage forms*, INSERM U1008 - Advanced Drug Delivery Systems, College of Pharmacy, University of Lille, France, 03.04.2022–01.07.2022.

### **Granty i nagrody**

1. Grant dla młodych naukowców – edycja 2020. Projekt pt. „Badania nad wielofazową postacią leku dopochwowego”. STM. D140.20.067.
2. Nagroda Rektora za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej w roku 2021 – „Nagroda zespołowa I stopnia za publikację w czasopiśmie umieszczonym w *Journal Citation Reports*” przyznana w 2022 r.
3. Grant wyjazdowy „Moblilex” przyznany przez Univeristy of Lille, Francja, 03.04.2022–01.07.2022.

4. Stypendium projakościowe dla najlepszych doktorantów oraz Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2021/2022.

### **Popularyzacja nauki**

Udział w Dolnośląskim Festiwalu Nauki edycje 2017, 2019, 2020, 2021, 2022.

### **Ukończone kursy dodatkowe**

1. Szkolenie chromatograficzne – Design of Experiments (DoE), Analytical Quality by Design (AQbD) oraz oprogramowanie LabSolutions Method Development, Wrocław, 08.05.2023.
2. Rozwój metod analitycznych dla produktu gotowego, Warszawa, 27.04.2023.
3. Liczne szkolenia i kursy doskonalące dla farmaceutów.

### **Członkostwo w stowarzyszeniach naukowych**

1. PTFarm – Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne – 2018 – obecnie.
2. APGI – *Association de Pharmacie Galénique Industrielle (International Society for Drug Delivery Sciences and Technology)* – 2022 – obecnie.
3. AAPS – *American Association of Pharmaceutical Scientists* – 2023 – obecnie.