



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII POSTACI LEKU I BIOFARMACJI

**Projektowanie mikroemulsyjnych postaci leku  
w oparciu o techniki eksploracji danych**

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr farm. Jakub Szlęk

Promotor

prof. dr hab. Renata Jachowicz

Kierownik Katedry i Zakładu Technologii Postaci Leku i  
Biofarmacji

Promotor pomocniczy

dr hab. Aleksander Mendyk

Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji

Kraków 2017



---

*Zawsze słuchaj ekspertów. Powiedz Ci, co  
jest niemożliwe i dlaczego. A potem po  
prostu zrób to.*

*Robert A. Heinlein*



---

*Szczególne podziękowania kieruję do moich promotorów Pani Prof. dr hab. Renaty Jachowicz i Pana dr hab. Aleksandra Mendyka. Dziękuję za motywację, opiekę naukową, poświęcony czas i wszelkie wskazówki udzielone w trakcie przygotowania rozprawy.*

*Pracownikom z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Zakładu Fizyki Kryształów Uniwersytetu Śląskiego oraz Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w szczególności: dr Krzysztofowi Szczepanowiczowi, prof. dr hab. Ewie Talik, dr Adamowi Buckiemu serdecznie dziękuję za życzliwość i owocną współpracę*

*Koleżankom i kolegom z Katedry Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM jestem wdzięczny za wszelką pomoc oraz za miłą atmosferę w pracy.*



## SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	9
SUMMARY.....	11
WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	13
<b>I. WSTĘP.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Charakterystyka układów mikroemulsyjnych jako nośnika substancji leczniczych.....</b>	<b>17</b>
1.1. Skład układów mikroemulsyjnych.....	19
1.2. Struktura układów mikroemulsyjnych.....	27
1.3. Stabilność układów mikroemulsyjnych.....	28
1.4. Mikroemulsyjne postaci leku, metody oceny ich jakości.....	32
<b>2. Drażenie danych - „data-mining” .....</b>	<b>41</b>
2.1. Techniki drażenia danych, drzewa decyzyjne i sztuczne sieci neuronowe.....	44
2.2. Drażenie danych w technologii postaci leku.....	47
<b>II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY.....</b>	<b>55</b>
<b>III. METODYKA BADAŃ.....</b>	<b>57</b>
<b>1.Substancje, materiały i aparatura, oprogramowanie.....</b>	<b>57</b>
1.1. Substancje.....	57
1.2. Materiały.....	57
1.3. Aparatura.....	58
1.4. Oprogramowanie.....	59
<b>2. Charakterystyka oprogramowania użytego w procesie eksploracji danych.....</b>	<b>61</b>
<b>3. Eksploracja danych.....</b>	<b>65</b>
3.1. Przygotowanie maszyny wnioskującej.....	65
3.2. Napisane oprogramowanie do obsługi systemu wspomaganie decyzji.....	76
<b>4. Weryfikacja systemu wspomaganie decyzji w praktyce.....</b>	<b>79</b>
4.1. Ograniczanie przestrzeni eksperymentalnej.....	79
4.2. Sporządzanie mikroemulsji.....	81
4.3. Sporządzanie mikroemulsji z ibuprofenem.....	81
4.4. Badanie właściwości fizykochemicznych mikroemulsji.....	81
4.4.1. Pomiar współczynnika refrakcji.....	82
4.4.2. Pomiar napięcia powierzchniowego.....	82
4.4.3. Pomiar wielkości cząstek fazy rozproszonej.....	82
4.4.4. Pomiar pH.....	82
4.4.5. Pomiar gęstości.....	83

4.4.6. Pomiar lepkości dynamicznej.....	83
4.4.7. Określenie typu mikroemulsji.....	83
4.4.8. Pomiar stopnia zmętnienia.....	83
<b>4.5. Badanie stabilności.....</b>	<b>84</b>
<b>4.6. Oznaczanie zawartości ibuprofenu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....</b>	<b>86</b>
<b>IV. WYNIKI.....</b>	<b>89</b>
<b>1. Ocena przydatności narzędzi eksploracji danych do przewidywania powstawania mikroemulsji.</b> .....	<b>89</b>
<b>2. Charakterystyka opracowanej aplikacji komputerowej ME_DSS do obsługi systemu</b> <b>wspomagania decyzji.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Zastosowanie programu ME_DSS do sporządzania mikroemulsji.....</b>	<b>109</b>
<b>V. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW.....</b>	<b>145</b>
<b>VI. WNIOSKI.....</b>	<b>153</b>
<b>VII. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>155</b>
<b>VIII. SPIS TABEL I RYCIN.....</b>	<b>173</b>
<b>PUBLIKACJE WŁASNE.....</b>	<b>179</b>



## Streszczenie

Założenia badawcze pracy dotyczyły oceny możliwości zastosowania technik eksploracji danych w formułowaniu mikroemulsyjnych postaci leku. Obejmowały trzy główne etapy: eksplorację danych i utworzenie systemu wspomaganie decyzji, napisanie kodu aplikacji komputerowej oraz walidację systemu w praktyce.

Badania zrealizowano z wykorzystaniem metod obliczeniowych i laboratoryjnych. W ramach części obliczeniowej utworzono bazę danych zawierającą liczbową reprezentację składu ilościowego i jakościowego mikroemulsji, przeprowadzono modelowanie heurystyczne, opracowano system wspomaganie decyzji, a także napisano kod programu ME\_DSS do jego obsługi. Natomiast w oparciu o analizę właściwości fizykochemicznych i badania stabilności sporządzonych mikroemulsji, w ramach części laboratoryjnej, oceniono efektywność predykcji ME\_DSS. W założeniach uwzględniono opracowanie składu mikroemulsji do podania na skórę zawierającej ibuprofen jako modelową substancję leczniczą trudno rozpuszczalną w wodzie.

Na podstawie piśmiennictwa utworzono zbiór danych zawierający liczbową reprezentację składu ilościowego i jakościowego mikroemulsji, który zawierał około 305 000 rekordów. Każdy z nich zawierał informacje dotyczące procentowej zawartości składników mikroemulsji oraz ich parametry fizykochemiczne w tym liczbę HLB, gęstość fazy olejowej, siłę jonową fazy wodnej, oraz ponad 400 deskryptorów molekularnych. Na podstawie analizy wrażliwości zredukowano ilość zmiennych niezależnych do siedemnastu. Tak przetworzona baza danych stanowiła podstawę do użycia technik eksploracji danych, tj. sztucznych sieci neuronowych oraz algorytmów klasyfikacyjnych. Biorąc pod uwagę rodzaje technik eksploracji danych oraz zastosowaną metodykę łącznie wytrenowano około 60 tysięcy modeli, z których wyselekcjonowano optymalne do przewidywania obszaru występowania mikroemulsji. Do systemu wspomaganie decyzji włączono 5 modeli sztucznych sieci neuronowych oraz model *RandomForest*. Napisano kod źródłowy aplikacji komputerowej ME\_DSS, który umieszczono na serwerze *sourceforege.net*, jest ona dostępna na warunkach licencji Wolnego Oprogramowania.

Zastosowanie ME\_DSS pozwoliło na predykcję obszarów występowania ponad 1000 układów fazowych. Na podstawie wielowartościowego rankingu wybrano 20 układów fazowych i w oparciu o porównanie predykcji ME\_DSS z obszarem występowania mikroemulsji wyznaczonym

eksperymentalnie dokonano oceny efektywności programu. Do dalszych badań wybrano 20 formułacji mikroemulsji i oceniono ich właściwości fizykochemicznych oraz stabilność. Podobną ocenę dokonano dla dwóch formułacji z modelową substancją leczniczą.

## Summary

Aim of the dissertation was to evaluate the application of data mining techniques in the process of microemulsion formulation. Three main stages of the work were established: data mining and the development of the decision support system, writing a code of the computer application and validation of the system in practice.

Both computational and technological methods were used to carry out the research. As a part of computational procedure following objectives have been done: the database was created which contained a numeric representation of qualitative and quantitative composition of the microemulsion, the heuristics modeling was conducted, the decision support system was developed, as well as the ME\_DSS program code was written. To assess the ME\_DSS prediction efficiency analysis of physicochemical properties and stability studies were made as a part of technological process. The microemulsion formulation composition was for dermal administration of ibuprofen as a model sparingly soluble in water drug active pharmaceutical ingredient.

Based on the literature survey a database was created, which contained about 305 000 records, a numeric representation of the qualitative and quantitative composition of the microemulsion formulations. Each data record contained information about the percentage of the components of microemulsions and their physical and chemical parameters e.g. the HLB value, density of the oil phase, ionic strength of the aqueous phase, and more than 400 molecular descriptors. Based on the results of sensitivity analysis number of independent variables was reduced to seventeen. The database was further utilized during data mining process in which techniques as artificial neural networks and classification algorithms were used. Jointly about 60 000 models were trained and tested in order to select the optimal ones to predict the occurrence of microemulsion. The decision support system was combining the results of five artificial neural networks and the *RandomForest* model. Computer application integrating the support system and its source code was uploaded on the sourceforge.net server under the Open Source license.

ME\_DSS application was used to predict microemulsion occurrence in over 1000 phase triangles. Based on multivariate ranking 20 phase triangles were chosen to assess in laboratory the efficiency of the ME\_DSS. Twenty formulations were chosen to assess their physicochemical

properties and stability. Similar assays were conducted for two microemulsions with drug substance.

## Wykaz skrótów i symboli

<i>Skrót/symbol</i>	<i>Wyjaśnienie skrótu/symbolu</i>
ADABoost	klasyfikator ze wzmacnianiem
ADTree	algorytm zmiennego drzewa klasyfikacyjnego
$a_o$	powierzchnia hydrofilowego fragmentu tenzydu
AUC	pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w czasie
AUROC	pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca
AUROC <sub>in</sub>	wartość AUROC, powyżej której włączano modele do analizy wrażliwościowej
AUROC <sub>maks</sub>	maksymalna wartość AUROC otrzymana w procesie uczenia
BP	wsteczna propagacja, algorytm uczenia sieci neuronowej
$C$	liczba niezależnych składników
$C_i$	molowe stężenie składnika $i$ w mieszaninie [mol/L]
CMC	transmisyjna (TEM) i skaningowa (SEM) mikroskopia elektronowa
CPP	współczynnik upakowania
CRC	model sześciennych komórek, model Jouffroy-Levinson-De Gennes
CRISP-DM	metodyka prowadzenia eksploracji danych
DecisionStump	algorytm indukcji drzew decyzyjnych
DOC	model sferycznych kropli połączonych strukturami cylindrycznymi, model Talmon-Prager
DSS	systemu wspomagania decyzji
EF	skuteczność systemu
EG	błąd całkowity
$F$	liczba stopni swobody, liczba niezależnych wyników obserwacji pomniejszona o liczbę związków, które łączą te wyniki ze sobą
FF-SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa z zamrażaniem i łamaniem próbki
FF-TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa z zamrażaniem i łamaniem próbki
$fsr$	logarymiczna funkcja aktywacji wg Bilskiego
FT-PGSE NMR	technika impulsowej spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego z transformacją Fouriera
Ftree	wariant algorytmu indukcji drzew klasyfikacyjnych
G0	ilość decyzji prawdziwie negatywnych
G1	ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji
$H$	stała (indeks) przypisany grupom hydrofilowym
HLB	równowaga hydrofilowo-lipofilowa
IBk	pamięciowy klasyfikator minimalno-odległościowy

J48	drzewo decyzyjne C4.5
J48graft	wariant drzewa decyzyjnego C4.5
JVM	wirtualna maszyna Java
Kstar	wariant metody k-najbliższych sąsiadów
KT	kotenzyd
$k_{\beta}$	stała Boltzmana ( $k_{\beta} = -\Delta S_m$ , gdzie $\Delta S_m$ – entropia mieszania)
$L$	stała (indeks) przypisany grupom hydrofobowym
LADTree	wariant drzewa klasyfikacyjnego wykorzystujący technikę szacowania rozkładów błędu estymacji za pomocą wielokrotnego losowania
$l_c$	długość hydrofobowego łańcucha tenzydu
LTM	drzewo hybrydowe z funkcją regresji logistycznej
MAE	średni błąd uczenia
ME	mikroemulsja
MLP	sieć neuronowa typu wielowarstwowego perceptronu
NBTree	hybrydowe drzewo decyzyjne z klasyfikatorem bayesowskim
NF	sieć neuronowo-rozmyta
$nH$	ilość grup hydrofilowych w cząsteczce tenzydu
$nL$	ilość grup hydrofobowych w cząsteczce tenzydu
npred	ilość przewidzianych '1' i '0' łącznie
npred0	ilość przewidzianych '0'
npred1	ilość przewidzianych '1'
O	faza olejowa
$P$	liczba faz
PCS	fotonowa spektroskopia korelacyjna
PIT	temperatura przemiany fazowej
$R$	stała gazowa [ $J/(mol \cdot K)$ ]
$r$	promień kropli [m]
randomForest	metoda implementująca algorytm lasów losowych Breimana
REPTree	wariant drzewa klasyfikacyjnego wykorzystujący w rozgałęzieniach wartości średnie dla klasy
RMSE	pierwiastek błędu średniokwadratowego
RotationForest	hybrydowa metoda implementująca wiele algorytm lasów losowych Breimana
RSM	metoda powierzchni odpowiedzi
SANS	technika elastycznego rozpraszania neutronów pod niskimi kątami
SAXS	technika elastycznego rozpraszania promieni rentgenowskich pod niskimi kątami
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
SimpleCart	algorytm CART implementujący funkcję minimalizacji kosztu
SMEDDS	systemy samomikroemulgujące
SVM	metoda wektorów nośnych
$T$	temperatura [K]

T	tenzyd
T/KT	mieszanina tenzydu z kotenzydem
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa
V	Efektywna objętość części hydrofobowej tenzydu
VotedPerceptron	klasyfikator głosującego perceptronu
W	faza wodna
xGood0	prawidłowo przewidziany brak obecności ('0') mikroemulsji
xGood1	prawidłowo przewidziana obecność ('1') mikroemulsji
$\gamma$	napięcie powierzchniowe [N/m]
$\Gamma_i$	nadmiar powierzchni [mol/m <sup>2</sup> ] składnika <i>i</i> w mieszaninie
$\Delta A$	zmiana powierzchni kropeł podczas emulgowania [m <sup>2</sup> ]
$\Delta S$	zmiana entropii układu, entropia mieszania [J/(mol·K)]
$\mu_i$	potencjał chemiczny składnika <i>i</i> w mieszaninie [J/mol]
<i>substancje pomocnicze</i>	
AOT	bis(2-etylofenylo) sulfobursztynian sodu
AUDMAA	akrylooksyundecyloдимetyloamnio octan
C12E5	eter monododecylo-pentaetylenoglikolowy
C12E8	eter monododecylo-oktaetylenoglikolowy
C14TAB	bromek tetradecylotrimetyloamoniowy
CTAB	bromek cetylotrimetyloamoniowy
DDAB	bromek didodecyloдимetyloamoniowy
DDAO	N-tlenek N,N-dimetylo-dodecyloaminy
DTAB	bromek dodecylotrimetyloamoniowy
EDOT	3,4-etylenodioksytiofen
HEMA	metakrylan 2-hydroksyetylowy
IPM	mirystynian izopropylu
LSS	laurylosiarczan sodu
MMA	metakrylan metylu
NP5	eter izooktylofenylo polioksyetylenowy(5)
NP9	eter izooktylofenylo polioksyetylenowy(9)
PEG	glikol polioksyetylenowy
PEO R MA 40	metakrylan gamma-metoksy polietylenowy(40) kwasu alfa-undecylowego
S1570, S1170, S170, S770, S970, P1570, M1695, L1695	monoestry sacharozy





## I. Wstęp

### 1. Charakterystyka układów mikroemulsyjnych jako nośnika substancji leczniczych

Rozwój nauk medycznych oraz dziedzin pokrewnych, w tym rozwój badań nad lekiem stwarza możliwość zapewnienia pacjentom skutecznej i bezpiecznej terapii. Dobór leku dla pacjenta pod względem formy, drogi podania z uwzględnieniem sposobu dawkowania, zmieniającego się stanu chorobowego, predyspozycji osobniczych, przy jednoczesnym przyjmowaniu innych leków przez pacjenta i oddziaływaniu czynników środowiska stanowi podstawę terapii spersonalizowanej. Efekt terapeutyczny jest bowiem wypadkową wielu czynników i procesów, które oddziałują na substancję czynną w preparacie po jego aplikacji. Zróżnicowanie w zakresie form leku, jego cech fizycznych oraz właściwości fizykochemicznych substancji leczniczych daje szansę dokonania wyboru najlepszego leku dla chorego.

Od właściwości postaci leku dostosowanej do drogi podania zależy m. in. szybkość dystrybucji substancji czynnej do tkanek i narządów. Z tego m. in. względu nadanie substancji leczniczej formy, która zapewni zamierzony efekt terapeutyczny, przy zachowaniu bezpieczeństwa stosowania jest zasadniczym celem projektowania postaci leku.

Odnotowuje się ogromny postęp w zakresie technologii farmaceutycznej. Bogata jest oferta postaci leku o zróżnicowanej strukturze dla każdej z dróg podania. Opracowywana postać leku musi być precyzyjnie zdefiniowana pod kątem składu recepturowego, fizycznej struktury oraz stabilności, w oparciu o analizę oddziaływań wszystkich czynników, w tym procesu technologicznego na jakość postaci leku.

Nieprzerwanie trwają badania dotyczące nowych rozwiązań lub modyfikacji wcześniej opracowanych w zakresie poprawy dostępności farmaceutycznej i biologicznej substancji leczniczych. Ten kierunek badań jest pożądanym z uwagi na zwiększającą się ilość substancji leczniczych, charakteryzowanych jako trudno lub praktycznie nierozpuszczalne w wodzie. Ocenia się, że 70% w grupie nowo syntetyzowanych substancji należy do II lub IV grupy biofarmaceutycznego systemu klasyfikacji (*ang. Biopharmaceutics Classification System, BCS*) [108]. Właściwości te w zasadniczy sposób rzutują na szybkość uwalniania i wchłaniania. Poprawę

tych parametrów można uzyskać w wyniku tworzenia odpowiedniej struktury postaci leku poprzez dobór właściwych dla miejsca aplikacji substancji leczniczych i procesu technologicznego. Przykładem tego typu rozwiązań jest tworzenie mikroemulsji i układów samoemulgujących.

Według definicji Danielssona i Lindmana, mikroemulsje to izotropowe, termodynamicznie trwałe, przezroczyste lub lekko opalizujące ciecze, w których jeden lub więcej tenzydów służy do przeprowadzenia znacznych ilości hydrofilowej i lipofilowej fazy w układ makroskopowo jednofazowy [43].

Układy samoemulgujące (*ang. Self-Emulsifying Drug Delivery System, SEDDS*) są izotropowymi mieszaninami oleju i tenzydu (surfaktantu), czasem z dodatkiem hydrofilowego rozpuszczalnika (kosolwentu). W środowisku wodnym pod wpływem mieszania mogą tworzyć mikroemulsje określane jako SMEDDS (*ang. Self-Microemulsifying Drug Delivery System*).

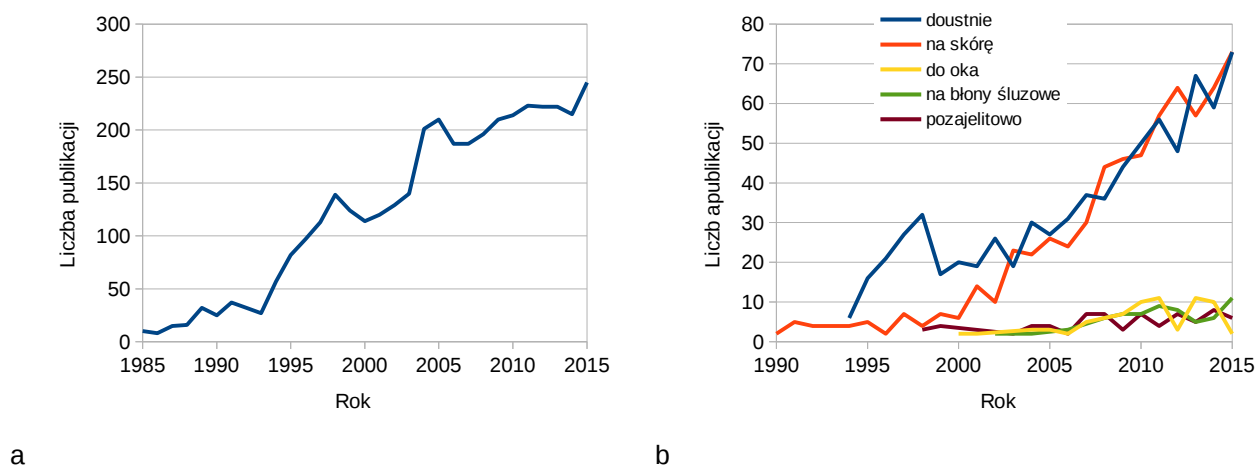
Liczne zalety mikroemulsji wynikające z ich fizycznych właściwości, zwłaszcza przezroczystość i stabilność kwalifikują je w grupie postaci leku, które poprzez oddziaływanie ich formy mają wpływ na poprawę dostępności farmaceutycznej i biologicznej substancji leczniczej. Układy fizyczne o stopniu rozproszenia fazy wewnętrznej poniżej 140 nm znajdują zastosowanie jako nośniki substancji leczniczych, zwłaszcza trudno rozpuszczalnych w wodzie (II i IV klasa BCS). W przypadku substancji leczniczych rozpuszczalnych w wodzie, słabo przepuszczalnych przez błony komórkowe (III klasa BCS) proponowane są modyfikowane SEDDS jako podwójne samoemulgujące układy lipidowe SDEDDS (*ang. Self-Double-Emulsifying Drug Delivery System*), czyli mieszaniny emulsji w/o i hydrofilowego tenzydu, które po wprowadzeniu do środowiska wodnego tworzą układy w/o/w.

Od ponad 30 lat układy mikroemulsyjne są przedmiotem badań w licznych ośrodkach naukowych, a zainteresowanie tą formą leku zwiększa się systematycznie od połowy lat 80-tych. Fakt ten obrazuje liczba publikowanych artykułów w poszczególnych latach dotyczących mikroemulsyjnych postaci leku. Wg danych z portalu Web of Science® w okresie od 1985 do 2015 roku liczba ww. publikacji zwiększyła się ponad dwudziestokrotnie (ryc. 1a).

Pierwsze opracowania dotyczyły aplikacji leku na skórę w formie mikroemulsji o/w w celu uzyskania działania miejscowego przeciwbólowego (lidokaina) i przeciwzapalnego (indometacyna, diklofenak) [31, 61, 118]. Przedmiotem dalszych zainteresowań były transdermalne układy mikroemulsyjne typu o/w zawierające blokery kanałów wapniowych (felodypina) lub układy typu w/o zawierające beta-blokery (propranolol) [119, 211]. Od połowy lat 90-tych równoległe badania

dotyczyły doustnych formułacji mikroemulsyjnych, czego efektem jest wprowadzenie do leczenia preparatu peptydowego Sandimmun® Neoral w postaci systemu samomikroemulgującego [181].

Coraz więcej publikowanych danych dotyczy możliwości stosowania tej postaci leku w przypadku podania pozajelitowego, do oka i na błony śluzowe (ryc. 1b).



**Rycina 1.** Liczba publikacji z zakresu mikroemulsji. a) z dziedziny nauk o leku; b) według ich drogi podania. Utworzono na podstawie danych z portalu Web of Science®.

Poprawa dostępności biologicznej substancji leczniczych, niezależnie od drogi ich podania, może być uzyskana poprzez zmianę właściwości fizykochemicznych substancji leczniczej w celu uzyskania poprawy rozpuszczalności lub zmiany właściwości błon komórkowych. Struktura układów mikroemulsyjnych sprzyja zamknięciu większej ilości substancji leczniczej. Uzyskanie formułacji odpowiedniej jakości wymaga właściwego doboru składników pod względem jakościowym i ilościowym, zapewniającym trwałość takiego układu.

### 1.1. Skład układów mikroemulsyjnych.

Mikroemulsje oprócz fazy wodnej i olejowej zawierają mieszaninę tenzydu (surfaktantu) i kotenzydu/kosolwentu. Powstają bez dużego nakładu energii mechanicznej, co stanowi zaletę z

punktu widzenia technologicznego. Są to więc układy powstające spontanicznie, o znacznie rozbudowanej powierzchni wewnętrznej, gdyż średnica cząstek nie przekracza 140 nm. Dzięki takim właściwościom rozproszenie światła jest niewielkie, co daje efekt przezroczystości lub lekkiej opalescencji. Stabilność struktury mikroemulsji może być zaburzona poprzez wprowadzenie dodatkowych substancji, zarówno substancji leczniczych, jak i substancji pomocniczych np. korygujących wartość pH.

Zasadniczym problemem jest jednak dobór składników gwarantujących bezpieczeństwo stosowania układów mikroemulsyjnych. Zwraca się uwagę na rodzaj i właściwości oleju, tenzydów, stężenie tenzydu i ilościowy stosunek olej/woda/tenzyd/kotenzyd (tab. 1). W mikroemulsyjnych formulacjach faza olejowa jest znaczącym składnikiem, gdyż może być rozpuszczalnikiem dla wielu substancji leczniczych. W tym celu stosowane są oleje roślinne np. olej rycynowy, sojowy, słonecznikowy, długołańcuchowe i średniołańcuchowe triglicerydy kwasów tłuszczowych (LCT, C<sub>18</sub>/C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:2</sub>; MCT, C<sub>8</sub>/C<sub>10</sub>), wolne kwasy tłuszczowe, a także ich estry etylowe i metylowe.

**Tabela 1.** Przykłady substancji stosowanych do sporządzania mikroemulsji [46, 107, 111, 113, 120, 121, 124, 125, 139, 163, 172].

faza olejowa	tenzydy			kotenzydy/ kosolwenty
	amfoteryczne	niejonowe	jonowe	
olej rycynowy oczyszczony, olej słonecznikowy oczyszczony, izopropylu mirystynian, izopropylu palmitynian, triglicerydy nasyconych kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha	lecytyna, N,N-dimetylo-laurylo- lizyna,	polisorbata 20, polisorbata 80, makrogolo- glicerydów oleiniany, makrogolo- glicerolu hydrokso- stearynian, makrogolo- glicerolu rycynooleinian, poloksamery, sorbitanu stearynian, oleinian, laurynian, palmitynian	sodu dokuzynian, sodu laurylosiarczan, bromek dodecylotrimetylo- amoniowy, bromek heksadecylotri- metyloamoniowy,	makrogolo-6- glicerydu oleinian, poliglicerolu-3 oleinian, triacetyna, etanol, butanol, alkohol izopropylowy, sacharoza, sorbitol.

Spośród wymienionych olejów, średniołańcuchowe triglicerydy charakteryzują się lepszymi właściwościami rozpuszczania substancji czynnej, lepszą stabilnością m. in. wynikającą z odporności na działanie czynników utleniających oraz łatwiejszą penetracją do filmu międzyfazowego [141, 142]. Zwłaszcza frakcjonowane średniołańcuchowe triglicerydy otrzymywane z oleju kokosowego są uznane przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) jako bezpieczne w stosowaniu [183]. Ich użycie umożliwia tworzenie mikroemulsji w temperaturze pokojowej o zróżnicowanym składzie recepturowym. Z kolei mono-, di- i triglicerydy wpływają na zwiększenie wchłaniania substancji poprzez nabłonek jelitowy.

Do sporządzania mikroemulsji stosowane są przede wszystkim tenzydy amfoteryczne i niejonowe o zróżnicowanej budowie strukturalnej cząsteczek. Tenzydy te charakteryzują się różnymi wartościami liczby HLB, w zakresie od 1 do 45 (dla niejonowych tenzydów od 1 do 20), a także odmiennym momentem dipolowym, współczynnikiem upakowania (ang. *Critical Packing Parameter*, CPP) i temperaturą topnienia [95, 111, 125].

Liczba HLB (ang. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*), wprowadzona przez Griffina [74, 75], określa zależność pomiędzy częścią hydrofilową i hydrofobową cząsteczki tenzydu. Pod koniec lat 50-tych Davies zaproponował metodę obliczania HLB opartą na klasyfikacji grup chemicznych w cząsteczce, która uwzględnia rodzaj elementów strukturalnych wchodzących w skład tenzydu (równanie 1) [45]:

$$HLB = [(nH \times H) - (nL \times L)] + 7 \quad (1),$$

gdzie:

$H$ ,  $L$  – stałe (indeksy) przypisane odpowiednio grupom hydrofilowym ( $H$ ) i hydrofobowym ( $L$ ),

$nH$ ,  $nL$  - ilość grup hydrofilowych ( $nH$ ) i hydrofobowych ( $nL$ ) w cząsteczce tenzydu.

Zgodnie z równaniem (1) wartość HLB zależy od ilości grup hydrofilowych i hydrofobowych ( $nH$ ,  $nL$ ) w cząsteczce tenzydu oraz od siły oddziaływania poszczególnych grup atomów ( $H$ ,  $L$ ). Tenzydy rozpuszczalne w wodzie, o liczbie HLB > 10 stosuje się do sporządzania mikroemulsji typu o/w (ryc. 2a), natomiast rozpuszczalne w oleju, o liczbie HLB poniżej 10 są

składnikami mikroemulsji w/o (ryc. 2e). Stosując tenzydy, lub mieszaninę tenzydów o wypadkowej wartości  $HLB \approx 10$  można otrzymać układy o strukturze dwuciągłej (ryc. 2c).

Koncepcję współczynnika upakowania (CPP) wprowadzoną przez Israelachvili i wsp. [95], stosuje się w obliczeniach mających na celu przewidywanie typu, kształtu i rozmiaru agregatów tenzydów w wodzie (równanie 2):

$$CPP = \frac{V}{a_o \cdot l_c} \quad (2),$$

gdzie:

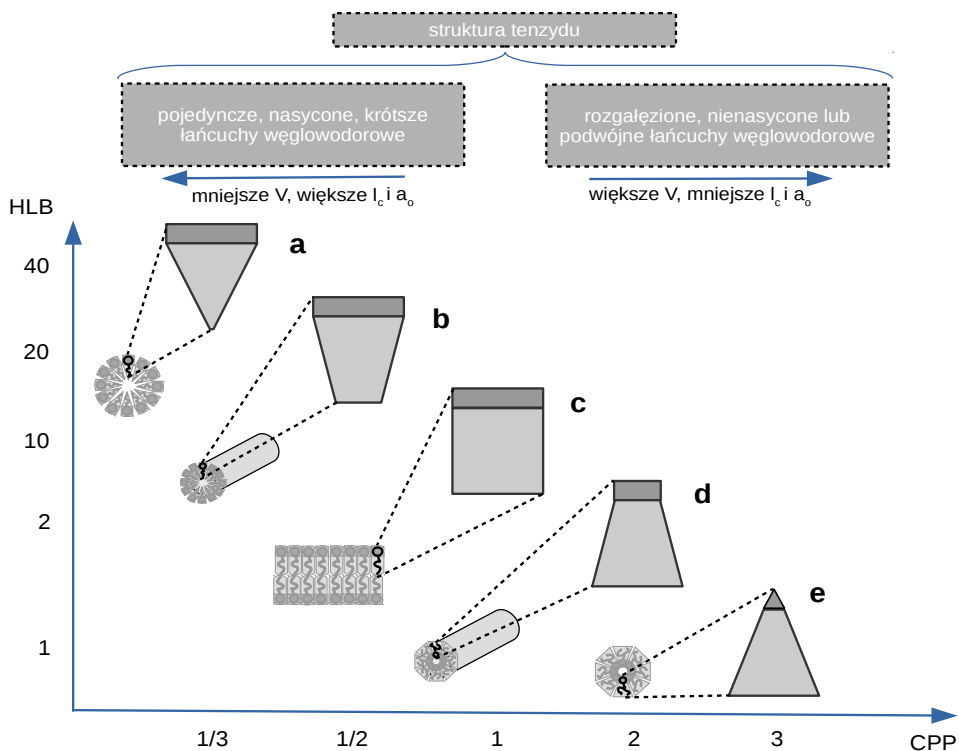
$V$  – efektywna objętość części hydrofobowej tenzydu,

$a_o$  – powierzchnia hydrofilowego fragmentu tenzydu,

$l_c$  – długość łańcucha węglowodorowego tenzydu.

Wartość CPP jest wprost proporcjonalna do efektywnej objętości hydrofobowego fragmentu tenzydu ( $V$ ) i odwrotnie proporcjonalna do powierzchni hydrofilowej ( $a_o$ ) oraz długości łańcucha węglowodorowego tenzydu ( $l_c$ ) [95].

Współczynnik upakowania (CPP) odzwierciedla w jaki sposób różne rodzaje sił na granicy faz, jak np. elektrostatyczne czy van der Waalsa oddziałują na część hydrofilową i hydrofobową cząsteczki tenzydu. Współczynnik CPP określa preferowaną geometrię cząsteczki surfaktantu, którą może ona tworzyć w wodzie. Wpływ zmiany CPP tenzydów na struktury powstające w środowisku wodnym przedstawiono na rycinie 2. Tenzydy, których struktura molekularna przypomina kształt stożka adsorbują się na powierzchni kontaktu fazowego o dużej krzywiznie (ryc. 2a i 2e). Z kolei tenzydy, których przestrzenna struktura cząsteczek jest zbliżona do ściętego stożka (ryc. 2b i 2d) lub cylindra (ryc. 2c) tworzą wydłużone micelle lub struktury lamelarne [94].



**Rycina 2.** Zależność liczby HLB od współczynnika upakowania, zmodyfikowane wg [94].

(CPP - współczynnik upakowania; V - efektywna objętość części hydrofobowej tenzydu;  $a_o$  - powierzchnia hydrofilowa;  $l_c$  - długość łańcucha hydrofobowego).

Zmiany w składzie mikroemulsji mogą powodować również zmiany wartości CPP tenzydów. Zastosowanie substancji o małej masie cząsteczkowej np. maślan etylu, kaprylan etylu jako fazy olejowej skutkować może przemieszczaniem się cząsteczek fazy olejowej pomiędzy hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi tenzydu. Spowoduje to zwiększenie efektywnej objętości części hydrofobowej (V) tenzydu, a w konsekwencji wzrost wartości CPP. Nie stwierdza się takiego wpływu na wartość współczynnika CPP w przypadku użycia jako fazy olejowej substancji o większej masie cząsteczkowej np. oleinianu etylu, Miglyolu®812N. Siła jonowa fazy wodnej, poprzez wpływ na hydrofilową część tenzydu ( $a_o$ ), może modyfikować wartość CPP tenzydów jonowych. Wzrost siły jonowej fazy wodnej powoduje zmniejszenie efektywnej powierzchni hydrofilowego fragmentu tenzydu ( $a_o$ ), tym samym wzrost wartości CPP. Oprócz oddziaływań jonowych zmiany rozpuszczalności części hydrofilowej w fazie wodnej mogą modyfikować wartość CPP tenzydu, co stwierdzono po dodaniu glicerolu i sorbitolu do fazy wodnej [215]. Z tego względu substancje hydrofilowe dodaje się do fazy wodnej jako kosolwenty w celu ułatwienia formowania mikroemulsji. Również temperatura wpływa na zmianę wartości CPP. Udowodniono to na przykładzie tenzydów niejonowych (Brij®). Na skutek wzrostu temperatury

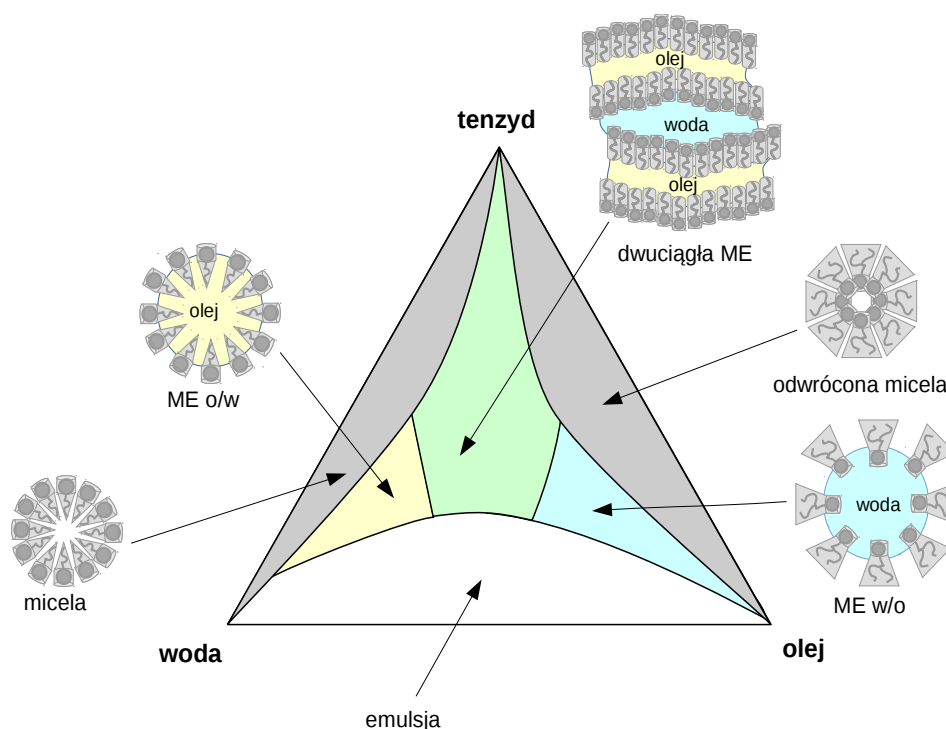
może dojść do dehydratacji grup polioksyetylenowych, co rzutuje na zmianę wartości CPP, a w konsekwencji nawet na rozdzielanie faz.

Lecytyna jako składnik naturalny, będący mieszaniną fosfolipidów o właściwościach amfoterycznych, ze względu na zgodność biologiczną i nietoksyczność, stosowana jest w formulacjach do podania doustnego lub pozajelitowego [121]. Tenzydy niejonowe takie jak poloksamer, estry polioksysorbitanu i kwasów tłuszczowych (polisorbata 20 i polisorbata 80) lub polioksyetylenu i kwasów tłuszczowych (makroglicerolu rycynooleinian) charakteryzują się niewielką toksycznością, zgodnością z wieloma substancjami leczniczymi, a pH ma niewielki wpływ na ich właściwości. Odgrywają rolę w zwiększeniu rozpuszczalności substancji leczniczych, a przez to w uzyskaniu mikroemulsyjnej postaci leku o skutecznym ich stężeniu. Tenzydy jonowe ze względu na działanie drażniące, są rzadziej stosowane, zazwyczaj jako tenzydy pomocnicze w celu zwiększenia obszaru występowania mikroemulsji. Tenzydy o pojedynczym łańcuchu hydrofobowym, np. sodu laurylosiarczan lub tworzące wiązania dipol-dipol, np. makroglu eter laurylowy, Brij<sup>®</sup>30, usztywniają film międzyfazowy i zmieniają jego krzywiznę [164]. Obecnie wzrasta zainteresowanie fluorowanymi surfaktantami do stabilizacji układów mikroemulsyjnych charakteryzującymi się silniejszym działaniem powierzchniowo czynnym oraz słabszym działaniem hemolitycznym [134].

Obecność kotenzydów sprzyja obniżeniu napięcia powierzchniowego do wartości bliskich zeru, co zapewnia stabilność układu, zwiększenie elastyczności filmu międzyfazowego [29, 30, 89, 113, 163]. Jako substancje o małej masie cząsteczkowej wbudowują się pomiędzy cząsteczki tenzydu filmu międzyfazowego. Zazwyczaj stosowane są: alkohole średniołańcuchowe, krótkołańcuchowe aminy i kwasy alkanowe takie jak: dekanol, triacetyna lub poliglicerolo-3 oleinian. Jako kosolwenty znajdują także zastosowanie cząsteczki o małej masie cząsteczkowej oraz wysokiej polarności np.: etanol, butanol, glikol propylenowy (tab. 1) [107, 124, 139, 163]. Przypisuje się im zdolność rozluźniania połączeń między cząsteczkami tenzydu oraz rozpuszczania większych ilości substancji leczniczej w fazie lipofilowej.



Skład ilościowy mikroemulsji określa się w oparciu o dane eksperymentalne. Pomocne w tym względzie jest tworzenie diagramu fazowego tj. trójkąta Gibbsa w formie trójkąta równobocznego, którego wierzchołki odpowiadają poszczególnym składnikom. Podstawowe składniki stosowane do sporządzania mikroemulsji, zależnie od ich wzajemnego stosunku, mogą w różny sposób wzajemnie oddziaływać tworząc różne układy. Nie wszystkie kombinacje składników na całej powierzchni diagramu fazowego prowadzą do uzyskania mikroemulsji. W niektórych przypadkach obszar trójkąta fazowego odpowiadający tworzeniu mikroemulsji może być znacznie ograniczony. Oprócz mikroemulsji mogą powstawać emulsje, micelle lub odwrócone micelle. Zależnie od struktury chemicznej tenzydu, temperatury, po osiągnięciu krytycznego stężenia micelnarnego zarówno w środowisku wodnym jak i olejowym mogą tworzyć się micelle. Odwrócone micelle o odwrotnej orientacji grup hydrofilowych i lipofilowych powstają w rozpuszczalnikach olejowych i wówczas wewnętrzna faza ma charakter hydrofilowy. Obydwie formy micelarne mogą mieć wpływ na skuteczność działania substancji leczniczej poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności lub przedłużenie uwalniania np. hydrofilowych substancji czynnych. Na rycinie 3 przedstawiono schematycznie diagram fazowy z zaznaczeniem regionów tworzenia się poszczególnych układów.



**Rycina 3.** Schemat diagramu fazowego Gibbsa układu olej/tenzyd/woda, zmodyfikowane na podstawie [125].

W przypadku gdy rozpatruje się tworzenie układów mikroemulsyjnych z czterema lub większą ilością składników stosuje się pseudo-trójskładnikowy diagram fazowy, którego jeden z wierzchołków trójkąta równobocznego opisany jest układem dwuskładnikowym: olej/woda, woda/tenzyd/kotenzyd, olej/tenzyd/kotenzyd. Na podstawie reguły faz J. W. Gibbsa określa się obszar izotropowy mikroemulsji. Reguła faz pozwala na identyfikację liczby zmiennych, tj. stopni swobody w zależności od składu układu przy zachowanej stałej temperaturze i ciśnieniu. Zależność ta opisywana jest następującym równaniem:

$$F = C - P + 2 \quad (3),$$

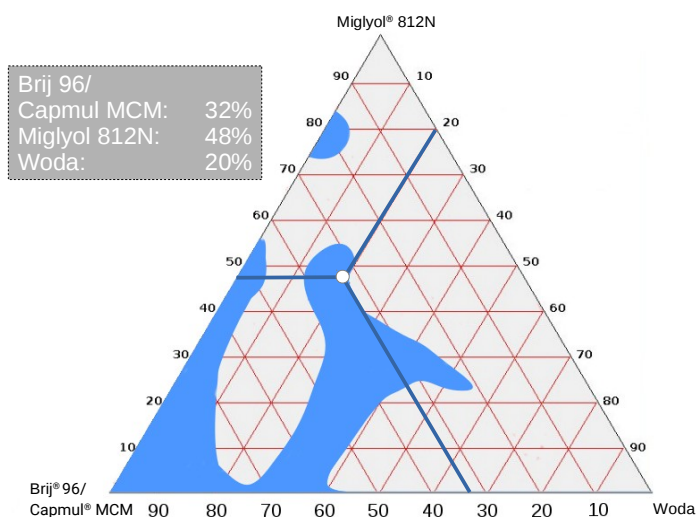
gdzie:

$F$  - liczba stopni swobody, możliwych niezależnych zmian bez jakościowej zmiany układu, przyjmuje wartości liczb naturalnych 0, 1, 2, 3 itd.

$C$  - liczba niezależnych składników,

$P$  - liczba faz.

Przykład wyznaczonego eksperymentalnie obszaru mikroemulsji na diagramie fazowym przedstawiono na rycinie 4.



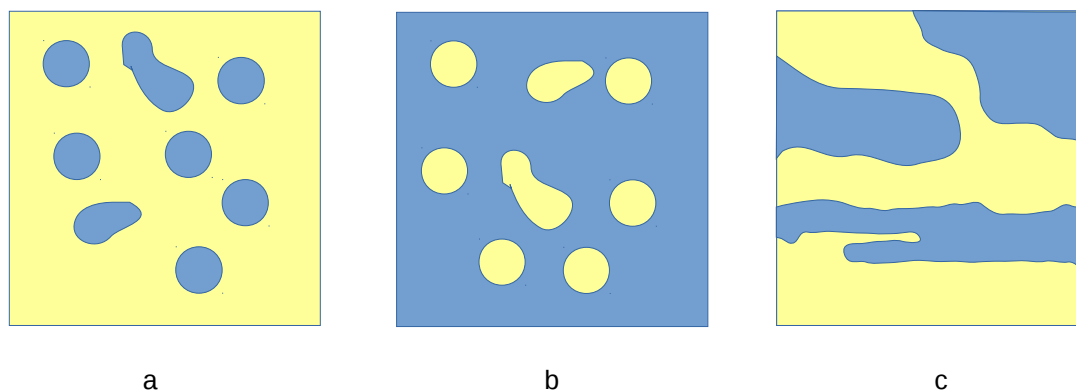
**Rycina 4.** Diagram fazowy Gibbsa. Obszar mikroemulsji (kolor niebieski) wyznaczony doświadczalnie. Współrzędne punktu określają skład mikroemulsji: Brij® 96/Capmul® MCM (1+1) 32%, Miglyol® 812N 48% i woda 20%.

Konstruowanie diagramów fazowych jest czasochłonne, zwłaszcza gdy celem jest dokładne wyznaczenie obszaru występowania mikroemulsji. Jest to spowodowane czasem potrzebnym do uzyskania stanu równowagi układu, który znacznie się zwiększa w miarę zbliżania się do granicy wyznaczonego obszaru. Ogrzewanie i stosowanie ultradźwięków, zwłaszcza w przypadku tenzydów niejonowych, mogą ten proces przyspieszyć. Proces wyznaczenia obszaru występowania mikroemulsji zazwyczaj polega na przygotowaniu serii mieszanin dwuskładnikowych i miareczkowanie ich trzecim składnikiem, a następnie oceny wizualnej mieszaniny po każdej dodanej porcji trzeciego składnika. Należy zwrócić szczególną uwagę na precyzyjną kontrolę temperatury oraz unikać obserwacji układu w stanie metastabilnym. Jednakże ten ostatni wymóg może być trudny do spełnienia z uwagi na długi czas ustalania się stanu równowagi termodynamicznej układu i stosunkowo dużą trwałość stanów metastabilnych [125].

### *1.2. Struktura układów mikroemulsyjnych.*

Układ mikroemulsyjny charakteryzuje się określoną mikrostrukturą. Na granicy faz olejowej i wodnej zlokalizowane są cząsteczki tenzydu. Cząsteczka związków powierzchniowo czynnych zawiera polarną grupę hydrofilową oraz apolarny region, który zwykle posiada większą objętość molekularną, szczególnie w przypadku tenzydów jonowych. Po rozproszeniu w wodzie tenzydy tworzą samoorganizujące się struktury w różnych stanach równowagowych, których charakter bezpośrednio wynika z wzajemnego oddziaływania sił międzycząsteczkowych i entropii układu. Tenzydy także asocjują w niewodnych rozpuszczalnikach. Zmiana kierunku ułożenia tenzydu jest spowodowana zmniejszeniem energii swobodnej układu podczas rozpuszczania. Gdy tenzydy wprowadza się do dwóch ciekłych faz nie mieszających się ze sobą, ich cząsteczki ustawiają się w sposób zorientowany na powierzchni międzyfazowej, co pod względem termodynamicznym jest bardzo korzystne. W wyniku tego procesu może powstać wiele faz o strukturze mikro- lub makroskopowej, której przykładem jest optycznie izotropowa mikroemulsja (ryc. 5).

Zgodnie z modelem kroplowym faza rozproszona otoczona jest filmem utworzonym z tenzydu i kotenzydu. Od napięcia międzyfazowego zależy stabilność mikroemulsji. Oprócz układów typu w/o lub o/w, mikroemulsje mogą charakteryzować się strukturą dwuciągłą, określaną jako sieć kanalików wody w matrycy olejowej (ryc. 5 a – c).



**Rycina 5.** Struktury mikroemulsji. a) mikroemulsja typu w/o; b) mikroemulsja typu o/w; c) mikroemulsja o strukturze dwuciągłej. Zmodyfikowane na podstawie [120].

Na rycinie 5 schematycznie przedstawiono trzy typy mikroemulsji, które mogą powstać w zależności od składu ilościowego. Każda ze struktur jest inna, ale wspólną ich cechą jest występowanie filmu tenzydu na granicy fazy wodnej i olejowej. Rycina 5 przedstawia mikroemulsje o/w i w/o jako kuliste struktury (ryc. 5 a,b) – w rzeczywistości mogą one być asymetryczne, często przyjmując kształt wydłużonej elipsoidy. Mikroemulsje typu o/w powstają w układach, w których zawartość fazy olejowej jest mała. Z kolei, gdy udział objętościowy wody jest niewielki, wtedy powstaje mikroemulsja typu w/o. W przypadku podobnych ilości fazy olejowej i wodnej mogą tworzyć się struktury dwuciągłe, w których zarówno faza wodna jak i olejowa przenikają się wzajemnie stabilizowane filmem międzyfazowym zawierającym tenzyd.

Winsor wprowadził klasyfikację układów mikroemulsyjnych wyróżniając cztery ich rodzaje [218]. Mikroemulsje zakwalifikowane do typu IV, określił jako izotropowe układy, w których „nie występuje wolna faza olejowa ani wodna, i wraz z tenzydem są wzajemnie solubilizowane”. Są po dzień dzisiejszy rozpatrywane jako nośniki substancji leczniczej.

### 1.3. Stabilność układów mikroemulsyjnych.

O stabilności układów mikroemulsyjnych decyduje szereg czynników m. in.:

- ilość i rodzaj zastosowanego oleju, tenzydu i kotenzydu,
- właściwości substancji leczniczej oraz jej ilość,

- siła jonowa fazy wodnej,
- temperatura przechowywania [121, 124, 126, 164].

Proces tworzenia mikroemulsji przebiega spontanicznie, gdy entalpia swobodna ( $\Delta G$ ) układu ma wartość ujemną. Zależność zmiany entalpii swobodnej układu od napięcia powierzchniowego ( $\gamma$ ) oraz zmiany entropii układu ( $\Delta S$ ) opisuje następujące równanie:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (4),$$

gdzie:

$\Delta G$  - zmiana entalpii układu [J/(mol·K)],

$\gamma$  - napięcie powierzchniowe,

$\Delta A$  - zmiana powierzchni kropeł podczas emulgowania,

$T$  - temperatura [K],

$\Delta S$  - zmiana entropii układu, entropia mieszania [J/(mol·K)].

Poprzez dobór odpowiednich składników fazy olejowej oraz mieszaniny tenzydu i kotenzydu można obniżyć napięcie powierzchniowe do wartości, przy których proces tworzenia mikroemulsji przebiega spontanicznie. W większości przypadków wartość  $\Delta S$  jest znacznie mniejsza od energii wynikającej ze zmiany napięcia powierzchniowego oraz powierzchni kropeł. Jeżeli zawartość fazy olejowej w mikroemulsji wynosi 10%, średnica kropli 100 nm i napięcie na granicy faz olej/woda  $10^{-2}$  mN/m, to energia powierzchniowa takiego układu wynosi ok.  $0.3 \text{ kJ/m}^3$ , a iloczyn  $T\Delta S$  ok.  $3 \cdot 10^{-7} \text{ kJ/m}^3$ . Wówczas iloczyn temperatury i entropii mieszania może być pominięty. W takim przypadku można zastosować uproszczoną formę równania (5):

$$\Delta G = \gamma \Delta A \quad (5)$$

Z powyższego równania wynika, że spontaniczny przebieg procesu jest warunkowany ujemną entalpią swobodną ( $\Delta G$ ). Podczas tworzenia mikroemulsji sumaryczna powierzchnia kropli układu wzrasta, więc składnik  $\Delta A$  w równaniu (5) jest zawsze dodatni. Dlatego, aby entalpia swobodna była ujemna, to drugi ze składników równania, napięcie powierzchniowe, musiałby być ujemny [125]. Jednakże Leitao [126] oraz Kumar i Mittal [121] wykazali, że stabilne mikroemulsje można uzyskać przy niskich, ale nie ujemnych, wartościach napięcia powierzchniowego w granicach od  $10^{-4}$  mN/m do  $10^{-2}$  mN/m [121, 126]. Wówczas w równaniu (4) iloczyn napięcia powierzchniowego i zmiany powierzchni jest mniejszy od iloczynu temperatury i zmiany entropii układu ( $\gamma\Delta A < T\Delta S$ ), a entalpia swobodna ujemna. Maksymalną wartość napięcia powierzchniowego ( $\gamma$ ) dla kropeł mikroemulsji o średnicy  $r$  można obliczyć w oparciu o równanie 6 [46]:

$$\gamma = \frac{k_{\beta} \cdot T}{4 \pi r^2} \quad (6),$$

gdzie:

$k_{\beta}$  - stała Boltzmana [J/K],

$T$  – temperatura [K],

$r$  – promień kropli [m],

$\gamma$  - napięcie powierzchniowe [N/m].

Zastosowanie pojedynczego tenzydu jest często niewystarczające do utworzenia stabilnej mikroemulsji i uzyskania bardzo niskiego napięcia powierzchniowego. Dlatego zwykle stosuje się dodatek kotenzydu. Równanie Gibbsa dla układów wieloskładnikowych charakteryzuje zależność napięcia powierzchniowego od składu filmu międzyfazowego i potencjału chemicznego ( $\mu$ ) składników mieszaniny:

$$d\gamma = -\sum_i (\Gamma_i \cdot d\mu_i) \approx -\sum_i (\Gamma_i \cdot R \cdot T \cdot d \ln(C_i)) \quad (7)$$

gdzie:

$dy$  - zmiana napięcia powierzchniowego [N/m] po wprowadzeniu składnika  $i$ ,

$\Gamma_i$  - nadmiar powierzchni [mol/m<sup>2</sup>] składnika  $i$  w mieszaninie,

$\mu_i$  – potencjał chemiczny składnika  $i$  w mieszaninie [J/mol],

$C_i$  - molowe stężenie składnika  $i$  w mieszaninie [mol/L],

$R$  - stała gazowa [J/(mol·K)],

$T$  – temperatura [K]

Przy założeniu, że film międzyfazowy tworzy tenzyd o stężeniu  $C_{te}$  i kotenzyd o stężeniu  $C_{ko}$ , a w fazie wodnej i fazie olejowej nie stwierdza się ich obecności, wówczas nadmiar powierzchni ( $\Gamma_{woda} = \Gamma_{olej}$ ) jest równy 0, to równanie (7) można wyrazić w postaci:

$$\gamma_{o/w} = \gamma_{o/w}^0 - \int_0^{C_{te}} \Gamma_{te} \cdot R \cdot T \cdot \ln(C_{te}) - \int_0^{C_{ko}} \Gamma_{ko} \cdot R \cdot T \cdot \ln(C_{ko}) \quad (8)$$

Z równania 8 wynika, że napięcie powierzchniowe może być obniżone poprzez zwiększenie nadmiaru powierzchni  $\Gamma_{te}$  i  $\Gamma_{ko}$ . Wbudowanie tenzydu i kotenzydu w film międzyfazowy powinno następować jednocześnie, przy założeniu braku interakcji pomiędzy nimi.

O stabilności mikroemulsji decyduje również temperatura przechowywania. Przy wzrastających wartościach temperatury układu wiązania wodorowe grup hydrofilowych tenzydu zostają osłabione, przez co słabsze jest oddziaływanie cząsteczek tenzydu z wodą. W tych warunkach wzrasta hydrofobowość niejonowych tenzydów, zmniejsza się ich stężenie w fazie wodnej, natomiast zwiększa się w fazie olejowej, co wpływa na krzywiznę filmu międzyfazowego kropelek mikroemulsji. Shinoda i wsp. [196] wprowadzili pojęcie temperatury przemiany fazowej (ang. *Phase Inversion Temperature*, PIT) i powiązali ją z liczbą HLB. Jeżeli temperatura układu jest niższa od temperatury przemiany fazowej, wówczas krzywizna filmu międzyfazowego jest dodatnia, i tworzy się mikroemulsja typu o/w. Jeżeli temperatura układu wzrasta powyżej wartości PIT, mikroemulsja typu o/w przekształca się w mikroemulsję typu w/o, gdyż zmienia się krzywizna filmu międzyfazowego z dodatniej na ujemną. Jeżeli temperatura układu jest zbliżona do

temperatury przemiany fazowej, wtedy dochodzi do spontanicznych zmian krzywizny filmu i tworzy się mikroemulsja typu dwuciągłego.

Przy opracowywaniu postaci leku należy wziąć pod uwagę podatność struktury mikroemulsyjnej na zmiany jej składu. Dotyczy to zarówno wprowadzania do układu substancji leczniczych, jak i pomocniczych. W zależności od drogi podania, korekta może być wymagana ze względu na pH preparatu, ciśnienie osmotyczne lub jego smak. Z tego względu konieczna jest kontrola utrzymywania odpowiedniej struktury mikroemulsyjnej oraz eliminacja interakcji dodawanych składników ze składnikami mikroemulsji. Użycie buforów lub substancji izotonizujących wpływa na wartość siły jonowej fazy wodnej. Wraz ze zwiększeniem stężenia jonów w fazie wodnej zmniejsza się powierzchnia układu izotropowego. Efekt ten jest widoczny zwłaszcza w mikroemulsjach zawierających tenzydy jonowe, np. sodu laurylosiarczan. Zmniejsza się stopień dysocjacji tenzydu, a także wartość potencjału zeta kropelek fazy rozproszonej [20]. Efekt zmniejszenia powierzchni regionu jednofazowego jest w mniejszym stopniu zaznaczony w mikroemulsjach zawierających tenzydy niejonowe [114, 121]. Ponadto zwiększenie stężenia jonów sprzyja przesunięciu krzywizny filmu międzyfazowego w kierunku wartości ujemnych, a więc powstawaniu układów typu w/o. Feuredi-Milhofer [62, 221] badając mikroemulsje typu w/o o składzie woda, izooktan i dioktylu sulfobursztynian sodu, wykazał że wprowadzony do układu aspartam wbudowuje się w film międzyfazowy i pełni funkcję kotenzydu.

#### 1.4. Mikroemulsyjne postacie leku, metody oceny ich jakości.

Mikroemulsje są przedmiotem wielokierunkowych badań pod kątem aplikacyjnego zastosowania, przede wszystkim jako postaci leku do podania doustnego, na skórę, do oka oraz pozajelitowo (tab. 3). Ich zalety i wady przedstawiono w tabeli 2. Zainteresowanie tą formą leku wynika z faktu, że ok. 50% substancji leczniczych należy do grupy trudno lub praktycznie nierozpuszczalnych. Ostatnie dane wskazują, że ponad 70% substancji nowo zsyntetyzowanych, określanych mianem „kandydat na lek” charakteryzuje się trudną rozpuszczalnością w wodzie [108].

Nie zawsze łatwa jest do przewidzenia reakcja *in vivo* po podaniu leku w formie mikroemulsji, zarówno jako bezwodnej jak i zawierającej fazę hydrofilową. Przyczyn ograniczenia wchłaniania substancji leczniczej może być wiele. Zwraca się uwagę przede wszystkim na te o



charakterze biofarmaceutycznym. W przypadku aplikacji doustnej analizuje się m.in. wpływ czynników fizjologicznych:

- sposób dystrybucji substancji leczniczej w obu fazach,
- wpływ surfaktantu na stabilność układu *in vivo* oraz możliwość oddziaływania jako promotora wchłaniania,
- wielkość stopnia rozproszenia w środowisku fizjologicznym,
- wpływ formy leku na perystaltykę przewodu pokarmowego,
- miejsce wchłaniania substancji leczniczej oraz jej szlak metaboliczny.

**Tabela 2.** Zalety i wady mikroemulsji.

zalety	wady
<p>łatwy proces technologiczny bez konieczności stosowania dużych nakładów energii i specjalistycznej aparatury,</p> <p>przezroczystość, małe rozmiary fazy rozproszonej (&lt;140 nm),</p> <p>właściwości solubilizujące,</p> <p>duża powierzchnia kontaktu,</p> <p>mniejsza lepkość w porównaniu z emulsjami,</p> <p>stabilność termodynamiczna,</p>	<p>stabilność zależna od czynników zewnętrznych np. temperatura, pH, dodatkowe składniki</p> <p>przy dużych stężeniach tenzydów / kotenzydów negatywne oddziaływanie na błonę komórkową.</p>

W zakresie formułowania doustnych mikroemulsyjnych postaci leku wykazano lepszą dostępność biologiczną substancji leczniczych dzięki poprawie ich rozpuszczalności, ochronie przed enzymatyczną hydrolizą oraz zwiększenie szybkości wchłaniania mikroemulsji. Oddziaływanie tenzydów na właściwości błon komórkowych ułatwia przenikanie substancji leczniczej. Tak więc układy mikroemulsyjne zapewniają lepsze wchłanianie substancji leczniczej nie tylko ze względu na właściwości solubilizujące, ale również promujące wchłanianie. Poza czynnikami technologiczno-fizykochemicznymi istotną rolę odgrywają czynniki anatomiczno-fizjologiczne, zwłaszcza perystaltyka przewodu pokarmowego, jego unaczynienie oraz pH

środowiska wchłaniania. Ponadto struktura błon biologicznych i ich właściwości decydują o przepuszczalności cząsteczek substancji leczniczej, tym samym jej biodostępności.

**Tabela 3.** Przykłady substancji leczniczych opracowanych w formie mikroemulsji dla różnych dróg podania leku.

droga podania	substancje lecznicze	postać leku	piśmiennictwo
na skórę	metotreksat, diklofenak, kwas pseudolarowy B, kurkumina, kwas flufenamowy, dl-praeruptorina A, resweratrol, naproksen, gryzeofulwina, karnozyna, ditranol, worykonazol, terbinafina, sylimaryna, takrolimus, anti-TNF, pentoksyfilina	żele ME, ME typu o/w i w/o	[5, 10, 16, 32, 57, 72, 73, 86, 90, 91, 101, 115, 165, 168, 178, 213, 230]
do oka	deksametazon, pilokarpiny chlorowodorek, witamina A, ewerolimus, cyklosporyna, prednizolon, diklofenak sodowy, amfoterycyna B, tymololu maleinian, ofloksacyna, worykonazol, tropikamid, ryboflawiny fosforan, gatyfloksacyna	ME typu w/o i o/w, żel ME powstający in-situ, żele z ME, SMEDSS	[17, 33, 55, 56, 80, 85, 102, 105, 110, 122, 129, 132, 138, 212]
doustnie	mirycetyna, glimepiryd, pueraryna, trokserutyna, kurkumina, donepezyl, kapsaicyna, brewiskapina, sylimaryna, raloksyfenu chlorowodorek, doksorubicyny chlorowodorek, symwastatyna, fenofibrat	ME typu o/w, SMEDDS, ME typu o/w, matryce HPMC z ME, liofilizowana ME	[19, 60, 76, 78, 106, 127, 128, 135, 136, 173, 184, 217, 220, 232]
pozajelitowo	dihydrojaśminian metylu, cyklosporyna, etopozyd, lorazepam, itrakonazol, docetaksel, amfoterycyna B	ME typu o/w	[42, 44, 98, 103, 180, 222, 225]
na błony śluzowe	syldenafil, kwetiapina, fenytoina, rywastygmina, sakwinawir	aerozol z ME do stosowania w jamie ustnej, aerozol z ME do nosa	[3, 92, 191, 192, 195]

HPMC, hydroksypropylometyloceluloza; ME, mikroemulsje; SMEDDS, systemy samomikroemulgujące;

Dodatek do układu mikroemulsyjnego tenzydów, takich jak np. Brij® 96, Cremophor® EL, Cremophor® RH40 i polisorbat 80, może zmniejszać biodostępność substancji leczniczych z formułacji zawierających lipidy, jeżeli zależy ona od szybkości hydrolizy tłuszczów [164]. Jeżeli

substancja lecznicza jest silnie lipofilowa, to po przeniknięciu do enterocyta może być transportowana wraz z lipoproteinami, w tym głównie chylomikronami, do układu limfatycznego, a stamtąd przewodem piersiowym przedostaje się do krążenia ogólnego. Ta droga wchłaniania substancji leczniczej zwana transportem limfatycznym pozwala na ominięcie wątrobowego efektu pierwszego przejścia. Ten mechanizm wchłaniania tłumaczy dlaczego małowcząsteczkowe, lipofilowe substancje lecznicze, tj. piroksykam lub klopidogrel wprowadzone do układów mikroemulsyjnych typu o/w ze względu na dobrą rozpuszczalność w triglicerydach posiadają większą dostępność biologiczną po podaniu doustnym [11, 169]. Triglicerydy o zróżnicowanej długości łańcuchów są najczęściej stosowane jako promotory transportu limfatycznego [28, 97]. Wykazano w badaniach *in vitro* na szczurach, że długołańcuchowe triglicerydy są znacznie bardziej efektywne w promowaniu transportu przez układ limfatyczny, niż układy zawierające średnio- lub krótkołańcuchowe triglicerydy [28].

Zwiększenie wchłaniania uzyskano także w przypadku peptydów, tj. wazopresyny, insuliny, tripeptydu RGD w układach mikroemulsyjnych typu w/o [88, 182, 188]. Faza olejowa pełni rolę ochronną przed oddziaływaniem enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym. Ponadto niektóre tenzydy tj. polisorbat 80 (Tween<sup>®</sup> 80) lub makrogloglicerolu rycynooleinian (Cremophor<sup>®</sup> EL) hamują aktywność P-glikoproteiny odpowiedzialnej za usuwanie substancji leczniczej z enterocytów z powrotem do światła jelita cienkiego [93].

Za szczególne osiągnięcie należy uznać wprowadzenie do lecznictwa preparatu Sandimmun<sup>®</sup> Neoral z cyklosporyną [181]. Układy te w środowisku wodnym płynów fizjologicznych pod wpływem perystaltyki przewodu pokarmowego tworzą mikroemulsję. Uzyskano w ten sposób lepszą dostępność biologiczną substancji leczniczej niż w przypadku klasycznej formy leku Sandimmun<sup>®</sup>. Wykazano około dwukrotne zwiększenie stężenia maksymalnego cyklosporyny we krwi ( $C_{max}$ ), skrócenie czasu jego występowania, zwiększenie pola powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC) oraz zmniejszenie różnic osobniczych. Przykłady preparatów wprowadzonych do lecznictwa zebrano w tabeli 4.

**Tabela 4.** Przykłady preparatów w formie mikroemulsji i układów samoemulgujących.

<b>nazwa</b>	<b>substancja lecznicza</b>	<b>producent</b>	<b>postać leku</b>
<i>podanie doustnie</i>			
Sandimmun Neoral®	cyklosporyna	Novartis	płyn doustny, kapsułki miękkie, zawierające SMEDDS
Gengraf®	cyklosporyna	Abbott Laboratories	płyn doustny, kapsułki twarde, zawierające SMEDDS
Sigmasporin® Microral	cyklosporyna	Laboratorio Libra	płyn doustny, kapsułki miękkie, zawierające SMEDDS
Fortovase®	sakwinawir	Roche Laboratories	kapsułki miękkie, zawierające SMEDDS
Norvir®	rytonawir	Abbott Laboratories	kapsułki miękkie, zawierające SMEDDS
<i>podanie na skórę</i>			
Solvium®	ibuprofen	Chefaro (Akzo)	żel, aerozol
Anestafoam®*	lidokaina	Onset	aerozol
Capsoft®*	cynkopiron, deksapentanol	Egsto-Pharm	krem, aerozol
Contrafungin®*	klotrimazol	Pharmagalen	krem

\* - produkt wycofany

Mikroemulsje rozpatrywane są również jako postać leku korzystna w terapii dermatologicznej. W celu wywołania działania leczniczego substancja czynna, w zależności od jej właściwości, dyfunduje poprzez ochronną warstwę rogową do żywych warstw naskórka lub do skóry właściwej. Podanie substancji leczniczych w formie mikroemulsji ma tę zaletę, że dzięki właściwościom solubilizującym układu nanonośnikowego większe jest stężenie substancji leczniczej niż w klasycznych preparatach, przez to po aplikacji na skórę powstaje korzystny gradient stężeń na granicy faz preparat/warstwa rogowa i zwiększa się aktywność termodynamiczna substancji leczniczej. Ponadto obecność tenzydów i kotenzydów w składzie formułacji sprzyja ułatwieniu przenikania substancji leczniczej do głębszych warstw skóry na skutek zwiększenia przepuszczalności warstwy rogowej. Oddziaływanie na międzykomórkowe struktury lipidowe warstwy rogowej poprzez zaburzenie ich uporządkowania lub upłynnienia sprzyja temu procesowi. Zakres zainteresowań badawczych obejmuje substancje o działaniu immunosupresyjnym,

cytotoksycznym, przeciwgrzybiczym, oraz substancje z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych i polifenoli o działaniu przeciwutleniającym (tab. 3).

Właściwości mikroemulsji takie jak: klarowność, możliwość wyjaławiania, stabilność, kwalifikują je do stosowania w terapii okulistycznej. Z uwagi na konieczność użycia surfaktantów, opracowanie mikroemulsyjnej formulacji wymaga dogłębnej analizy właściwości składników ze względu na wrażliwość narządu wzroku. W fazie opracowań są przede wszystkim mikroemulsje typu o/w. Pozytywne wyniki badań uzyskano dla pilokarpiny, chloramfenikolu, retinolu i substancji z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, fluorochinolonów, immunosupresyjnych, glikokortykosteroidów oraz substancji obniżających ciśnienie śródgałkowe (tab. 3). W przypadku lewobunololu uzyskano zwiększenie przenikania substancji leczniczej przez warstwy rogówki dzięki wprowadzeniu do fazy olejowej pary jonowej z kwasem kaprylowym [63].

W terapii okulistycznej zwraca się uwagę na możliwość uzyskania efektu przedłużonego działania. Na przykładzie mikroemulsji z pilokarpiną (izopropylu mirystynian, lecytyna, glikol propylenowy, makrogol 200) wykazano w badaniach *in vivo* efekt przedłużonego działania pomimo, że nie stwierdzono w badaniach *in vitro* przedłużonego jej uwalniania [84]. Efekt ten przypisuje się zwiększonej dostępności biologicznej pilokarpiny w formie mikroemulsji i/lub wydłużeniu czasu kontaktu z powierzchnią gałki ocznej. Krople te charakteryzowała mała lepkość, odpowiedni współczynnik refrakcji kwalifikujący formulację do celów terapii okulistycznej, a także brak działania drażniącego.

Mikroemulsja do podania dożylnego poddawana jest nie tylko ocenie jakości postaci leku, ale także kontroli *in vivo* odpowiedzi hemodynamicznej. Na przykładzie opracowanej formulacji z felodypiną o składzie: Miglyol® 810N (MCT), lecytyna sojowa (Epicuron® 200), makrogol 400, makrogolo-12-hydroksystearynian i etanol wykazano, że jej dwuciągła struktura po rozcieńczeniu uległa przemianie do układu o/w o wielkości kroplel fazy wewnętrznej w granicy od 60 do 200 nm. Po dożylny aplikacji mikroemulsji szczerom nie stwierdzono znaczącego wpływu na równowagę kwasowo-zasadową, saturację, stężenie elektrolitów w surowicy, ciśnienie krwi oraz na częstość akcji serca [39].

Natomiast w przypadku winkrystyny, po aplikacji pozajelitowo formulacji mikroemulsyjnej, wykazano w badaniach *in vivo* ponad 5-krotnie większe stężenie winkrystyny w komórkach guza histiocytarnego u myszy, przy jednocześnie około 2-krotnie niższym stężeniu substancji leczniczej

w sercu, wątrobie i śledzionie po podaniu roztworu. Uzyskano w ten sposób zwiększenie wartości pola powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC) oraz okresów półtrwania winkrystyny ( $t_{0.5}$ ) w fazie dystrybucji i eliminacji. Świadczy to o poprawie dostępności biologicznej winkrystyny z postaci mikroemulsyjnej [100]. Zadawalające wyniki uzyskano również dla innych substancji leczniczych, m. in. o działaniu cytotoksycznym (docetaksel), przeciwgrzybiczym (itakonazol, amfoterycyna B) oraz immunosupresyjnym (cyklosporyna) (tab. 3).

Do oceny jakości mikroemulsyjnych postaci leku służą nowoczesne metody analityczne m.in.: mikroskopia elektronowa, rozproszenia promieniowania oraz rozproszenia neutronów, rezonans magnetyczny, spektroskopia, reologia, elektrochemia [2].

Dzięki rozwojowi metod mikroskopii elektronowej możliwa jest bezpośrednia obserwacja struktury mikroemulsji, w tym układów dwuciągłych oraz kropelek fazy rozproszonej. W analizie obrazów stosowana jest transmisyjna (TEM) i skaningowa (SEM) mikroskopia elektronowa w celu zbadania wewnętrznych i powierzchniowych mezofaz nanostruktur. Na uwagę zasługuje modyfikacja technik mikroskopowych, polegająca na zamrożeniu próbki przy użyciu ciekłego azotu (ang. *Freeze Fracture Transmission Electron Microscopy*, FF-TEM; ang. *Freeze Fracture Scanning Electron Microscopy*, FF-SEM). Analiza przygotowanej próbki pozwala na identyfikację struktury mikroemulsji bez modyfikacji jej składu [23, 116, 123].

Techniki elastycznego rozpraszania promieni rentgenowskich (ang. *Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS) i neutronów (ang. *Small-Angle Neutron Scattering*, SANS) pod niskimi kątami są stosowane w celu określenia kształtu, wielkości cząstek oraz morfologii układów mikroemulsyjnych. Zidentyfikowano w ten sposób np. obecność kubicznych struktur w mikroemulsji typu dwuciągłego [206]. Techniki rozproszenia niskokątowego zastosowano do opracowania mikroemulsyjnych modeli strukturalnych, np.: sześciennych komórek (CRC - ang. *Cubic Random Cell Model*, model Jouffroy-Levinson-De Gennes), modelu sferycznych kropli połączonych strukturami cylindrycznymi (DOC – ang. *Disordered Open Connected Model*, model Talmon-Prager) oraz modelu Berk'a (ang. *Random Wave Model*) [21, 198, 228]. Potwierdzono także występowanie agregatów tenzydów obecnych w mieszaninach olej-woda-tenzyd [124] oraz określono naturę penetracji oleju do filmu międzyfazowego mikroemulsji [53].

Technika impulsowej spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Pulsed-Gradient Spin—Echo Nuclear Magnetic Resonance*, FT-PGSE NMR) stosowana jest do identyfikacji mikrośrodowiska układu mikroemulsyjnego,

mobilności faz, zdolności składnika do przemieszczania się w jednodornym środowisku, jak również określania typu mikroemulsji [117].

Techniki spektroskopii dielektrycznej stosuje się do oceny struktury i dynamiki przejścia fazowego układów mikroemulsyjnych. Pomiar wielkości cząstek fazy rozproszonej dokonywany jest także przy użyciu fotonowej spektroskopii korelacyjnej (PCS). Spektroskopowe techniki emisyjne posłużyły m. in. do określenia lokalizacji solubilizowanych w mikroemulsji substancji czynnych [12, 148, 187, 224].

Badanie lepkości układu mikroemulsyjnego służy określeniu typu mikroemulsji. Wykazano, że mikroemulsje zawierające struktury kuliste, charakteryzują się znacznie niższą wartością lepkości niż mikroemulsje zawierające struktury lamelarne lub cylindryczne [121, 194].

Badanie przewodnictwa elektrycznego ma na celu określenie typu fazy ciągłej w układach mikroemulsyjnych, a także określenie punktu przemiany fazowej podczas zmiany składu ilościowego lub temperatury układu [137].

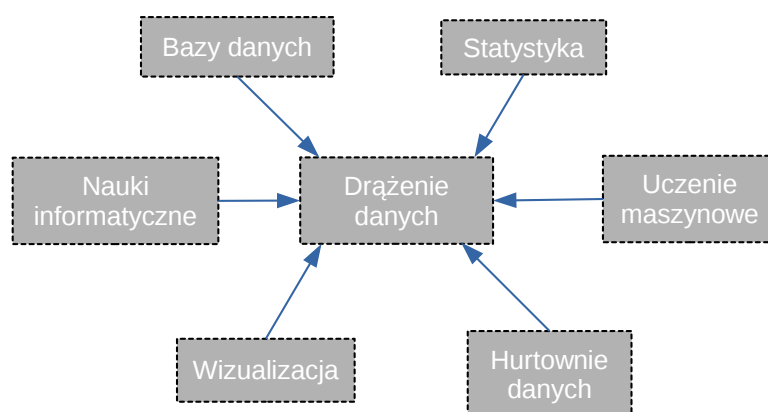




## 2. Dążenie danych - „data-mining”.

Drażenie danych (ang. *Data-Mining*), inaczej zwane też odkrywaniem wiedzy, wydobywaniem, eksploracją lub ekstrakcją danych. Technika ta integruje wiele metod obliczeniowych m. in. z zakresu statystyki, systemów baz danych, sztucznej inteligencji, optymalizacji, obliczeń równoległych i uczenia maszynowego. Idea drażenia danych (ang. *Knowledge Discovery in Databases, Database Mining*) polega na automatycznym odkrywaniu nieoczywistych, dotychczas nieznanych, zależności, związków, podobieństw, prawidłowości lub trendów nazywanych wzorcami w dużych repozytoriach danych. Ciągły wzrost technicznych możliwości gromadzenia i analizy danych umożliwia stosowanie tego typu narzędzi.

Do technik służących eksploracji danych zalicza się m. in.: wizualizację na wykresach, metody statystyczne, metody uczenia maszynowego w tym modelowanie z wykorzystaniem sztucznych sieci neuronowych, algorytmów drzew decyzyjnych, metod ewolucyjnych, logiki rozmytej, zbiorów przybliżonych (ryc. 6).



**Rycina 6.** Techniki drażenia danych.

Podział systemów eksploracji danych może być dokonany ze względu na:

- rodzaj bazy danych, np. bazy danych relacyjne, transakcyjne, obiektowe lub magazyny danych wymagają użycia systemów przestrzennych, tekstowych, rozpoznających

podobieństwa w szeregach czasowych, analizujących strumienie danych lub obrazy graficzne,

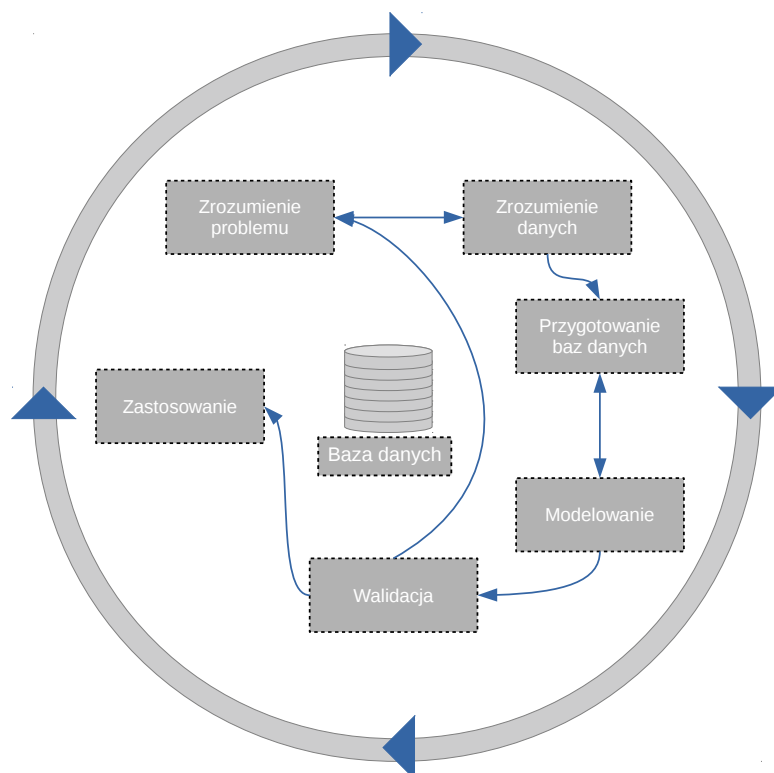
- charakter eksplorowanych danych i funkcjonalności zdobywanej wiedzy, np. analiza charakterystyki, dyskryminacji, asocjacji, korelacji, klasyfikacji, przewidywania, klasteryzacji, analiza zmian i odchyłeń, analiza ewolucji,
- użytą technikę, np. zorientowane na bazę lub magazyn danych, uczenie maszynowe, statystyka, wizualizacja, rozpoznawanie wzorców, sztuczne sieci neuronowe itd. oraz klasyfikacja ze względu na stopień ingerencji użytkownika – systemy autonomiczne, interaktywne, zapytań,
- zastosowanie, np. systemy eksploracji danych przystosowane do analizy DNA, finansów, danych telekomunikacyjnych, wiadomości e-mail itp.

W celu zapewnienia jednolitości procesu eksploracji danych wprowadzono szereg standardowych procedur postępowania. Metodyka CRISP-DM (ang. *Cross Industry Standard Process for Data Mining*) została opracowana i zastosowana przez firmy będące światowymi liderami w dziedzinie eksploracji danych tj. DaimlerChrysler, AG, SPSS, NCR, oraz OHRA. Proces eksploracji danych w metodyce CRISP-DM opisywany jest jako hierarchiczny złożony proces modelowania. Składa się z sześciu etapów: zrozumienie problemu, zrozumienie danych, przygotowanie bazy danych, modelowanie, walidacja modelu, wdrożenie [219]. Schemat metodyki CRISP-DM przedstawiono na rycinie 7.

W ramach etapu „zrozumienie problemu” przeprowadzana jest wstępna eksploracja danych, tzn. określane są cele modelowania oraz warunki przeprowadzenia eksperymentu. Podczas etapu „zrozumienia danych” określa się źródła danych, z których zostanie utworzona baza danych oraz wymagania poszczególnych procesów wdrażanych w późniejszych etapach. Ponadto w tym etapie realizowane są zadania mające na celu wydobycie istotnej domeny wiedzy, selekcji oraz łączenia danych, identyfikacji zagadnień jakościowych tj. redundancja, niekompletność, błędne lub brakujące dane oraz postawienie wstępnych hipotez lub weryfikacji założonego celu eksploracji.

Przygotowanie bazy danych obejmuje następujące zadania: wybór techniki i algorytmów uczenia, wstępną obróbkę zbiorów danych, czyli czyszczenie z informacji nadmiarowych lub

błędnych, selekcję zmiennych kluczowych, integrację i formatowanie danych oraz wprowadzanie szumów i podziału na zbiory uczące i testowe.



**Rycina 7.** Metodyka CRISP-DM. Etapy procesu eksploracji danych. Zmodyfikowane na podstawie [219].

W ramach etapu „modelowanie” stosowane są wybrane techniki drążenia danych na zbiorach wcześniej przygotowanych. Ma to na celu odkrycie wzorców w bazie danych. Podczas etapu modelowania realizowane są dwa niezależne zadania: analiza bazy danych oraz ekstrakcja i interpretacja wiedzy z bazy danych. Pierwsze zadanie związane jest z zastosowaniem trzech podstawowych metod analizy zbiorów: klasyfikacji, asocjacji i klasteryzacji.

Poszukiwanie asocjacji w bazie danych polega na odkrywaniu różnego rodzaju nieznanymi, ukrytymi zależnościami. Najczęściej metody asocjacji dotyczą odkrywania zależności pomiędzy obiektami. Miary statystyczne pozwalają na określenie przedziału ufności stawianych hipotez. Z kolei celem klasteryzacji jest poszukiwanie grup lub struktur w zbiorze klasy obiektów, które charakteryzują się pewnym podobieństwem na podstawie cech opisujących elementy.

Klasyfikacyjna metoda analizy zbiorów polega na przypisaniu obiektów do grup lub klas poprzez generalizowanie posiadanej wcześniej informacji o cechach znanych obiektów. Przykłady

metod wykorzystywanych w klasyfikacji to: naiwny klasyfikator bayesowski, drzewa decyzyjne, sieci neuronowe, reguły decyzyjne, maszyny wektorów wspierających.

Etap „walidacji modelu” obejmuje ocenę wstępnie wyselekcjonowanego modelu o najlepszej jakości, z punktu widzenia późniejszego wdrożenia. Oznacza to, że poszczególne etapy prowadzące do jego otrzymania są jeszcze raz analizowane. Określane są także zagadnienia, które podczas modelowania nie ujęto w sposób wystarczający. Proces walidacji modelu kończy decyzja o wdrożeniu modelu.

Zdobyta wiedza na podstawie analizy modelu predykcyjnego zostaje uporządkowana w kolejnym etapie „wdrożenie” tak, aby użytkownik mógł w prosty sposób z niej skorzystać. W tym celu włącza się modele predykcyjne do aplikacji komputerowych, które ułatwiają procesy podejmowania decyzji. Ponadto systemy wspomaganie decyzji są testowane w oparciu o wyniki z danych eksperymentalnych.

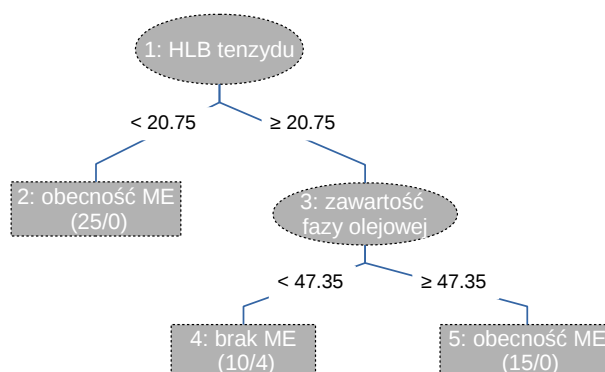
Rodzaj danych oraz późniejsze zastosowanie wyników determinuje użycie odpowiednich algorytmów i metod eksploracji danych. Ze względu na różnorodność zastosowanych technik obliczeniowych, proces eksploracji danych powinien generować dużą ilość modeli. Podczas drążenia danych mogą zostać użyte trzy typy modeli matematycznych: modele czarnej skrzynki (ang. *black-box*), do których zalicza się sztuczne sieci neuronowe, modele szarej skrzynki (ang. *grey-box*) np. sieci rozmyte, wizualizacja danych lub reprezentacja w postaci drzew decyzyjnych, oraz modele białej skrzynki, do których zaliczyć można równania matematyczne opisujące zależności w bazie danych.

## 2.1. Techniki drążenia danych, drzewa decyzyjne i sztuczne sieci neuronowe

### *Drzewa decyzyjne*

Drzewa decyzyjne są graficznym systemem wspomaganie procesu decyzyjnego powiązanego z teorią zbiorów i teorią decyzji. Metoda drzew decyzyjnych jest przydatna w rozwiązywaniu wielowymiarowych zagadnień. Analogicznie do roślin, drzewo decyzyjne składa się z korzenia, gałęzi oraz liści. Korzeń jest pierwszym rozgałęzieniem drzewa i tworzy go losowo wybrany atrybut lub zestaw atrybutów. Gałęzie odchodzące od korzenia reprezentują wartości atrybutów. Zakończone są węzłami, które stanowią dalszy podział atrybutów. Ostatnimi węzłami są

liście, w których zebrane są informacje dotyczące ilości obserwacji przewidzianego atrybutu. Przykład drzewa decyzyjnego przedstawiono na rycinie 8. Model drzewa uwzględnia dwa węzły decyzyjne (1, 3) oraz trzy węzły końcowe (3 – 5). W oparciu o analizę struktury drzewa decyzyjnego możliwe jest sformułowanie reguł logicznych w postaci „jeżeli ..., to ...”.



**Rycina 8.** Drzewo klasyfikacyjne utworzone podczas eksperymentu numerycznego.

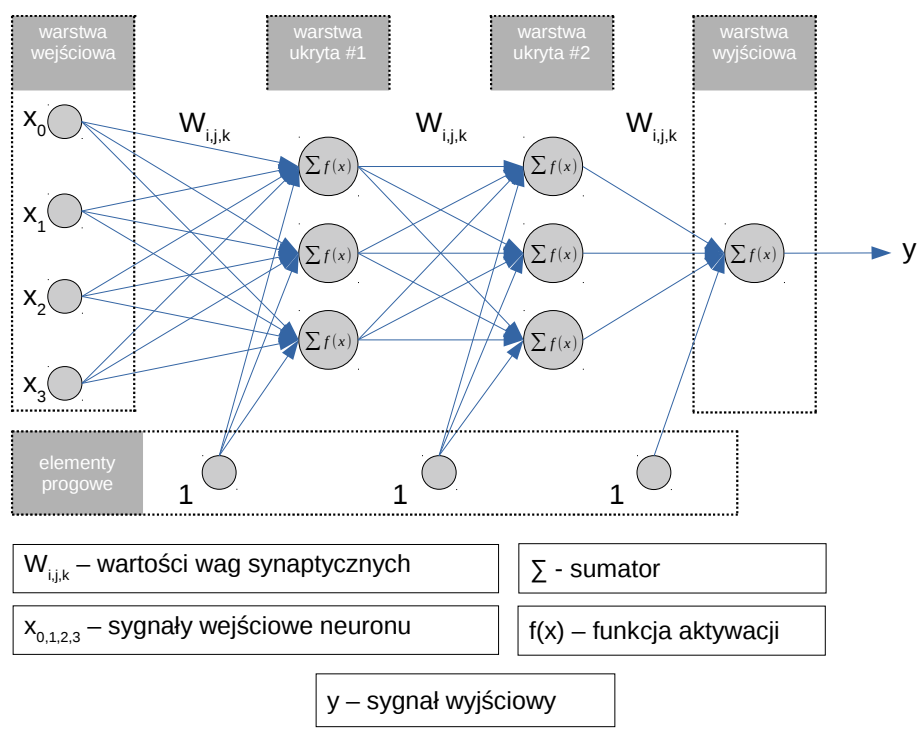
(Elipsy - węzły decyzyjne, prostokąty – węzły końcowe. ME – mikroemulsja. Ilości obserwacji oraz etykiety klasy przewidywanej z podaniem kryterium podziału zaznaczone na liniach łączących węzły)

Drzewa klasyfikacyjne są szeroko wykorzystywane w naukach stosowanych takich jak: medycyna, genetyka, botanika, psychologia, czy nauki komputerowe. Przy ich pomocy w prosty sposób można przedstawić graficznie wyniki, co ułatwia ich analizę i interpretację [210].

### Sztuczne sieci neuronowe

Sztuczne sieci neuronowe (ang. *Artificial Neural Networks*, ANNs) to matematyczne modele i algorytmy, programy komputerowe zaprojektowane w celu symulacji przetwarzania informacji w sposób analogiczny do ludzkiego mózgu [147, 150]. Sieć zbudowana jest z wielu elementów zorganizowanych w warstwy podjednostek, tzw. sztucznych neuronów lub jednostek przetwarzających połączonych ze sobą wagami (ryc. 9). Sieć gromadzi wiedzę poprzez wykrywanie wzorców oraz związków pomiędzy danymi i uczy się przez doświadczenie, a nie programowanie. Pierwszą próbę opracowania matematycznego modelu neuronu podjęli w 1943 roku McCulloch i Pitts [147]. Zbudowany przez nich neuron, podobnie jak biologiczny, posiadał wiele wejść oraz jedno wyjście. Sygnał wejściowy po przemnożeniu przez tzw. współczynniki wagowe i zsumowaniu daje na wyjściu wartość 0 (brak pobudzenia) lub 1 (pobudzenie) w zależności czy

suma jest większa od wartości progowej (funkcja aktywacji). Postać funkcji aktywacji wiążącej sygnały wejściowe neuronu z jego wyjściem determinuje typ neuronu. Sztuczne sieci neuronowe, o więcej niż jednej warstwie ukrytej, zalicza się czasami do klasyfikatorów nieliniowych.



**Rycina 9.** Trójwarstwowa sztuczna sieć neuronowa. W nazwie umieszczona jest liczba warstw ukrytych łącznie z warstwą wyjściową.

W celu użycia sztucznych sieci neuronowych o ciągłych funkcjach aktywacji, do rozwiązywania zadań klasyfikacyjnych konieczne jest zastosowanie progu decyzyjnego. Separowałby on pobudzenia komórki wyjściowej, a także przekształcenie bazy danych z rekordami lingwistycznymi do rekordów o charakterze liczbowym.

Logika rozmyta (ang. *Fuzzy-Logic*), przykład logiki wielowartościowej, jest narzędziem używanym w eksploracji danych do ekstrakcji wiedzy. Stanowi ona odrębny system logiczny, który jest ściśle powiązany z teorią zbiorów rozmytych. Logika rozmyta odrzuca wnioskowanie oparte na klasycznej logice dwuwartościowej zaproponowanej przez Arystotelesa i stanowi jej uogólnienie. Zgodnie z teorią zaproponowaną przez Zadeha [226] liczby nie są ściśle określone, jak ma to miejsce w logice klasycznej. Pomiedzy stanem 0 (fałsz), a stanem 1 (prawda) wprowadzone są wartości pośrednie, które wyrażane są jako pewne prawdopodobieństwa opisane funkcjami

przynależności. Duża prostota modelu, ze względu na operowanie regułami logicznymi, elastyczność struktury przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej skuteczności sprawiają, że systemy logiki rozmytej są łatwe w interpretacji. Ponadto zaletą zastosowania logiki rozmytej jest możliwość prowadzenia obliczeń na podstawie pojęć lingwistycznych [27, 226]. Logika rozmyta znalazła wiele zastosowań w systemach elektronicznego sterowania pojazdami, maszynami, procesach eksploracji danych lub w tworzeniu systemów eksperckich. W połączeniu z sieciami neuronowymi stanowi cenne narzędzie mające zdolność uogólniania wiedzy [150].

## 2.2. Drążenie danych w technologii postaci leku

Pod koniec XX wieku rozwój technologii komputerowych i postępująca miniaturyzacja sprzętu elektronicznego, znacznie zwiększyły możliwości obliczeniowe komputerów oraz gromadzenia i przetwarzania danych. Wzrosło zainteresowanie metodami uczenia maszynowego także w zakresie technologii postaci leku. Wyróżnić należy trzy kierunki badań: optymalizację składu formułacji zwłaszcza z substancjami trudno rozpuszczalnymi w wodzie, modyfikację procesów technologicznych w zakresie doustnych postaci leku oraz ocenę szybkości uwalniania substancji leczniczej.

Pierwsze publikacje dotyczyły zastosowania sztucznych sieci neuronowych do przewidywania szybkości uwalniania substancji leczniczych z hydrofilowych matryc zawierających pochodne celulozy. W przypadku maleinianu chlorfeniraminu dane uczące stanowiła topologiczna baza danych dla 15 formułacji z hydrofilowymi matrycowymi polimerami, tj. karboksymetylocelulozą, hydroksypropylometylocelulozą, hydroksyetylocelulozą i hydroksypropylocelulozą. Wytrenowana sieć neuronowa uczona algorytmem propagacji wstecznej przewidywała dwie zmienne wyjściowe: wykładnik równania szybkości uwalniania oraz czas, po którym uwolniło się 50% substancji leczniczej. Sprawność modelu neuronowego oceniano, porównując wyniki z klasyczną metodą RSM (ang. *Response Surface Methodology*). Znacznie niższe błędy generalizacji w przypadku sieci neuronowych, dały podstawę użycia modeli neuronowych w badaniach preformulacyjnych [6].

Modele sztucznych sieci neuronowych zastosowano do optymalizacji składu formułacji stałych rozproszeń z trzema rodzajami polimerów, sporządzonych metodą odparowania lub stapiania. Zbiór uczący został utworzony na podstawie danych eksperymentalnych dla 26

formulacji zawierających substancję leczniczą oraz jako nośnik makrogoł, poliwinylpirolidon lub hydroksypropylometylocelulozę. Zmienne wejściowe stanowiły: metoda sporządzania, ilość substancji leczniczej, parametry procesu, tj. temperaturę stapiania oraz rodzaj zastosowanego polimeru, a także indeks konektywności oraz warunki badania *in vitro* (czas). Zmienną zależną była ilość rozpuszczonego ketoprofenu ze stałych rozprożeń. Jakość modelu oceniano na podstawie pierwiastka błędu średniokwadratowego (ang. *Root Mean Squared Error*, RMSE). Opracowany model neuronowy, o błędzie generalizacji 8% (RMSE), dał podstawę skonstruowania systemu eksperckiego. Sieć neuronowa prawidłowo identyfikowała odwrotnie proporcjonalną zależność szybkości rozpuszczania substancji leczniczej od jej zawartości w stałym rozproszeniu. W eksperymencie numerycznym symulowano zastosowanie systemu eksperckiego do poszukiwania optymalnego składu stałych rozprożeń z chlorowodorkiem papaweryny. Na podstawie zadanego profilu uwalniania, system prawidłowo przewidział skład 6 z 8 formulacji [150, 155].

W zakresie zastosowania technik drążenia danych w kontekście mikroemulsyjnych postaci leku pozytywne efekty uzyskali Agatonovic i wsp. [4]. Do opracowania modelu przewidującego obszary występowania mikroemulsji na diagramach Gibbsa użyto algorytmów sieci neuronowych o radialnych funkcjach bazowych (ang. *Radial Basis Functions*, RBF). Zbiór uczący liczył 4680 rekordów i został utworzony na podstawie danych eksperymentalnych z 20 różnych trójkątów fazowych składających się z czterech rodzajów tenzydów, dwóch kotenzydów i jednego oleju. Model neuronowy, na podstawie 4 zmiennych wejściowych, tj. ilości poszczególnych składników oraz liczby HLB, identyfikował obszar mikroemulsji, ciekłego kryształu lub emulsji. Sprawność systemu oceniano na podstawie obszaru występowania mikroemulsji wyznaczonego eksperymentalnie, który pokrywał się z obszarem przewidzianym. Wyniki generalizacji wynosiły około 70% pozytywnie przewidzianego regionu występowania mikroemulsji i 96% pozytywnie przewidzianego regionu występowania emulsji. Opracowany model neuronowy posłużył do optymalizacji mikroemulsyjnej postaci leku z rifampicyną i izoniazydem. Uzyskano stabilną mikroemulsję o składzie: 21.06% woda, 23.68% Miglyol 812, 27.63% Imwitor 308, 27.63% Crillet 3 oraz rifampicynę, o stężeniu 150 mg/mL i izoniazyd 100 mg/mL, której właściwości nie zmieniły się po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 25°C.

Sieci neuronowe realizujące regresję uogólnioną (ang. *Generalized Regression Neural Network*, GRNN) zastosowano do przewidywania granicy obszaru mikroemulsji o składzie: izopropylu mirystynian, olej, kaprylokapronianu makrogoł-8, tenzyd oraz poliglicerolo-6 distearynian i hydroksystearynian makrogloglicerolu jako kotenzydy. Bazę wiedzy skonstruowaną



na podstawie prac eksperymentalnych podzielono na zbiory uczący i testowy, które zawierały odpowiednio 21 i 6 rekordów. Zmienne zależne, tj. proporcja stężenia tenzydu do kotenzydu oraz fazy olejowej do mieszaniny tenzyd/kotenzyd, stanowiły dane wejściowe. Zaletą modelu składającego się z 4 warstw ukrytych było określenie maksymalnej ilości wody, której dodatek nie powodował destabilizacji mikroemulsji. Sprawność modelu oceniona na podstawie znormalizowanego pierwiastka błędu średniokwadratowego (NRMSE) wynosiła 2% [48].

Zagadnieniami o podobnym charakterze zajmowali się Taha i wsp. [207, 208]. W oparciu o 68 formulacji wyselekcjonowanych z piśmiennictwa utworzono zbiór uczący dla narzędzi modelowania. Skład ilościowy formulacji oraz 70 deskryptorów molekularnych stanowiły dane wejściowe. Zmienną niezależną była wyrażona w procentach powierzchnia, którą zajmuje mikroemulsja w trójkącie Gibbsa. Stosując wsteczną regresję krokową uwzględniono 16 deskryptorów, które miały wpływ na poprawę jakości modelu, wśród których znalazły się m.in. deskryptory związane z ładunkiem i kształtem cząsteczek składników mikroemulsji. Końcowy model uzyskano stosując techniki eksploracji danych, tj. wieloczynnikowej regresji liniowej (ang. *Multivariate Linear Regression*, MLR) oraz programowania genetycznego (ang. *Genetic Programming*, GP). Wartości współczynnika determinacji  $R^2$  od 0.81 do 0.93 były podstawą pozytywnej oceny sprawności modeli opartych na zależnościach pomiędzy strukturą chemiczną składników mikroemulsji i właściwościami fizykochemicznymi (ang. *Quantitative Structure Property Relationships*, QSPR). Wykazano przydatność zastosowania programowania genetycznego oraz wieloczynnikowej regresji liniowej w połączeniu z technikami modelowania molekularnego do przewidywania powierzchni obszaru występowania mikroemulsji.

Jeirani i wsp. [99] przewidywali wartość napięcia powierzchniowego fazy wodnej dla mikroemulsji składającej się z polisorbatu 80, alkoholu izopropylowego i roztworu chlorku sodu. Zbiór uczący oparty na danych eksperymentalnych zawierał 20 formulacji. Stężenie składników fazy wodnej stanowiły zmienne niezależne, natomiast napięcie powierzchniowe na granicy fazy woda/n-oktan było zmienną zależną. Na podstawie czworościennej matrycy stosując technikę planowania doświadczeń (ang. *Design of Experiment*, DoE) utworzono liniowy model matematyczny. Na podstawie różnicy pomiędzy zmierzoną wartością napięcia międzyfazowego a przewidzianą przez liniowy model oceniono błąd predykcji NRMSE na poziomie 1.5%. Model zastosowano do określenia stężenia składników, których wartość napięcia powierzchniowego byłaby najmniejsza. Przewidzianą wartość napięcia powierzchniowego, 0.1435 dyn/cm, uzyskano dla mikroemulsji o składzie alkohol izopropylowy 2.43%, chlorku sodu 2.53%, polisorbata 80

1.33% i woda 93.71%, i była ona bliska wartości wyznaczonej eksperymentalnie 0.1457 dyn/cm [99].

Opracowano także matematyczny model do przewidywania maksymalnej ilości limonenu, jaką można wprowadzić do fazy wodnej o składzie: dokuzan sodu, dodekanol i roztwór chlorku sodu. Do obliczeń zastosowano założenia modelu dwuciągłego mikroemulsji zgodnego z siatką uśrednionej krzywizny (ang. *Net-Average Curvature Model*). W równaniach opisujących model uwzględniono zmienne niezależne, tj. skład ilościowy formulacji, właściwości fizykochemiczne takie jak, gęstość, krytyczne stężenie micelarne oraz deskryptory molekularne, tj. masa cząsteczkowa, powierzchnia i długość fragmentów hydro- i lipofilowych. Przy zawartości fazy olejowej mniejszej od 12%, przewidywania modelu i obserwacje eksperymentalne były zgodne. Włączenie deskryptorów molekularnych do procesu modelowania pozwoliło na określenie zależności pomiędzy wprowadzoną ilością fazy olejowej, a strukturą tenzydu. Wykazano, że zawartość oleju w mikroemulsji można zwiększyć poprzez zwiększenie nadmiaru powierzchni oraz długości łańcucha tenzydu [201].

Sztuczne sieci neuronowe stosowano również do przewidywania średnicy cząstek fazy rozproszonej mikroemulsji sporządzonych przy użyciu homogenizatora wysokociśnieniowego. Baza danych licząca 60 rekordów powstała w oparciu o charakterystykę formulacji mikroemulsji zawierających budezonid, triglicerydy średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych, polisorbat 80, etanol i roztwór chlorku sodu. Zmiennymi zależnymi były: skład ilościowy formulacji oraz ilość i szybkość dostarczania energii w procesie homogenizacji. Otrzymany model neuronowy charakteryzował się współczynnikiem  $R^2$  wynoszącym 0.89. Wykazano, że na średnicę cząstek fazy rozproszonej ma wpływ nie tylko ilość, ale także szybkość dostarczania energii podczas homogenizacji. Selekcja zmiennych kluczowych pozwoliła na stworzenie zestawu wytycznych wskazujących na optymalne warunki do otrzymania mikroemulsji o pożądanej wielkości cząstek fazy wewnętrznej [9].

W badaniach dotyczących przewidywania rozpuszczalności substancji leczniczych w samoemulgujących układach (ang. *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*, SEDDSs) zastosowano metodę wieloczynnikowej regresji liniowej i modele sztucznych sieci neuronowych. Utworzono bazę danych eksperymentalnych, która zawierała 132 rekordy dla 6 substancji leczniczych, pochodnych kwasu 2-arylopropionowego, z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Oprócz składu ilościowego, do zbioru uczącego dołączono wyliczone deskryptory molekularne

składników, tj. moment dipolowy, parametry elektrostatyczne, energię najwyżej i najniżej obsadzonego orbitala molekularnego ( $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ), logD, objętość molekularną, indeks Weiner'a. W porównaniu z modelami linowymi, w przypadku modeli neuronowych uzyskano niższy średni błąd uczenia (ang. *Mean Absolute Error*, MAE) oraz wyższą wartość współczynnika korelacji  $R^2$ , odpowiednio 1.2% i 2.3% oraz 0.993 i 0.949. Na podstawie analizy statystycznej otrzymanych modeli ustalono, że rozpuszczalność badanych związków w SEDDSs jest wprost proporcjonalna do ich lipofilowości, odwrotnie proporcjonalna do indeksu topologicznego cząsteczki i jej sumarycznego ładunku, a także zależy od momentu dipolowego, deskryptorów kwantowych i strukturalnych cząsteczki [35].

Sieci neuronowe o logice rozmytej posłużyły również do rozwiązywania problemów w zakresie prac technologicznych z zastosowaniem kompaktora walcowego. Bazę danych eksperymentalnych obejmowały 62 formułacje. Parametrami wejściowymi modelu były parametry urządzenia, tj. kąt kompresji, prędkość obrotowa, siła nacisku walców oraz właściwości fizyko-mechaniczne proszków, tj. gęstość nasypowa i po ubiciu, indeks Carra, współczynnik Hausnera. Zmienne niezależne stanowiły właściwości granulatu, tj. porowatość i gęstość. Sprawność predykcji oceniano na podstawie wartości współczynnika determinacji ( $R^2$ ), który dla opracowanego modelu, w zależności od przewidywanych właściwości granulatu, wynosił od 0.81 do 0.97. W wyniku modelowania określono zestaw reguł lingwistycznych przedstawiających zależności pomiędzy prędkością obrotową kompaktora, kątem kompresji, a właściwościami uzyskanego granulatu [144].

Techniki drążenia danych, m. in. programowanie genetyczne, sztuczne sieci neuronowe oraz wieloczynnikowa regresja liniowa zostały także zastosowane do poszukiwania czynników wpływających na średnicę mikrocząstek kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) zawierających peptydy [203] oraz ziaren granulatu uzyskanego w procesie mielenia w młynie oscylacyjnym [109]. W obydwu eksperymentach numerycznych najniższe błędy generalizacji uzyskano dla równań matematycznych, odpowiednio 5.4 i 2.3% (NRMSE). Analiza powierzchni (RSM) odpowiedzi uzyskanych równań matematycznych pozwoliła na ustalenie krytycznych parametrów wpływających na średnicę mikrocząstek PLGA oraz ziaren granulatu.

Bourquin i wsp. [24] zastosowali sztuczne sieci neuronowe do optymalizacji procesu bezpośredniego tabletkowania. Zbiór uczący dla sieci neuronowej stanowiła baza danych 205 formułacji tabletek, o składzie: mikrokrystaliczna celuloza, stearynian magnezu, karboksymetyloceluloza, krzemionka koloidalna i modelowa substancja lecznicza. Zmienne

wejściowe stanowiły: skład ilościowy masy tabletkowej, czas i siła nacisku stempla oraz twardość tabletek. Czas rozpadu, odporność na ścieralność i szybkość uwalniania substancji leczniczej były zmiennymi wyjściowymi. W badaniach zastosowano model wielowarstwowej sieci uogólnionej (ang. *Generalised Feedforward Multilayer Perceptron Network*, GFMLP). Przydatność systemu neuronowego oceniano w porównaniu z klasyczną metodą RSM. Oba modele wykazywały podobne współczynniki determinacji ( $R^2$ ) dla przewidywanych właściwości, tj. twardości tabletek i szybkości uwalniania substancji leczniczej od 0.83 do 0.98. Stwierdzono, że modele sztucznych sieci neuronowych są bardziej odporne na jakość statystycznego planowania eksperymentu w porównaniu z klasyczną metodą. Wysoka wartość współczynnika determinacji, większa od 0.9, sugeruje możliwość zastosowania sztucznych sieci neuronowych w pracach preformulacyjnych dotyczących bezpośredniego tabletkowania.

Metody programowania genetycznego, algorytmy oparte na drzewach decyzyjnych i systemach rozmytych zostały użyte do przewidywania frakcji cząstek drobnych w postaciach do podania wziewnego [167]. Utworzono zbiór uczący w oparciu o wyselekcjonowane z piśmiennictwa 91 formułacji. Zmienne niezależne modelu stanowiły: warunki badania, charakterystyka numeryczna powierzchni cząstek, deskryptory molekularne substancji leczniczej oraz topologiczne kodowanie składu formułacji. Końcowy model uzyskano stosując techniki eksploracji danych, tj. sztuczne sieci neuronowe oraz programowanie genetyczne. Uzyskane wartości NRMSE na zewnętrznym zbiorze danych na poziomie 8.6% wskazują na dobre właściwości generalizacyjne modelu. Ponadto na podstawie przeprowadzonej analizy równania matematycznego metodą RSM wskazano, że na ilość frakcji cząstek drobnych wpływ ma nie tylko zawartość substancji leczniczej oraz przepływ powietrza w impaktorze kaskadowym, ale także współczynnik skośności profilu powierzchni cząstki ( $R_{sk}$ ).

W zakresie przewidywania przez sztuczne sieci neuronowe szybkości uwalniania substancji leczniczej uzyskano pozytywne wyniki w badaniach dotyczących opracowania dwukomorowego doustnego systemu terapeutycznego (ang. *Osmotic-Controlled Release Oral Delivery System*, OROS®) typu *push-pull* z substancjami trudno rozpuszczalnymi w wodzie. Do eksploracji danych zastosowano m.in. sztuczne sieci neuronowe, serwer baz danych SQL oraz język programowania VB.NET. System ekspercki skonstruowano po przeanalizowaniu kilkuset formułacji. Część obliczeniową stanowiła sieć neuronowa przewidująca profile uwalniania substancji leczniczej. Na przykładzie famotydyliny wskazano zakres możliwości wykorzystania systemów obliczeniowych w pracach formułacyjnych. Po wprowadzeniu zadanego profilu uwalniania famotydyliny system

zapropował skład trzech formulacji, w tym ilość i rodzaj substancji pomocniczych do wytworzenia rdzenia tabletki, skład i ilość roztworu do powlekania oraz średnicę tabletki i otworu dozującego. Spośród zaproponowanych trzech formulacji jedna spełniała przyjęte wymagania dotyczące podobieństwa profilu uwalniania ( $f_2$ ) z zadany profilem [231].

Przewidywanie uwalniania substancji peptydowych z kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) również było przedmiotem prac z zakresu technik eksploracji danych [204, 227]. Zbiór uczący został utworzony na podstawie danych zebranych z piśmiennictwa dla 68 formulacji. Zmienne wejściowe stanowiły: ilość substancji leczniczej, parametry procesu, tj. metodę sporządzania, ilości użytych substancji pomocniczych, a także deskryptory molekularne substancji leczniczej oraz warunki badania szybkości uwalniania. Zmienną zależną była ilość rozpuszczonych substancji peptydowych z mikrocząstek PLGA. Jakość modelu oceniano na podstawie znormalizowanego pierwiastka błędu średniokwadratowego (NRMSE). Opracowane modele obliczeniowe uzyskane w procedurze dziesięciokrotnego wzajemnego sprawdzania charakteryzowały się NRMSE około 15%. Ponadto na podstawie analizy modeli zidentyfikowano krytyczne parametry wpływające na szybkość uwalniania substancji leczniczej z mikrocząstek PLGA, do których zaliczono: parametry procesu, tj. stosunek kwasu mlekowego do glikolowego, stężenie alkoholu poliwinylowego w fazie wewnętrznej i zewnętrznej, stopień enkapsulacji, wielkość mikrocząstek, metodę sporządzania, warunki badania, tj. pH i czas uwalniania oraz deskryptory chemiczne substancji peptydowych, tj. indeks Szegeda, punkt izoelektryczny oraz strukturę czwartorzędową.

Także inne techniki drążenia danych m.in. programowanie genetyczne zastosowano do przewidywania szybkości uwalniania substancji leczniczej ze stałych lipidowych ekstrudatów [152]. Zbiór danych został utworzony na podstawie wyników uwalniania substancji leczniczej z ekstrudatów składających się z diprofiliny, tristearyny i glikolu polioksyetylenowego 20 000. Wytrenowane sieci neuronowe zastosowano nie tylko do predykcji, ale także do wzbogacenia zbioru uczącego. Błąd generalizacji (NRMSE) uzyskanego równania matematycznego na podstawie nowego zbioru uczącego wynosił około 2%.

Oprócz przewidywania szybkości uwalniania, sztuczne sieci neuronowe zostały także użyte do oceny właściwości peletek [157], tj. czasu po jakim uwolniło się 50% substancji leczniczej i kulistości peletek. Baza danych została utworzona na podstawie danych z piśmiennictwa dla 227 formulacji peletek wytworzonych metodą ekstruzji i sferonizacji zawierających osiem modelowych

substancji leczniczych i sześć substancji pomocniczych. Każda formuacja była scharakteryzowana poprzez deskryptory molekularne dla substancji leczniczej i pomocniczej, a także parametry procesu ekstruzji i sferonizacji takie jak prędkość obrotowa ekstrudera, ilość otworów w tarczy, prędkość obrotowa traczy sferonizatora i czas sferonizacji oraz czas i temperatura suszenia peletek, a także ilości użytych substancji pomocniczych. Opracowany model sztucznych sieci neuronowych charakteryzował się dobrą zdolnością generalizacji dla kulistości i czasu po jakim uwolniło się 50% substancji leczniczej, odpowiednio 9.5% i 8% (NRMSE).

Prowadzono także badania nad utworzeniem modelu korelacji *in vitro* - *in vivo* przy użyciu sieci neuronowo-rozmytych. Zbiór uczący utworzono na podstawie wyników eksperymentalnych uwalniania probukolu z dwóch formuacji, tj. samonanoemulgujących (ang. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems*, SNEDDS) i roztworu olejowego oraz parametrów dostępności biologicznej. Formuacja samomikroemulgująca (ang. *Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems*, SMEDDS) posłużyła do walidacji modelu. Otrzymany model składał się z czterech modułów, tzw. asocjacji, które przetwarzały wejścia, wartości rozpuszczonego probukolu, na wyjścia, tj. stężenie probukolu w surowicy świni. W badaniach *in vitro* zastosowano model dynamicznej lipolizy w celu określenia ilości uwolnionego probukolu z układów. Uzyskano zadowalającą wartość współczynnika korelacji 0.91 dla zbioru walidacyjnego. Zwrócono uwagę na konieczność poszerzenia bazy danych i wektora wejściowego np. o skład ilościowy formuacji, aby model posiadał większe zdolności generalizacyjne i mógł posłużyć do optymalizacji składu formuacji na podstawie zadanych właściwości farmakokinetycznych [59].

## II. Cel i założenia pracy.

Narzędzia obliczeniowe takie jak uczenie maszynowe i techniki modelowania matematycznego są coraz szerzej stosowane w naukach farmaceutycznych w zakresie technologii farmaceutycznej m.in. w celu opracowania i doboru parametrów technologicznych wytwarzania postaci leku i jej optymalizacji. Obecnie opracowane systemy są dostosowane do wąskiej przestrzeni eksperymentalnej, co nie pozwala na uzyskanie zadowalających możliwości generalizacyjnych utworzonych modeli.

Rozwiązaniem powyższego problemu jest zebranie reprezentatywnej dla opracowywanego zagadnienia bazy danych, jej przetworzenie i akwizycja zawartej w niej wiedzy oraz konstrukcja oprogramowania do wspomagania procesu formulacji, tzw. systemu wspomagania decyzji.

Celem pracy była ocena przydatności systemu wspomagania decyzji w projektowaniu mikroemulsyjnych postaci leku poprzez zastosowanie technik drążenia danych do utworzenia modeli wchodzących w skład systemu eksperckiego oraz weryfikacji w zakresie prac eksperymentalnych.

Cel pracy realizowano w oparciu o następujące cele cząstkowe:

- zaprojektowanie bazy danych do zastosowania tzw. technik drążenia danych,
- modelowanie heurystyczne, w tym, modelowanie z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych oraz modelowanie z zastosowaniem innych technik drążenia danych ze szczególnym uwzględnieniem klasyfikatorów drzew decyzyjnych: *RandomForest*, *SVM*, *ADABOOST*, *ADTree*, *J48*, *IBk*, *KStar*, *VotedPerceptron*, *RotationForest*, *DecisionStump*, *FTree*, *J48graft*, *LADTree*, *LTM*, *NBTree*, *REPTree*, *SimpleCart*,
- ekstrakcja reguł logicznych z sieci rozmytych i zastosowanie klasyfikatorów drzew decyzyjnych do ich agregacji,
- przygotowanie maszyny wnioskującej systemu wspomagania decyzji,
- napisanie aplikacji komputerowej z interfejsem graficznym scalającej wybrane modele,

- weryfikację systemu wspomagania decyzji, poprzez wykonanie i ocenę właściwości fizykochemicznych mikroemulsji sporządzonych na podstawie wyników prac obliczeniowych.

Opracowanie systemu wspomagania decyzji znajduje uzasadnienie w kontekście prac formułacyjnych w celu maksymalizacji prawdopodobieństwa otrzymania mikroemulsji przy minimalizacji nakładów eksperymentalnych. W założeniu system ma wspomagać proces opracowywania nowych formułacji, szczególnie w przypadku, gdy substancja pomocnicza nie została wcześniej zbadana pod kątem zdolności do tworzenia mikroemulsji [151].

W związku z powyższym przyjęto następujące założenia badawcze:

- zastosowane narzędzia eksploracji danych pozwolą na przetworzenie dużej ilości danych dotyczących składu ilościowego i jakościowego mikroemulsji oraz wybór optymalnych architektur do systemu wspomagania decyzji,
- wprowadzenie deskryptorów chemicznych do opisu składu formułacji umożliwi przewidywanie obszaru występowania mikroemulsji dla składników, które nie były wcześniej prezentowane systemowi w procesie uczenia,
- wybór odpowiedniego narzędzia programistycznego pozwoli na stworzenie aplikacji komputerowej integrującej wybrane modele obliczeniowe w tzw. system wspomagania decyzji,
- przygotowanie procedur numerycznych i doświadczalnych w celu walidacji systemu wspomagania decyzji,
- zaprojektowanie prac doświadczalnych w celu wytypowania za pomocą ME\_DSS mikroemulsji spełniających wymagania dla ww. postaci leku.

Sformułowane założenia badawcze realizowano w oparciu o przedstawioną w rozdziale III metodykę badań.



### III. Metodyka badań.

#### 1. Substancje, materiały i aparatura, oprogramowanie.

##### 1.1. Substancje.

- Ibuprofen - Shasun Chemicals and Drugs Ltd., *Indie*,
- Brij<sup>®</sup> 96 (Brij<sup>®</sup> 97, Brij<sup>®</sup> O10) - Fluka / Croda, *Szwajcaria / Wielka Brytania*,
- Capmul<sup>®</sup> MCM - Abitec Corporation, *Stany Zjednoczone*,
- Cytrynian trietylu – AppliChem, *Niemcy*,
- Izopropylu mirystynian – Cognis, *Niemcy*,
- Kwas ortofosforowy (V) - POCh Gliwice, *Polska*,
- Labrasol<sup>®</sup> - Gattefosse, *Francja*,
- Laurylosiarczan sodu - POCh Gliwice / Sigma-Aldrich, *Polska / Stany Zjednoczone*,
- Makrogol 400 - Sigma-Aldrich, *Stany Zjednoczone*,
- Metanol do chromatografii HPLC - POCh Gliwice, *Polska*,
- Miglyol<sup>®</sup> 812N - Caesar & Loretz GmbH, *Niemcy*,
- Propylenowy glikol - Sigma-Aldrich, *Stany Zjednoczone*,
- Tween<sup>®</sup> 80 - POCh Gliwice / Croda, *Polska / Wielka Brytania*,
- Wodorotlenek sodu - POCh Gliwice, *Polska*.

##### 1.2. Materiały.

- Bibuła filtracyjna,
- Filtry „strzykawkowe” o średnicy porów 0.22µm Millex<sup>®</sup> -GS – Merck Millipore, *Stany Zjednoczone*,

- Filtry membranowe o średnicy porów 0.22  $\mu\text{m}$  z octanu celulozy - Sartorius AG, Goettingen, Niemcy,
- Filtry membranowe Porafil<sup>®</sup>-TE o średnicy porów 0.22  $\mu\text{m}$  z politetrafluoroetyleny - Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Niemcy,
- Fiolki chromatograficzne, zakręcane, przezroczyste 1.5 mL – Agilent Technologies, Stany Zjednoczone,
- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem RP phenomenex<sup>®</sup>Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C-18 – Phenomenex, Stany Zjednoczone,
- Sprzęt jednorazowego użytku (końcówki do pipetowania, strzykawki i igły jednorazowego użytku, rękawice lateksowe).

### 1.3. Aparatura.

- Aparat do pomiaru wielkości cząstek fazy rozproszonej metodą fotonowej spektroskopii korelacyjnej Malvern Zeta Sizer Nano ZS z automatycznym titratorem - Multi Purpose Titrator MPT 2, Marvern, Wielka Brytania,
- Komory klimatyczne HPP 110 Memmert, Büchenbach, Niemcy,
- Konduktometr mikrokomputerowy CC-551 Elmetron, Zabrze, Polska,
- Mieszadło magnetyczne MS-15HS Wigo, Pruszków, Polska,
- pH-metr mikrokomputerowy CPC-505 Elmetron, Zabrze, Polska,
- Refraktometr Abbego model PZO RL-1, Warszawa, Polska,
- Spektrofotometr UV-1800 UV-VIS Shimadzu, Kioto, Japonia,
- Tensjometr Krüss GmbH, Hamburg, Niemcy,
- Waga analityczna MS105DU/M, Mettler Toledo, Stany Zjednoczone,
- Waga laboratoryjna AJ-420, Vibra, Japonia,
- Wirówka laboratoryjna MPW 221, Mechanika Precyzyjna, Warszawa, Polska,

- Wiskozymetr Haake VT 550 Thermoscientific, Waltham, USA,
- Wysokorozdzielczy skaningowy mikroskop elektronowy z działem polowym 7600F, wyposażony w mikrosondę rentgenowską i przystawkę „Cryo-SEM”, JEOL (FE-SEM), Tokio, Japonia,
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, USA,
- Wyrząsarka IKA KS 130 basic, Staufen im Breisgau, Niemcy.

#### 1.4. Oprogramowanie.

- *Nets2010*,
- *WEKA (v3.6)*,
- *Phase\_diagr*,
- *Marvin*, moduły *MarvinSketch*, *molconv*, *cxcalc (v2.9)*,
- *Learn\_conv*,
- *Erase\_0*,
- *Preproc*,
- *Eddan3*,
- *Classif\_compute*,
- *ImageJ (v1.47)*,
- *NetBeans (v6.8)*.

Wszystkie obliczenia wykonano w komputerach klasy PC wyposażonych w system Linux, procesory Xeon lub równoważne i co najmniej 8GB pamięci RAM. Komputery były połączone ze sobą przy użyciu sieci lokalnej.



## 2. Charakterystyka oprogramowania użytego w procesie eksploracji danych.

W modelowaniu sztucznych sieci neuronowych zastosowano program *Nets2010* [149] napisany w języku programowania *Object Pascal* środowiska programistycznego *Lazarus*. Program *Nets2010* służy do testowania i analizy sztucznych sieci neuronowych w komputerze klasy PC. System *Nets2010* został przystosowany do przetwarzania bardzo dużych zbiorów danych zawierających miliony rekordów przy wektorze wejściowym składającym się z tysięcy zmiennych. Wbudowana funkcja eksportu architektury sieci do formatu rozumianego przez kompilator języka Java (funkcja „Export to Java”) ułatwia dalsze przetwarzanie otrzymanego modelu. Program *Nets2010* umożliwia wykonanie analizy wrażliwościowej dla sieci typu wielowarstwowego perceptronu (ang. *Multilayer Perceptron*, MLP) oraz wyboru metody defuzyfikacji dla sieci neuronowo-rozmytych i eksport ekstrahowanych z nich reguł do pliku tekstowego (funkcja „Export ANN structure”). W celu zdefiniowania architektury sieci neuronowej i parametrów jej uczenia użyto interfejsu graficznego programu. Natomiast pracę w trybie wsadowym, czyli bez ingerencji użytkownika do treningu i analizowania zestawów sieci. W celu rozpraszania obliczeń zastosowano program *Xdissolve*, który jest rozszerzeniem do programu *Nets2010*. Pozwoliło to na automatyzację tworzenia zadań dla jednostek obliczeniowych pracujących w systemie sieciowym.

Ponadto opcje programu *Nets2010* umożliwiają wybranie:

- typu sieci – perceptron wielowarstwow (MLP), sieć z kontrapropagacją (CP) lub sieć rozmyta (NF),
- algorytmu uczenia – propagacja wsteczna (BP) z modyfikacjami takimi jak: technika momentu, zanikające współczynniki uczenia, algorytm delta-bar-delta; algorytm Kohonena, warstwy kontekstu, sieci hybrydowe, gaz neuronowy,
- architektury sieci – liczba komórek wejściowych i wyjściowych, liczba warstw ukrytych (maksymalnie 9) i budujących je komórek (do 99999 komórek w warstwie),
- ilości iteracji, wartość epoki,
- parametrów uczenia i funkcję aktywacji – sigma, alfa, funkcja sigmoidalna,  $a \cdot x$ ,  $a/x$ ,  $\ln(|x|)$ ,  $\sin(x)$ ,  $\cos(x)$ ,  $\tanh(x)$ , funkcja *fsr* wg Bilskiego [22]; istnieje możliwość zdefiniowania indywidualnych parametrów dla każdej warstwy,

- funkcji kosztu – funkcja kwadratowa, logarytmiczna lub funkcja Hampela [166].

*WEKA* [83] (ang. *Waikato Environment for Knowledge Analysis*) to projekt wolnego oprogramowania (ang. *Open-Source*) zaimplementowany w języku programowania Java mający na celu zbudowanie środowiska ułatwiającego pracę z algorytmami uczenia maszynowego do rozwiązywania problemów eksploracji danych. Ekran z głównym menu, podzielony jest na kilka modułów:

- Explorer - główny moduł oferujący dostęp do najważniejszych funkcjonalności, posiada szereg rozwiązań ułatwiających użytkownikowi przeprowadzenie analiz (łatwa konfiguracja parametrów, kontrola kolejności wykonywania analiz, parametry domyślne, podpowiedzi kontekstowe),
- Simple CLI – interfejs tekstowy (ang. *Command Line Interface*, CLI), dostęp do funkcjonalności systemu poprzez wpisywanie komend tekstowych,
- Experimenter – zaprojektowany, aby umożliwić przeanalizowanie, która metoda (np. klasyfikacji lub regresji) i jaki zestaw parametrów jest najlepszy dla naszego problemu, w module zastosowano rozwiązania umożliwiające przeprowadzanie złożonych eksperymentów obliczeniowych na wielką skalę,
- KnowledgeFlow - interfejs graficzny, pozwalający zaprojektować schemat potokowego przetwarzania danych, wykorzystując technikę „przeciągnij i upuść” (ang. „*drag-and-drop*”) możemy łatwo łączyć bloki reprezentujące poszczególne etapy analizy.

Do zalet środowiska *WEKA* należy zaliczyć: obszerny zestaw narzędzi do przetwarzania wstępnego danych (ang. *Preprocessing*), algorytmy uczenia maszynowego i metody oceniające ich efektywność, przyjazny graficzny interfejs użytkownika, w tym, narzędzia do wizualizacji danych oraz wygodne środowisko do porównania efektywności algorytmów.

Program *Phase\_diagr* posłużył do skanowania plików graficznych trójkątów Gibbsa pod kątem koloru pikseli: czarny – występuje mikroemulsja, biały – brak mikroemulsji. Po przeliczeniu współrzędnych prostokątnych pliku graficznego na współrzędne w trójkącie fazowym Gibbsa opisującym skład mikroemulsji eksportuje się je do pliku tekstowego, co umożliwia dalszą ich obróbkę. W wyniku skanowania w pliku tekstowym zapisywane są trzy współrzędne (faza olejowa / tenzyd / faza wodna) danego punktu trójkąta Gibbsa oraz 0 lub 1 w zależności czy dany skład ilościowy odpowiada mikroemulsji, czy też nie.

Obliczenia deskryptorów molekularnych wykonano przy użyciu programu *Marvin* firmy ChemAxon [146]. Jest to zestaw narzędzi umożliwiający rysowanie modeli związków chemicznych (moduł *MarvinSketch*), projekcji ich struktury w przestrzeni (moduł *MarvinView* i *MarvinSpace*) oraz predykcji podstawowych parametrów fizykochemicznych i deskryptorów chemicznych cząsteczek (moduł *cxcalc*) [41]. Ponadto moduł *molconv* pozwala na szybką optymalizację struktury pod względem minimalizacji energii cząsteczki.

Podczas przygotowywania bazy danych i przekształcania sygnału wyjściowego sieci neuronowych użyto następujących programów:

- *Learn\_conv* posłużył do generowania par zbiorów testowy-uczący; pliki uczące i testowe wybierane są z plików tekstowych opisujących poszczególne formułacje w sposób losowy lub sekwencyjny,
- *Erase\_0* zastosowano w celu usunięcia kolumny zmiennych, których wartości są stałe – dane te są zbędne, a ponadto przeszkadzają w procedurze skalowania używanej w Nets2010;
- *Preproc* użyto do wstępnego przetwarzania rekordów danych tj. normalizacji za pomocą normy euklidesowej, równoważenia klas, binaryzacji,
- *Eddan3* zastosowano do wstępnej obróbki danych tj. multiplikacji rekordów z nakładaniem szumu o zadanej amplitudzie i znaku,
- *Classif\_compute* zastosowano w celu obliczenia błędu klasyfikatorów.

Użyto także języka powłoki *bash* do napisania skryptów. Miało to na celu automatyzację operacji na plikach tekstowych oraz uruchamiania programów z poziomu linii komend. Obróbkę bazy danych wykonano przy użyciu arkusza kalkulacyjnego *Calc* pakietu biurowego *LibreOffice* 2012-2014, wersja 3.4 – 4.2. Z kolei analizę obrazu z mikroskopu skaningowego przeprowadzono przy użyciu programu *ImageJ* [1].





### 3. Eksploracja danych.

#### 3.1. Przygotowanie maszyny wnioskującej.

Baza danych została sporządzona na podstawie wyników badań realizowanych w Katedrze oraz na podstawie danych z piśmiennictwa (tab. 6). Przegląd piśmiennictwa został wykonany pod kątem możliwości zdigitalizowania danych dotyczących składników mikroemulsji w bazie danych PubMed®, SCOPUS® oraz ScienceDirect®.

Przy użyciu programu *Phase\_diagr* obróbce cyfrowej poddano trójkąty fazowe Gibbsa [150]. W celu lepszej identyfikacji granic regionu mikroemulsji użyto skanowania z kompresją 50 i algorytmem *Intelliscan*. Do zbioru danych włączono formułacje mikroemulsji trój- i czteroskładnikowych zawierające tenzyd (T), kotenzyd (KT), fazę olejową (O), fazę wodną (W) oraz tenzyd pomocniczy (TP).

W wyniku skanowania otrzymano pliki tekstowe, zawierające trzy współrzędne punktu w trójkącie Gibbsa odpowiadające zawartości poszczególnych składników mieszaniny oraz binarną informację o obecności lub braku mikroemulsji.

Dane dotyczące składu ilościowego mikroemulsji wzbogacono o deskryptory molekularne poszczególnych składników. W tym celu, każdej substancji pomocniczej przyporządkowano chemiczny wzór strukturalny. W przypadku substancji, które stanowiły mieszaninę związków chemicznych, deskryptory obliczano jako średnią ważoną na podstawie procentowej zawartości składników w mieszaninie wg równania (9):

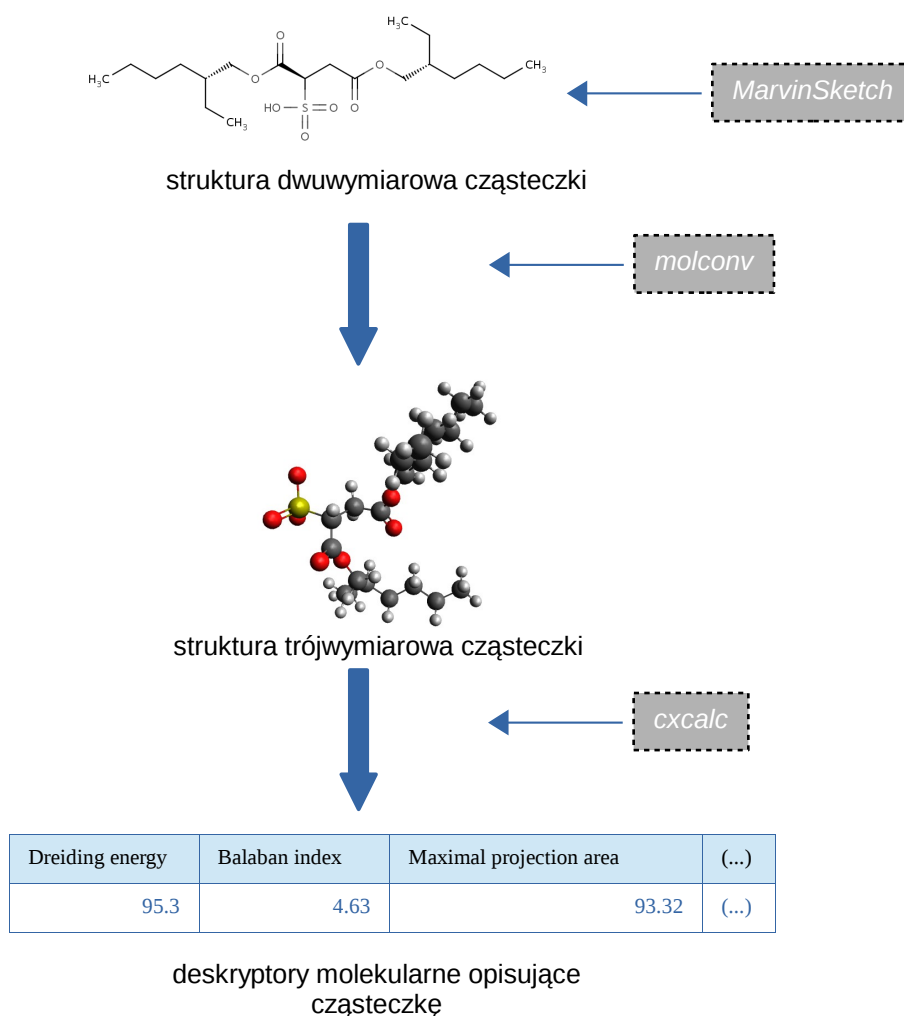
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot d_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (9)$$

gdzie:

$w_i$  – procentowa zawartość składnika,

$d_i$  – wartość deskryptora,

$\bar{x}$  - średnia ważona deskryptora.



**Rycina 10.** Schemat otrzymywania deskryptorów przy pomocy programu *Marvin*.

Płaskie wzory strukturalne, poddano optymalizacji przestrzennej, przy użyciu narzędzia *molconv* [158]. Konformer o najniższej energii stanowił strukturę gotową do przeprowadzenia obliczeń deskryptorów molekularnych, które zostały wyliczone przy użyciu narzędzia *cxcalc* [41]. W celu automatyzacji wyżej wymienionych procedur napisano skrypt w powłoce systemowej *bash*. Schemat metodyki przyjętej podczas wyliczania deskryptorów przy użyciu programu *Marvin* przedstawiono na rycinie 10. Komendy wsadowe użyte w programie *cxcalc*, które warunkowały ilość otrzymanych deskryptorów przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5.** Lista komend zastosowanych w programie *cxcalc* warunkująca ilość i jakość otrzymanych deskryptorów cząsteczkowych.

Grupa deskryptorów	Komendy <i>cxcalc</i>	Grupa deskryptorów	Komendy <i>cxcalc</i>
Analiza elementarna	formula topologyanalysisstable composition icomposition mass	Ładunek	avgpol axxpol ayypol azzpol
Konformacja	hasvalidconformer	Wyliczenia Markush'a	enumerationcount
Izomery	doublebondstereoisomercount resonantcount	Współczynnik podziału	logd logg
Geometryczna	asa psa asymmetricatomcount balabanindex bondcount chiralcentercount connectedgraph cyclomaticnumber dreidingenergy fragmentcount hararyindex hyperwienerindex maximalprojectionarea maximalprojectionradius minimalprojectionarea minimalprojectionradius molecularsurfacearea plattindex randicindex szegedindex wienerindex wienerpolarity	Inne	pi pka acceptorcount donorcount msacc msdon refractivity

### *Wstępne przetwarzanie danych.*

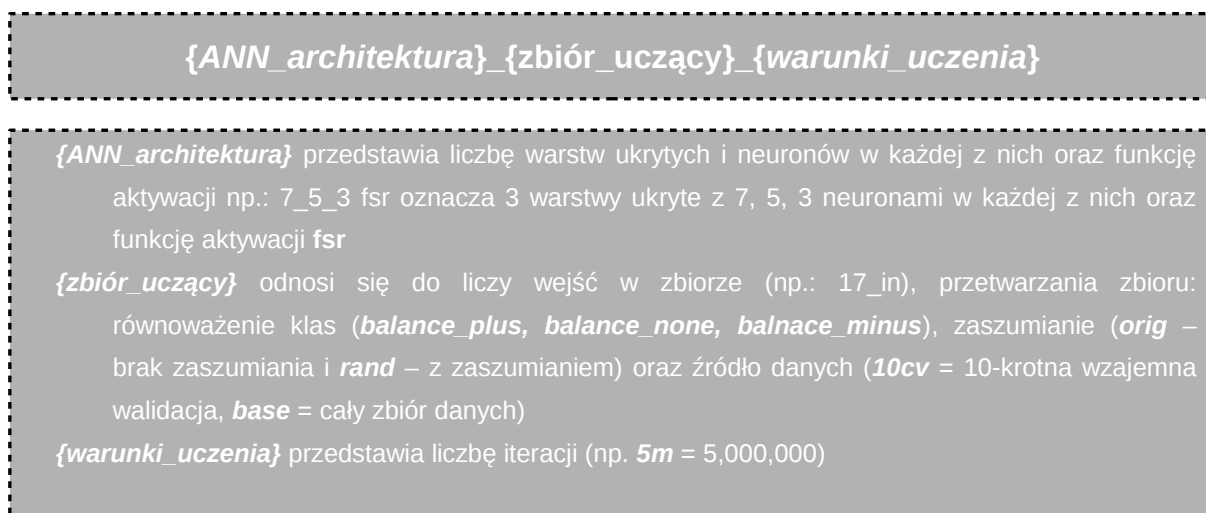
Otrzymany poprzez akwizycję danych zbiór został podzielony na podzbiory uczące i testowe zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania (zbiory „10cv”) przy użyciu programu *Learn\_conv* (zbiory „orig”). Procedura ta polega na 10-krotnym wyłączeniu z podzbioru uczącego 10% formułacji i utworzeniu podzbioru testowego. Ma to na celu zwiększenie wiarygodności otrzymanych wyników, ponieważ każdy z dziesięciu modeli dla jednej architektury trenowany jest na podzbiorze uczącym, a jego wiarygodność sprawdzana jest na podstawie ewaluacji danych na zbiorze testowym. Całe trójkąty fazowe były przydzielane losowo, bez zwracania do podzbiorów uczących i testowych.

W celu poprawy zdolności generalizacyjnych modeli utworzono dodatkowe pary zbiorów uczących i testowych, wprowadzając szum o amplitudzie  $\pm 5\%$  i dwukrotnie większą liczbą rekordów (zbiory „rand5x2”). Procedurę przeprowadzono przy pomocy programu *Eddan3*. Aby dostosować dane do dziedziny funkcji aktywacji sieci neuronowych w przypadku tych modeli, zastosowano liniowe skalowanie w przedziałach  $<0.2 ; 0.8>$  i  $<-0.8 ; 0.8>$  (zbiory „scale”).

Dla zbioru danych o zredukowanej liczbie wejść ujednolicono rozkład dystrybucji liczebności poszczególnych klas. Stosując program *Preproc*, utworzono zbiory o zrównoważonej liczebności klasy '1' (obecność mikroemulsji), które oznaczono jako „balance\_plus” lub o zmniejszonej liczebności klasy '0' (brak mikroemulsji), które oznaczono jako „balance\_minus”.

Wstępne przetwarzanie bazy danych polegało także na usunięciu ze wszystkich zbiorów kolumn o wartościach stałych lub równych zero przy użyciu programu *Erase\_0*.

Powyższe procedury miały na celu jak najlepsze odwzorowanie warunków uczenia zbliżonych rzeczywistym, tak aby uzyskać najlepszy model dla przyszłego zastosowania w systemie wspomagania decyzji przewidującego występowanie obszarów mikroemulsji dla nieznanymi składników formułacji. Notację wykorzystaną przy opisywaniu architektur sztucznych sieci neuronowych przedstawiono na rycinie 11.



**Rycina 11.** Notacja wykorzystana przy opisywaniu architektur sztucznych sieci neuronowych.

### *Redukcja wektora wejściowego – analiza wrażliwościowa.*

Próba utworzenia dużej liczby modeli na pełnym zbiorze danych byłaby nieefektywna i czasochłonna. Ponadto duża ilość atrybutów (zmiennych) w bazie była skorelowana ze sobą i miała charakter nadmiarowy, przez co mogła zwiększać błąd generalizacji. Dlatego przeprowadzono redukcję wymiarowości wektora wejściowego, której celem było wyodrębnienie podzbioru zmiennych do otrzymania optymalnego modelu sztucznych sieci neuronowych. W pracach obliczeniowych zastosowano metodykę, która wykorzystuje modele sztucznych sieci neuronowych do określenia względnego wpływu każdej zmiennej na jakość modelu [204]. Na podstawie analizy wyników przeprowadzono redukcję wektora wejściowego i selekcję zmiennych kluczowych. W pierwszym etapie analizy wrażliwościowej wytrenowano zestaw 189 architektur sieci wielowarstwowego perceptronu (*MLP*) z algorytmem wstecznej propagacji (*BP*) i czterema funkcjami aktywacji: liniową (*lin*), tangensem hiperbolicznym (*tanh*), sigmoidalną (*sigma*) oraz funkcją *fsr*, zaproponowaną przez Bilskiego i wsp. [22]. Architektury sieci *MLP* składały się z 1 do 6 warstw ukrytych, a każda z warstw zawierała od 2 do 200 neuronów. Kryterium cierpliwości techniki „*jog-of-weights*” ustawiono na 100 000 iteracji. Wybrano dwa punkty końcowe uczenia sieci 5 000 000 i 10 000 000 iteracji. Modele do przeprowadzenia analizy wrażliwościowej zostały wybrane na podstawie zależności czułości systemu od jego specyficzności, którym dla klasyfikatorów binarnych jest AUROC (ang. *Area Under Receiver Operator Curve*), pole

powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca. Kryterium włączenia modeli sieci do analizy wrażliwościowej określono zgodnie z równaniem 10:

$$AUROC_{in} < 90\% \cdot AUROC_{maks} \quad (10)$$

gdzie:

$AUROC_{in}$  – wartość AUROC, powyżej której włączano modele do analizy wrażliwościowej,

$AUROC_{maks}$  – maksymalna wartość AUROC otrzymana w procesie uczenia.

Selekcję zmiennych przeprowadzono na podstawie analizy kumulacyjnych wartości wrażliwości. Kryterium wyboru punktu odcięcia stanowił spadek wrażliwości kolejnej zmiennej w porównaniu z poprzednią większy niż 5%.

#### *Modelowanie - sztuczne sieci neuronowe.*

W procesie modelowania z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych użyto 5-ciu zbiorów danych o zredukowanym wektorze wejściowym i podzielonych zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania („10cv”): z dodatkowym szumem („rand”), skalowanych („scale”), z równoważonymi klasami („orig\_balance\_plus”, „orig\_balance\_minus”) i oryginalnych („orig”).

Modelowanie neuronowe było prowadzone przy użyciu symulatora sztucznych sieci neuronowych *Nets2010*. Podczas modelowania neuronowego zostały wykorzystane sieci typu wielowarstwowego perceptronu (*MLP*) ze wsteczną propagacją jako algorytmem uczenia (*BP*) oraz z techniką momentu i algorytmem delta-bar-delta, a także systemy logiki rozmytej (ang. *Neuro-Fuzzy*, sieci neuronowo-rozmyte, *NFs*) [157].

Podobnie, jak podczas uzyskiwania modeli służących do analizy wrażliwościowej, tak i w przypadku otrzymywania modeli neuronowych, sieci *MLP* zawierały od 1 do 6 warstw ukrytych i od 2 do 200 neuronów, natomiast sieci *NFs* miały tylko jedną warstwę ukrytą i 5 do 100 neuronów. Kryterium cierpliwości, zapobiegające zablokowaniu się sieci w minimum lokalnym ustawiono na

100 000 iteracji. Wszystkie komórki w danej sieci posiadały zawsze tę samą funkcję aktywacji. Komórki w przylegających warstwach były połączone na zasadzie „każdy z każdym”. Funkcja kosztu była zawsze funkcją kwadratową. Wykorzystane zostały cztery funkcje aktywacji: liniowa (*lin*), tangens hiperboliczny (*tanh*), sigmoidalna (*sigma*) oraz funkcja *fsr* [22].

Systemy rozmyte miały najprostszą architekturę, opracowaną przez Mamdaniego [186], z liniową funkcją aktywacji i tzw. *MISO*, czyli „wiele wejść, jedno wyjście”. Ustalono metodę defuzyfikacji jako *M-SLIDE*, a regułem nadawano wartości na podstawie losowo wybranych rekordów danych.

Wybrano cztery punkty końcowe uczenia na poziomie 1 000 000, 5 000 000, 10 000 000 i 20 000 000 iteracji. Tak duża liczba iteracji wynikała z ustawienia epoki uczenia, czyli powtórzenia iteracyjnej procedury uczenia, na 1. Dla przykładu, gdy epoka uczenia wynosi 1 i baza danych zawiera około 300 000 rekordów, a próg końcowy uczenia ustawiony jest na 1 000 000 iteracji, pojedyncza sieć może 3-krotnie korzystać z tych samych wektorów wejściowych podczas uczenia.

Kontrolę procesu uczenia sieci prowadzono na podstawie wartości pierwiastka błędu średniokwadratowego, RMSE (ang. *Root Mean Squared Error*), którą obliczano wg równania (11):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_i - m_o)^2}{n}} \quad (11)$$

gdzie:

$m_i$  - wartość wyjściowa sieci,

$m_o$  - wartość oczekiwana,

$n$  - ilość rekordów zbioru testowego.

Ponieważ wyjście sieci neuronowych, ze względu na użycie ciągłych funkcji aktywacji, uzyskiwało wartości liczb rzeczywistych, dlatego konieczne stało się określenie progu decyzyjnego. W tym celu wyniki uzyskiwane przez sieci poddano analizie klasyfikacyjnej przy użyciu programu *Classif\_compute*, który automatycznie dobierał próg decyzyjny, na podstawie maksimum wartości AUROC, co pozwoliło na ostateczną ocenę jakości modeli sieci neuronowych.

Po wyselekcjonowaniu najlepszych sieci neuronowych, w celu sprawdzenia odporności na przypadkowość uczenia sieci, zastosowano technikę „multi-startu”. Polega ona na wielokrotnej, losowej inicjalizacji tej samej sieci neuronowej. Powstałe w ten sposób modele neuronowe różnią się punktem początkowym procesu uczenia. Zastosowano 10-krotny „multi-start” na jednej parze zbiorów danych uczący-testowy z użyciem wybranych modeli neuronowych [204, 227].

Łącznie przygotowano około 60 tysięcy modeli, z których wyselekcjonowano optymalne narzędzia przewidywania obszaru występowania mikroemulsji.

### *Modelowanie - algorytmy klasyfikacji*

Podczas procesu eksploracji danych, na zbiorze o zredukowanej liczbie wejść, zostały wytrenowane i przetestowane także algorytmy drzew decyzyjnych: *J48*, *ADTree*, *RotationForest*, *RandomForest*, *ADTree*, *J48*, *FTree*, *J48graft*, *LADTree*, *NBTree*, *REPTree*, pamięciowy klasyfikator minimalno-odległościowy – *IBk*, klasyfikator ze wzmacnianiem - *ADABOOST*, metody wektorów nośnych - *SVM*, klasyfikator głosującego perceptronu – *VotedPerceptron* oraz inne klasyfikatory tj. *KStar*, *DecisionStump*, *LTM*, *SimpleCart*.

Klasyfikatory drzew decyzyjnych tj. *J48*, *ADTree*, *RotationForest*, *RandomForest* opierają się na analizie zbiorów, gdzie każdy przykład jest opisany przez zestaw atrybutów. Dopuszcza się, że ciąg przykładów może zawierać błędy, jak również może zawierać atrybuty nieposiadające określonej wartości. Metody te bardzo dobrze radzą sobie z problemami nieliniowymi po wcześniejszej dyskretyzacji danych ciągłych.

Klasyfikator pamięciowy minimalno-odległościowy tj. *IBk* to podstawowy algorytm do wzmacniania, metody, dzięki której z dużej liczby słabych klasyfikatorów można otrzymać jeden lepszy.

Klasyfikator ze wzmacnianiem *ADABOOST* oparty jest na metodzie, u której podstaw leży idea poprawy dokładności działania algorytmu uczącego. Technika ta polega na stosowaniu sekwencji prostych modeli, przy czym każdy kolejny model przykłada większą „wagę” do tych obserwacji, które zostały błędnie zaklasyfikowane przez poprzednie modele.



Forma działania algorytmu metody wektorów nośnych (ang. *Support Vector Machines*, SVM) polega na znalezieniu hiperpłaszczyzny rozdzielającej z maksymalnym marginesem punkty należące do dwóch klas w rozpatrywanym przypadku brak ME – '0' lub jej obecność – '1'.

Klasyfikator głosującego perceptronu (ang. *Voted Perceptron*, VP) jest modyfikacją algorytmu perceptronu Rosenblatt'a. Algorytm ten sekwencyjnie analizuje dane i stosuje podstawowy wzór na modyfikacje wag (współczynników płaszczyzny), gdy dany punkt danych jest źle sklasyfikowany. Algorytm zapamiętuje wszystkie pośrednie stany wektora wag, a także zlicza dla każdego z nich tzw. liczbę przeżyć, tj. liczbę iteracji, w których kolejne punkty nie zmieniły stanu danego wektora.

W tym zakresie do badań użyto oprogramowania WEKA [83] w trybie wsadowym, które umożliwia użycie ww. zbioru algorytmów uczenia maszynowego przeznaczonych do eksploracji danych. Na wstępnym etapie modelowania stosowano podstawowe ustawienia algorytmów. Natomiast po wyselekcjonowaniu najlepszego, próbowano zoptymalizować jego parametry.

#### *Ocena sprawności modeli.*

Podstawową miarą oceny sprawności modeli było pole powierzchni pod krzywą zależności czułości systemu od jego specyficzności (AUROC, ang. *Area Under Receiver Operator Curve*, pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca), ale w celu lepszego zróżnicowania dodatkowo zastosowano pięć innych miar:

- ilość decyzji prawdziwie negatywnych (G0) tj. wtedy, gdy model nie przewiduje istnienie mikroemulsji, której w rzeczywistości nie zaobserwowano – obliczana jako procent całości zbioru testowego (równ. 12),
- ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji (G1) obliczana jako procent ilości wszystkich zaobserwowanych mikroemulsji w zbiorze testowym (równ. 13),
- skuteczność systemu (EF) obliczany jako procent błędnie sklasyfikowanych rekordów niezależnie od decyzji sieci klasyfikującej obszary jako '1' lub '0', obliczany względem całości zbioru testowego (równ. 14),

- błąd całkowity (EG) obliczany jako procent różnicy decyzji modelu i sumy prawidłowo przewidzianych punktów łącznie, obliczany względem całości zbioru testowego (równ. 15),
- błąd klasyfikacji (C1) obliczany jako procent ilości punktów środka geometrycznego obszarów przewidzianych przez system i potwierdzonych eksperymentalnie jako układ mikroemulsyjny (równ. 16); miarę tę zastosowano do oceny skuteczności systemu wspomagania decyzji testowanym na zbiorze danych eksperymentalnych.

$$G0 = \frac{X_{Good0}}{n_{pred0}} \quad (12)$$

$$G1 = \frac{X_{Good1}}{n_{pred1}} \quad (13)$$

$$EF = \frac{X_{Good1} + X_{Good0}}{n_{pred}} \quad (14)$$

$$EG = \frac{n_{pred} - (X_{Good1} + X_{Good0})}{n_{pred}} \cdot 100\% \quad (15)$$

$$C1 = \frac{C_{Good}}{Gibbs_{triang}} \cdot 100\% \quad (16)$$

gdzie:

$X_{Good1}$ ,  $X_{Good0}$  – prawidłowo przewidziana obecność ('1') lub brak ('0') mikroemulsji

$n_{pred1}$ ,  $n_{pred0}$  – ilość przewidzianych '1' i '0'

$n_{pred}$  – ilość przewidzianych '1' i '0' łącznie

$C_{Good}$  – liczba środków geometrycznych przewidywanych przez system, leżących w wyznaczonych eksperymentalnie obszarach mikroemulsji

$Gibbs_{triang}$  – liczba wszystkich obszarów mikroemulsyjnych wyznaczonych eksperymentalnie

Aby w pełni określić zdolności generalizacji modeli, do oceny miary AUROC zastosowano technikę progu ustalanego empirycznie. W tym celu wykorzystano program `Classif_compute`, który

automatycznie dobrał próg klasyfikacji tak aby zmaksymalizować wartość AUROC. Wartość progu stanowiła granicę, powyżej której wyjście modelu traktowane jest jako '1', a poniżej której jako '0'.

#### *Ekstrakcja reguł logicznych z sieci rozmytych.*

Ekstrakcję reguł przeprowadzono przy wykorzystaniu zbiorów o zredukowanej liczbie wejść. Wybrane sieci rozmyte trenowano zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania, a następnie przy użyciu wbudowanej funkcji „Export ANN structure” w programie *Nets2010*, eksportowano ich reguły logiczne do pliku tekstowego. Ponieważ ekstrahowane reguły należą do zbioru liczb rzeczywistych, w kolejnym kroku przeprowadzono binaryzację wyjścia (obecność '1' lub brak '0' mikroemulsji), a wejścia przeskalowano w przedziale od wartości minimalnej do wartości maksymalnej danego wejścia względem oryginalnej bazy danych. Każdej wartości danego wejścia i regule przyporządkowano jeden z pięciu poziomów („najniższy” < „niski” < „średni” < „wysoki” < „najwyższy”) lingwistycznie określając wielkość danego czynnika. Tak przygotowaną tablicę danych poddano analizie przy użyciu algorytmu drzewa decyzyjnego w programie *WEKA*. Uzyskane drzewo decyzyjne posłużyło do określenia reguł powstawania mikroemulsji.

#### *Konstrukcja systemu wspomaganie decyzji.*

Na podstawie wcześniej przeprowadzonych doświadczeń i analiz zostały wyłonione najlepsze modele do utworzenia systemu wspomaganie decyzji (ang. *Decision Support System*, DSS) przewidujące możliwość powstania mikroemulsji. Optymalne modele do implementacji zostały wybrane na podstawie zależności czułości systemu od jego specyficzności, AUROC. W optymalnym przypadku AUROC wynosi od 0.9 do 1.0. Założono, że poszczególne modele mogą mieć dowolne struktury i techniki przetwarzania danych, mogą być także uczone w niezależny od siebie sposób. Zastosowanie różnych algorytmów przetwarzania danych spowoduje wzajemne uzupełnienie się modułów, przez co zdolności klasyfikacyjne będą lepsze niż pojedynczych modeli. Wyłonione modele mają możliwość przewidywania powstania mikroemulsji zarówno z już

prezentowanych, jak i z nowych zestawów danych (nowych składników) nie prezentowanych podczas procesu uczenia.

Po wyselekcjonowaniu najlepszych modeli heurystycznych przeprowadzono prace nad ich połączeniem i utworzeniem nowego modelu wyższego rzędu (ang. *Ensemble Systems*) [175]. Przetestowano wszystkie możliwe kombinacje architektur sieci neuronowych o najlepszych wynikach oraz modeli opartych na klasyfikatorach drzew decyzyjnych, w celu empirycznego doboru optymalnych modeli wchodzących w skład systemu wyższego rzędu. Zastosowano dwie techniki służące łączeniu modeli: metodę głosowania i metodę uśredniania wyników.

Metoda głosowania polega na agregacji wyników binarnych dla poszczególnych modeli. Ostateczna decyzja podejmowana jest na podstawie wyniku głosowania, gdzie większość głosów wygrywa. Metoda uśredniania wyników polega na obliczeniu średniej arytmetycznej z wartości wyjściowych dla wszystkich modeli, a następnie określenie progu klasyfikacji tak, aby zmaksymalizować wartość AUROC.

Wybór modeli do utworzenia systemu wspomaganie decyzji prowadzono na podstawie poniższych kryteriów:

- rodzaju algorytmu – drzewa klasyfikacyjne, sieci neuronowe,
- wartości AUROC dla łączonych modeli,
- wzrostu wartości G1, przy jednocześnie nie zmienionej, lub nieznacznie mniejszej wartości G0.

### 3.2. Napisane oprogramowanie do obsługi systemu wspomaganie decyzji.

Ręczna obsługa utworzonego systemu wspomaganie decyzji byłaby czasochłonna i niepraktyczna. Z tego względu zaprojektowano i napisano w języku Java oprogramowanie ME\_DSS (ryc. 21 - 24, str. 104 - 107), służące do obsługi modeli. Wybór języka programowania warunkowały jego cechy:

- przenośność - program można uruchomić na każdym systemie i sprzęcie, w którym uruchomiona jest wirtualna maszyna Java (ang. *Java Virtual Machine, JVM*),

- wsparcie ze strony twórców środowiska – dostępne jako *Open-Source*, zintegrowane środowiska programistyczne, np. *Eclipse*, *BlueJ*, *NetBeans*, *IntelliJIDEA*
- możliwość tworzenia aplikacji graficznych – biblioteki i narzędzia zaimplementowane w języku Java pozwalają na tworzenie aplikacji okienkowych wyświetlanych w trybie graficznym,
- automatyczne zwalnianie nieużywanych zasobów pamięci (ang. *Garbage Collection*).

Ze względu na dostępność, częstość aktualizacji i dobrą dokumentację zdecydowano o zastosowaniu środowiska *NetBeans IDE* (GPL2, v6.8, Oracle Corporation) do napisania kodu programu ME\_DSS.



## 4. Weryfikacja systemu wspomagania decyzji w praktyce.

### 4.1. Ograniczanie przestrzeni eksperymentalnej.

Substancje pomocnicze wymienione w rozdziale III.1 (str. 57) zakwalifikowano do czterech grup: tenzyd, kotenzyd, tenzyd pomocniczy i faza olejowa. Następnie utworzono zbiór danych wejściowych dla programu ME\_DSS, który zawierał wszystkie możliwe kombinacje składników, przy czym mieszaniny tenzyd-kotenzyd-tenzyd pomocniczy występowały w 9 możliwych stosunkach ilościowych: 1+1+0, 1+4+0, 10+9+1, 1+9+0, 9+1+0, 1+9+10, 1+1+1, 9+1+10, 10+1+9. W ten sposób wygenerowano dane wejściowe dla trójkątów Gibbsa, których reprezentację na diagramach fazowych przewidziano przy użyciu programu ME\_DSS. System przewidział powstanie mikroemulsji w 1008 trójkątach Gibbsa, które następnie poddano ocenie z uwagi na wielowartościowe kryterium regułowe w następującej postaci:

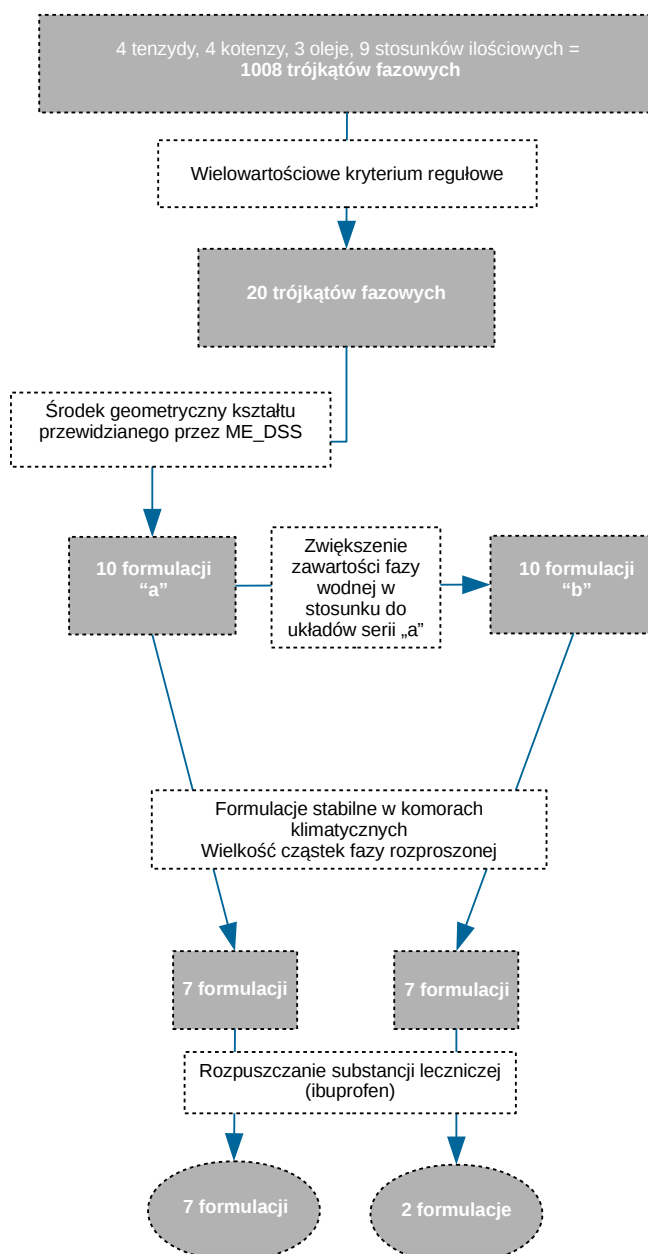
- co najmniej jeden składnik nie występuje w bazie danych uczących systemu (0/10/20/30/40),
- zawartość wody (0-10),
- w przypadku zawartości laurylosiarczanu sodu stężenie poniżej 2.5% (0/10).

Na podstawie sumy punktów ww. kryterium sporządzono ranking potencjalnych trójkątów, spośród których wybrano 20 znajdujących się najwyżej (*ME1 – ME20*), dla których następnie wyznaczono obszar występowania mikroemulsji eksperymentalnie. Na tej podstawie oceniono zdolność generalizacji systemu.

Z danych z piśmiennictwa wynika, że zawartość wody, fazy olejowej oraz stosunek ilości tenzydu do kotenzydu są jednymi z istotnych parametrów wpływających na szybkość przenikania substancji leczniczej przez skórę [79, 117, 229]. Zhang i Michniak-Kohn ustalili, że mikroemulsje w których zwiększa się ilość wody lub zwiększa się ilość oleju przy stałej ilości wody charakteryzują się szybszym przenikaniem substancji leczniczej przez skórę [229]. Z tego względu do dalszych badań, spośród formułacji których skład ilościowy odpowiadał punktom środka geometrycznego przewidzianego kształtu przez ME\_DSS, wybrano takie, które po dodaniu wody w

ilości min. 40% utrzymywały wciąż charakter izotropowy. Na podstawie ww. kryterium powstała seria „a” 10 formułacji, której odpowiada również 10 formułacji serii „b”.

Dalsze ograniczenie przestrzeni eksperymentalnej przeprowadzono na podstawie badań stabilności. Spośród łącznej liczby 20 formułacji wybrano 10 mikroemulsji, po 5 z serii „a” i „b”, do których inkorporowano modelową substancję leczniczą trudno rozpuszczalną w wodzie. Schemat przyjętej metodyki do ograniczenia przestrzeni eksperymentalnej przedstawiono na rycinie 12.



Rycina 12. Zastosowana metodyka podczas ograniczania przestrzeni eksperymentalnej.



#### 4.2. Sporządzanie mikroemulsji.

W celu określenia obszarów występowania mikroemulsji w trójkątach Gibbsa odważano do zlewki tenzyd lub tenzyd i kotenzyd i fazę olejową w proporcjach: 1+9, 2+8, 3+7, 4+6, 5+5, 6+4, 7+3, 8+2 i 9+1. Masa mieszaniny wynosiła każdorazowo 5.0 gramów. Składniki mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego (300 obr./min) zaopatrzonego w płytę grzewczą (temp.  $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) do momentu rozpuszczenia wszystkich składników lub uzyskania homogennej dyspersji, a następnie dodawano z biurety po 0.25 mL wody destylowanej do masy 20 g, przy zachowaniu ciągłego mieszania. Klarowność sporządzonych układów oceniano wizualnie.

#### 4.3. Sporządzanie mikroemulsji z ibuprofenem.

Do sporządzenia mikroemulsji o różnej zawartości ibuprofenu w granicach od 0.1% do 20% (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%) wybrano układy serii „a” i „b” o najlepszych parametrach. Substancję leczniczą rozpuszczano w bezwodnej mikroemulsji i uzupełniano wodą destylowaną do 10 gramów. Klarowność sporządzonych układów oceniano wizualnie.

#### 4.4. Badanie właściwości fizykochemicznych mikroemulsji.

Właściwości fizykochemiczne wybranych układów mikroemulsyjnych oceniano na podstawie badań współczynnika refrakcji, napięcia powierzchniowego, wielkości cząstek fazy rozproszonej, pH, gęstości, lepkości, zmętnienia, typu mikroemulsji oraz jej stabilności.

#### 4.4.1. Pomiar współczynnika refrakcji.

Do oznaczenia współczynnika refrakcji użyto refraktometru Abbego PZO RL-1. W tym celu na oczyszczonej spirytusem powierzchnię pryzmatu naniesiono zakraplaczem kilka kropel badanej mikroemulsji. Po naprowadzeniu krzyża na linię graniczną w okienku okularu ze skali odczytano współczynnik refrakcji. Jako cieczy kalibracyjnej użyto wody destylowanej. Pomiar wykonywano w temperaturze około 25°C.

#### 4.4.2. Pomiar napięcia powierzchniowego.

Pomiar napięcia powierzchniowego prowadzono przy użyciu tensjometru K-12 V 6.02 Krüss GmbH, Hamburg, Niemcy, metodą wynurzeniową z użyciem płytki Wilhelmięgo. Pomiaru dokonywano w temperaturze około 22°C. Przed każdym pomiarem płytkę przemywano wodą destylowaną, mieszaniną acetonu i alkoholu etylowego, a następnie wyżarzano w płomieniu palnika przez około 2 minuty. Dla każdej próbki pomiar powtarzano trzykrotnie.

#### 4.4.3. Pomiar wielkości cząstek fazy rozproszonej.

Średnią wielkość cząstek fazy rozproszonej (d<sub>50</sub>) określono metodą dyfrakcji promienia lasera (PCS) przy użyciu Malvern Zetasizer Nano RS. Zdjęcia mikroemulsji wykonano przy użyciu wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego z działem polowym 7600F metodą zamrażania i łamania (ang. *Freeze-Fracture*). Pomiar średnicy cząstek fazy rozproszonej wykonywano w programie *ImageJ* na podstawie analizy obrazu z mikroskopu [1].

#### 4.4.4. Pomiar pH.

Pomiar pH dokonywano przy użyciu pH-metru mikrokomputerowego CP-505 Elmetron - metodą potencjometryczną. Przed każdym pomiarem aparat był kalibrowany z użyciem wzorcowych roztworów buforowych. Pomiar pH przeprowadzano w stałej temperaturze około

22°C, przy użyciu elektrody kombinowanej ESAgP-301W. Pomiar powtórzono trzykrotnie dla każdej z próbek.

#### *4.4.5. Pomiar gęstości.*

Badanie gęstości względnej przeprowadzono wg FP X (Monografia „Gęstość względna”, 2.2.5). Pomiar wykonano w temperaturze 20°C. W tym celu przed badaniem ważono piknometr, a następnie wypełniano go mikroemulsją i ponownie ważono. Porównując masę tej samej objętości mikroemulsji i cieczy o znanej gęstości (wody) obliczano gęstość względną.

#### *4.4.6. Pomiar lepkości dynamicznej.*

Badanie lepkości przeprowadzono przy użyciu wiskozymetru Haake VT 550, z cylindrem NV dla objętości próbki 9 mL. Każdorazowo wyznaczano krzywe płynięcia w zakresie 10 - 800 1/s, a pomiaru lepkości dynamicznej dokonywano przy wartości naprężenia ścinającego 170 - 350 1/s. Badanie lepkości prowadzono w temperaturze 22°C, a każdą próbkę analizowano trzykrotnie.

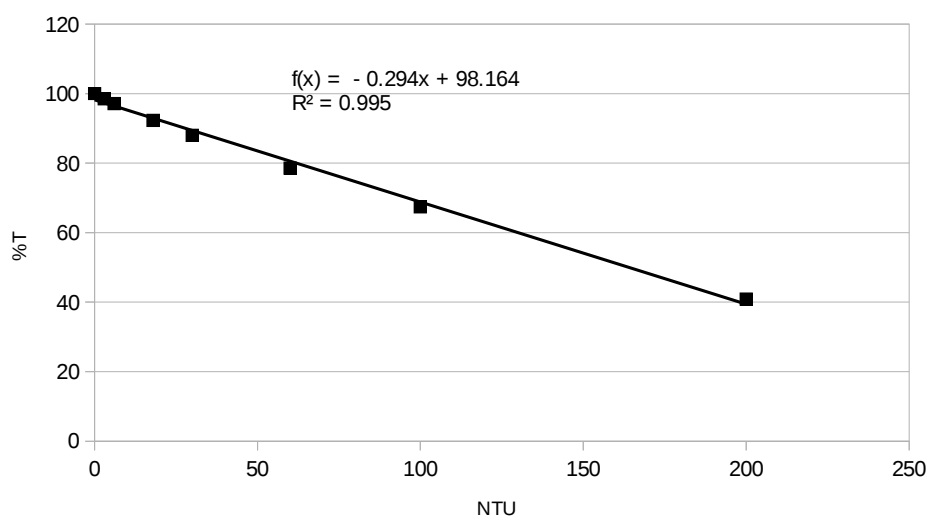
#### *4.4.7. Określenie typu mikroemulsji.*

Typ mikroemulsji określano, stosując mieszaninę barwników: błękitu metylenowego i Sudanu III. Na szkiełku podstawowym umieszczano kilka kropel mikroemulsji i mieszano z kilkoma miligramami barwnika. W przypadku obecności mikroemulsji typu o/w obserwowano kolor czerwony, a w przypadku występowania mikroemulsji typu w/o niebieski.

#### *4.4.8. Pomiar stopnia zmętnienia.*

Zmętnienie mikroemulsji badano metodą turbidymetryczną wg FP X. Pomiar polegał na analizie intensywności światła emitowanego przez źródło i światła docierającego do detektora

spektrofotometru, po przejściu przez kufetę z badaną próbką. W celu wyznaczenia tej zależności zastosowano spektrofotometr UV-1800 UV-VIS Shimadzu. Krzywą wzorcową wyznaczono w zakresie 0 – 200 NTU (ryc. 13).



**Rycina 13.** Krzywa wzorcowa oznaczenia zmętnienia metodą turbidymetryczną z użyciem spektrofotometru.

Zdolność mikroemulsji do rozcieńczania wodą oceniano, dodając do 1 mL mikroemulsji równoważną ilość wody. Pozytywny wynik testu notowano, gdy nie występowało zmętnienie mikroemulsji.

#### 4.5. Badanie stabilności.

Stabilność wybranych układów mikroemulsyjnych bez substancji leczniczej, oceniano na podstawie badań prowadzonych w komorach klimatycznych. Test polegał na przechowywaniu próbek w komorach w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  i wilgotności  $60\%\pm 5\%$ , przez 30 dni, a następnie ocenie wizualnej, pomiarze pH, lepkości, przewodnictwa, zmętnienia, napięcia powierzchniowego, współczynnika refrakcji i gęstości badanych układów.

W celu ustalenia istotności statystycznej zmian właściwości fizykochemicznych obliczono wartości  $p$  dwustronnego testu  $t$ -Studenta przy założeniu hipotezy zerowej  $H_0$ : „nie istnieje statystycznie znacząca różnica pomiędzy mikroemulsją przed i po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C, 60% RH)”. Hipotezę alternatywną zdefiniowano jako  $H_1$ : „istnieje statystycznie znacząca różnica pomiędzy mikroemulsją przed i po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C, 60% RH)”. Istotne statystycznie różnice wykazano w przypadku odrzucenia hipotezy  $H_0$  i przyjęcia hipotezy alternatywnej  $H_1$  gdy  $p < \alpha/2$  dla poziomu istotności  $\alpha = 0.05$ . W tym przypadku przyjmowano hipotezę alternatywną  $H_1$ , dla przedziału ufności CI = 95%. Ze względu na brak możliwości wyliczenia odchylenia standardowego dla gęstości i współczynnika refrakcji obliczono względną różnicę ( $S_{rel}$  [%]) pomiędzy wartościami zmierzonymi przed i po przechowywaniu w komorze klimatycznej na podstawie równania (17):

$$S_{rel} = \frac{|X_{t_{30}} - X_{t_0}|}{X_{t_0}} \cdot 100\% \quad (17)$$

gdzie,

$X_{t_0}$ ,  $X_{t_{30}}$  – wartości właściwości fizykochemicznych odpowiednio przed i po 30 dniowym badaniu w komorze klimatycznej.

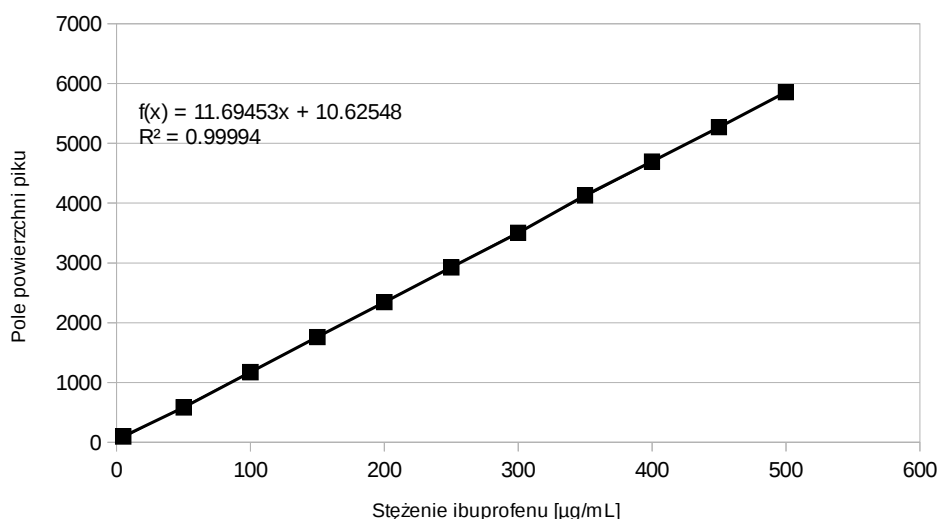
Stabilność układów mikroemulsyjnych zawierających substancję leczniczą oceniano na podstawie badań prowadzonych w komorach klimatycznych oraz testu wahadłowego.

Test wahadłowy polegał na cyklicznym zamrażaniu i rozmrażaniu próbki. Podczas jednego cyklu próbkę przechowywano przez 72 godziny w temperaturze -4°C, następnie przez kolejne 72 godziny w temperaturze 40°C w komorze klimatycznej (75% RH). Po każdym cyklu dokonywano analizy wizualnej ewentualnych zmian wyglądu lub rozkładu mikroemulsji. W trakcie badania wykonano 6 cykli zamrażania i rozmrażania.

Trwałość substancji leczniczej w mikroemulsji oceniano oznaczając jej zawartość metodą HPLC w próbkach bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 1, 3, 7, 14, 21, 28 i 30 dniach przechowywania w komorach klimatycznych w temperaturze 25°C±2°C oraz wilgotności względnej 60%±5%.

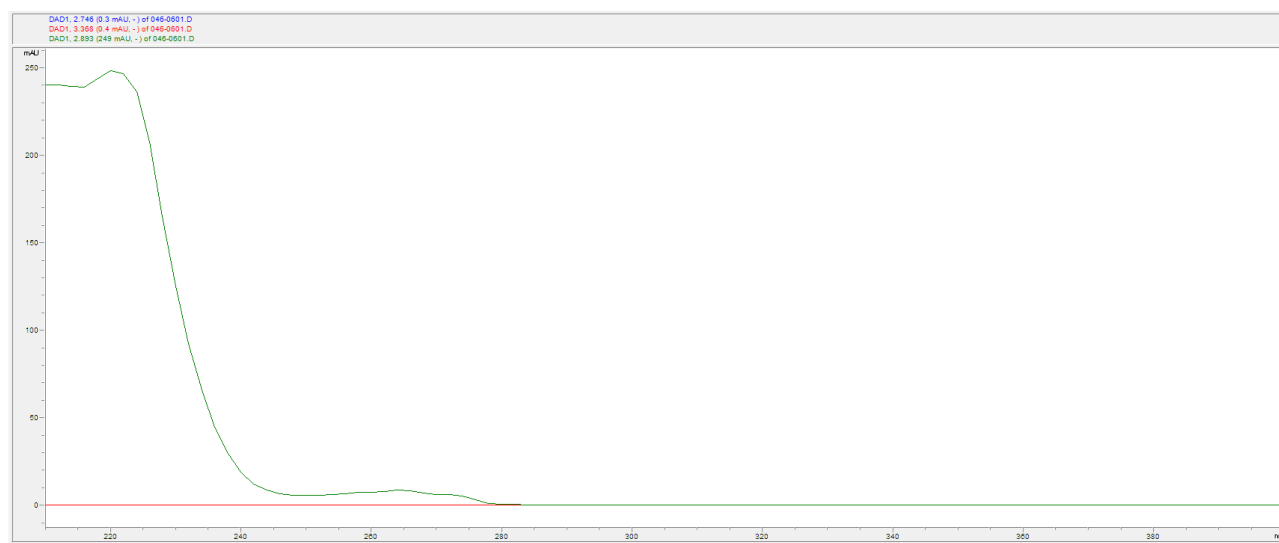
#### 4.6. Oznaczanie zawartości ibuprofenu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Badanie zawartości ibuprofenu w mikroemulsjach prowadzono z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej odwróconych faz (HPLC-RP). Krzywą wzorcową wyznaczono w zakresie stężenia ibuprofenu w badanej próbce od 5 do 500  $\mu\text{g/mL}$  (ryc. 14). Obliczona względna precyzja funkcji kalibracji wyniosła 0.53%, a odzysk wyniósł w przybliżeniu 99.5% i 99.8% dla spodziewanych stężeń ibuprofenu 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$ . Specyficzność metody oznaczono porównując widmo UV ibuprofenu oraz próbki zawierającej mieszaninę substancji pomocniczych (ryc. 15). Powtarzalność wyników była większa niż 99%.



**Rycina 14.** Krzywa wzorcową oznaczenia stężenie ibuprofenu w badanych próbkach metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Fazę ruchomą stanowiła mieszanina kwasu ortofosforowego (V) o  $\text{pH} = 2.5$  i metanolu w stosunku 75:25 (V/V). Zastosowano jako fazę stacjonarną kolumnę phenomenex<sup>®</sup>Kinetex C-18 (100 mm x 4.6 mm x 2.6  $\mu\text{m}$ ). Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 mL/min, a objętość nastrzyku 5 lub 10  $\mu\text{L}$ . Detekcji dokonywano przy długości fali 220 nm. Każdorazowo przed analizą próbkę rozcieńczano roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0.1 mol/L w stosunku 1:1000.



**Rycina 15.** Specyficzność metody.

(Kolor zielony - widmo UV ibuprofenu o stężeniu 100 µg/mL; kolor czerwony - widmo UV mieszaniny składników mikroemulsji (1:1000)).





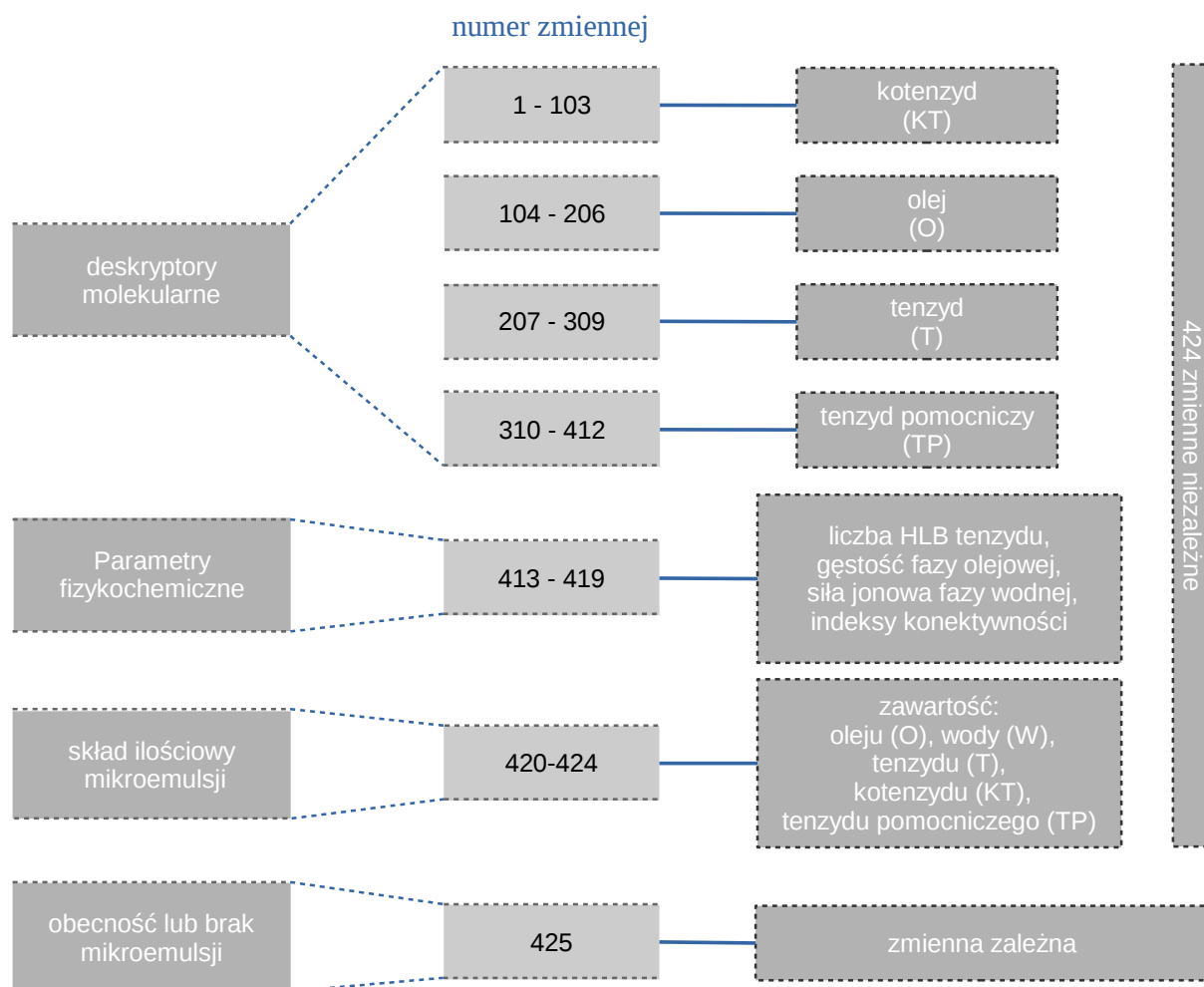
## IV. Wyniki.

### 1. Ocena przydatności narzędzi eksploracji danych do przewidywania powstawania mikroemulsji.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa i wyników badań wykonywanych w Katedrze utworzono zbiór danych zawierający liczbową reprezentację składu ilościowego i jakościowego mikroemulsji. Wstępna obróbka danych polegała na redukcji wektora wejściowego. Usunięto w ten sposób nadmiarowe zmienne niezależne. W procesie eksploracji danych opracowano m. in. modele obliczeniowe sztucznych sieci neuronowych o skomplikowanej architekturze, *RandomForest* i sieci neuronowo-rozmyte. Modele sieci neuronowych i *RandomForest* charakteryzowały się dobrymi zdolnościami predykcyjnymi, z tego względu włączono je do systemu wspomagania decyzji. Ze względu na możliwość utworzenia zbioru reguł, sieć neuronowo-rozmyta posłużyła do ekstrakcji wiedzy z bazy danych.

#### *Baza danych.*

Spośród około 300 publikacji wyselekcjonowano dane z 40 artykułów, z których łącznie wybrano 158 trójkątów fazowych Gibbsa (tab. 6). Baza danych składa się z około 305 000 rekordów i zawiera informacje o składzie ilościowym oraz jakościowym mikroemulsji. W tym celu zastosowano moduły *molconv* i *cxcalc* programu *Marvin*. Każdy rekord danych zawierał informacje dotyczące procentowej zawartości składników mikroemulsji oraz ich parametry fizykochemiczne w tym liczbę HLB, gęstość fazy olejowej, siłę jonową fazy wodnej, indeksy konektywności oraz deskryptory molekularne. Na tej podstawie wyodrębniono 424 zmienne niezależne. Ostatnim elementem była pojedyncza zmienna kodująca obecność (1) lub brak mikroemulsji (0) dla danego składu podanego na wejściu systemu (ryc. 16).



Rycina 16. Konstrukcja bazy danych.

Tabela 6. Skład jakościowy bezwodnych mikroemulsji będących podstawą zbudowania bazy danych.

Składniki			
Tenzyd	Kotenzyd/Tenzyd pomocniczy*	Faza olejowa	Piśmiennictwo
		alkohol cynamonowy	[162]
bis(2-etylofenylo) sulfobursztynian sodu		heptan	[159]
		heptan, izopropylu mirystynian, maślan etylu, Miglyol® 812N, oktanian etylu, olej sojowy oczyszczony, tributaryna	[104]
akrylooksyundecylodimetyloamniooctan		metakrylan metylu	[65]

Składniki			
Tenzyd	Kotenzyd/Tenzyd pomocniczy*	Faza olejowa	Piśmiennictwo
Brij® 30		heptan, izopropylu mirystynian, Miglyol® 812N, oktanian etylu, olej sojowy oczyszczony	[104]
		1-hepten, heksadekan, heptan, izopropylu mirystynian, oktadekan	[143]
Brij® 35		maślan etylu, Miglyol® 812N, oktanian etylu, oleinian etylu, olej sojowy, tributeryna	[216]
Brij® 78		1-hepten, heptan	[143]
Brij® 96		mleczan n-butylu	[70]
		1-hepten, heksadekan, heptan, izopropylu mirystynian, Miglyol® 812N, oktadekan	[143]
Brij® 97		maślan etylu, Miglyol® 812N, oktanian etylu, oleinian etylu, olej sojowy oczyszczony, tributeryna	[216]
	butanol	tetradekan	[68]
Brij® 98		1-hepten, heptan, izopropylu mirystynian, olej sojowy oczyszczony	[143]
	Brij® 92*	parafina ciekła	[70]
C12E5		dekan	[82]
C12E8	pentanol	dodekan	[67]
C14TAB	HEMA	MMA	[36]
Cremophor® RH40	etanol	Miglyol® 840	[177]
		heksanol	[185]
		pentanol	[77, 223]
CTAB	butanol	2,2,4-trimetylopentan	[214]
	HEMA	MMA	[36]
	pentanol	cykloheksan	[223]
DDAO		maślan etylu, Miglyol® 812N, oktanian etylu, tributeryna	[216]
DTAB	DDAB*	2,2,4-trimetylopentan	[40]

Składniki			
Tenzyd	Kotenzyd/Tenzyd pomocniczy*	Faza olejowa	Piśmiennictwo
	HEMA	MMA	[37]
L1695	butanol	dodekan	[69]
		pentanol	[223]
LSS	butanol	cykloheksan	[145]
		heptan	[25]
	heksanol	dekan	[176]
	pentanol	dodekan	[189, 190]
Lutensol® ON110		EDOT	[81]
Lutrol® F68	izopropanol/ Span® 80*	kwasy olejowe	[169]
M1695	butanol	dodekan	[69]
NP9	NP5*	cykloheksan	[54, 66, 130, 133]
P1570	butanol	dodekan	[69]
PEG 40 stearate	tetraglikol/ oleinian glicerolu*	izopropylu mirystynian	[197]
PEO R MA 40	HEMA	MMA	[64]
S1170	butanol	dodekan	[69]
		tetradekan	[112]
S1570	butanol	dodekan, heksadekan, tetradekan	[69]
		Miglyol® 812N	[58]
S170			
S770	butanol	dodekan	[69]
S970			
Silwet® L7607		dodekanol	[71]
Triton® X100		pentanol	[223]
Tween® 20		alkohol cynamonowy	[162]
Tween® 21		heptan, izopropylu mirystynian, Miglyol® 812N, oktanian etylu, olej sojowy oczyszczony	[104]

Składniki			
Tenzyd	Kotenzyd/Tenzyd pomocniczy*	Faza olejowa	Piśmiennictwo
Tween® 40	Imwitor® 308	izopropylu mirystynian	[174]
	Span® 20	oleinian etylu	[8]
		olej palmowy oczyszczony	[140]
Tween® 80	oktanodiol/ Span® 80	izopropylu mirystynian	[15]
	Span® 80	olej palmowy oczyszczony	[140]
	Span® 85		
Tween® 81		heptan, izopropylu mirystynian, Miglyol® 812N, oktanian etylu, olej sojowy oczyszczony	[104]
Tween® 85	bis(2-etylofenylo) sulfobursztynian sodu	izopropylu mirystynian	

AUDMAA – akrylooksyundecylodimetyloamnio octan, CTAB – bromek cetyltrimetyloamoniowy, C12E5 - eter monododecylpentaetylenoglikolowy, C12E8 - eter monododecyl-octaetylenoglikolowy, C14TAB – bromek tetradecyltrimetyloamoniowy, DDAB - bromek didodecylodimetyloamoniowy, DDAO – N-tlenek N,N-dimetylo-dodecyloaminy, DTAB – bromek dodecyltrimetyloamoniowy, EDOT – 3,4-etylenodiodioksytiofen, HEMA - metakrylan 2-hydroksyetylowy, MMA – metakrylan metylu, NP9 – eter izooktylofenylo polioksyetylenowy(9), NP5 - eter izooktylofenylo polioksyetylenowy(5), PEG – glikol polioksyetylenowy, PEO R MA 40 – metakrylan gamma-metoksy polietylenowy(40) kwasu alfa-undecylowego, S1570, S1170, S170, S770, S970, P1570, M1695, L1695 – monoestry sacharozy, LSS – laurylosiarczan sodu.

### Redukcja wektora wejściowego.

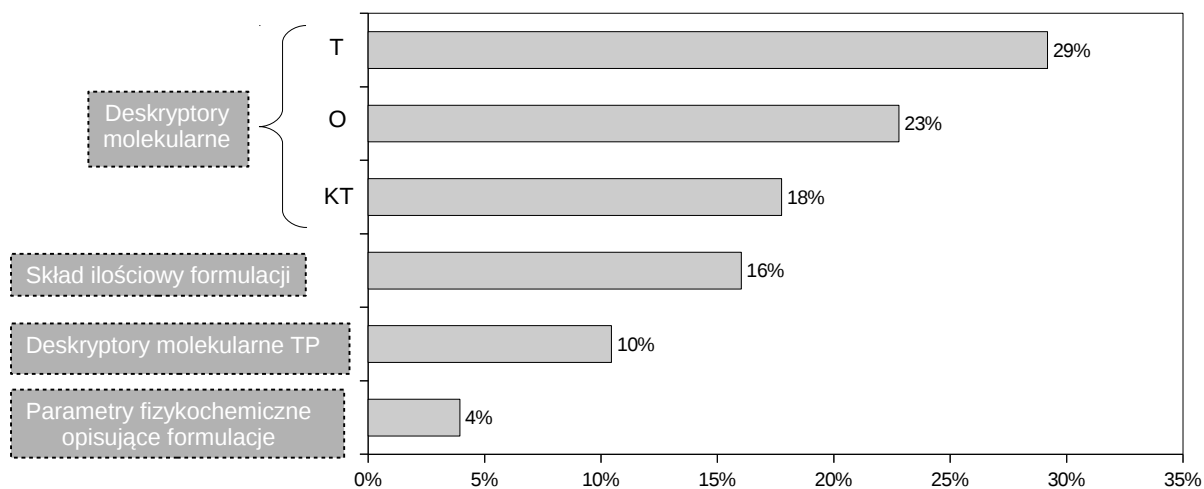
Wstępne przetwarzanie bazy danych polegało na usunięciu wejść, których wartości były stałe, przy użyciu programu *Erase\_0*. W konsekwencji zredukowano zbiór danych z 424 do 407 wejść.

Zmniejszenie ilości zmiennych niezależnych zwykle prowadzi do redukcji błędów generalizacji oraz poprawienia możliwości predykcyjnych modelu. Modelowanie przy użyciu całego zbioru zawierającego 407 wejść byłoby procesem nieefektywnym i czasochłonnym. Przed przystąpieniem do użycia narzędzi eksploracji danych odrzucono zmienne nadmiarowe, zmniejszające efektywność modeli (ryc. 17 - 18).

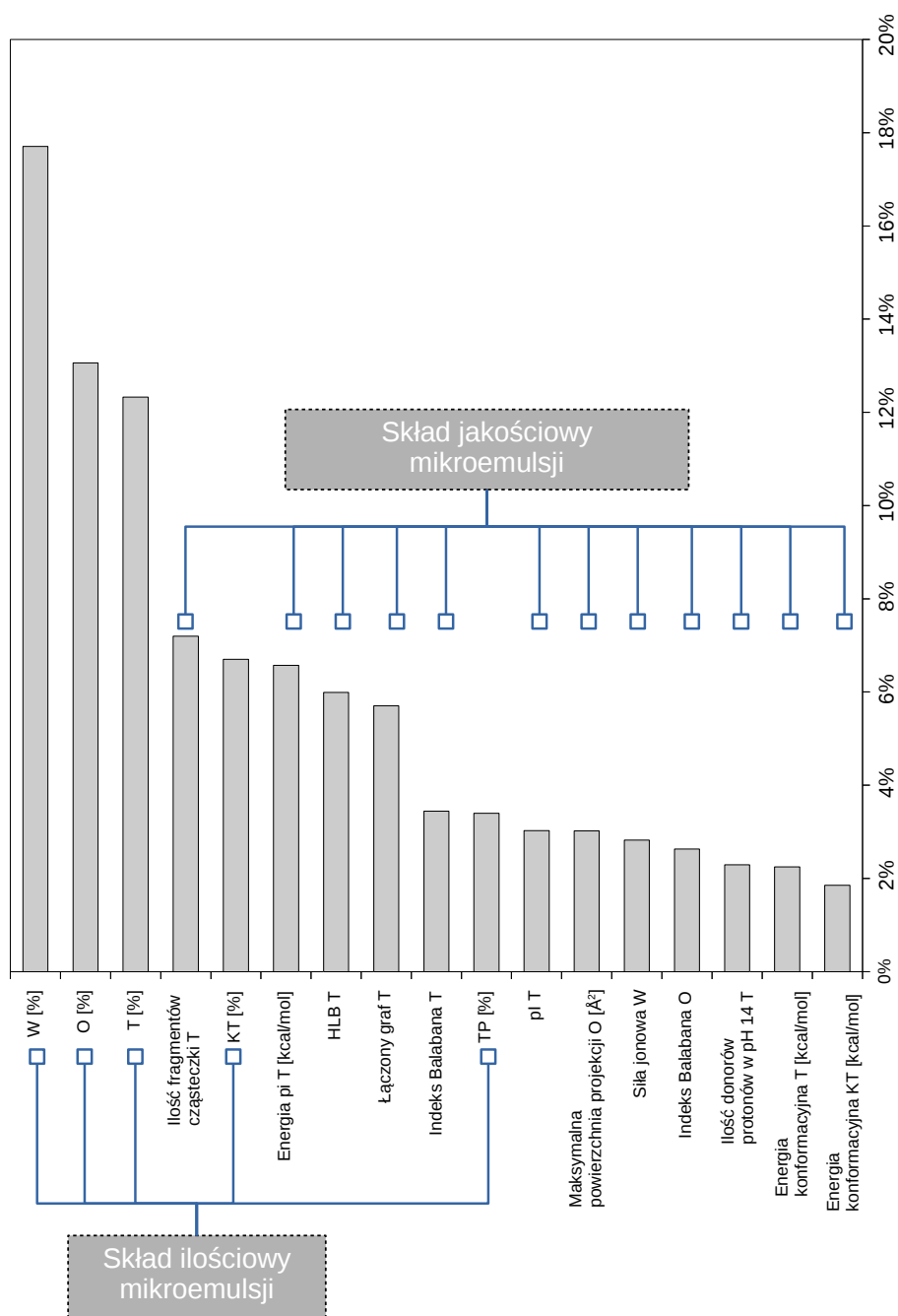
**Tabela 7.** Charakterystyka dziesięciu najlepszych względem wartości AUROC sieci neuronowych wytrenowanych na całym zbiorze danych.

Architektura ANN	AUROC	G1 [%]	G0 [%]	Próg [%]
200_100_80_40_20_10_fsr_orig	0.95	65.09	95.53	62
200_80_40_20_fsr_orig	0.94	71.18	93.84	51
15_7_5_fsr_orig	0.93	62.8	95.15	52
20_16_8_4_fsr_orig	0.93	70.31	93.34	47
20_16_8_4_sigma_orig	0.93	67.61	94.81	53
20_sigma_orig	0.93	61.96	94.17	44
40_10_5_fsr_orig	0.93	65.71	93.79	43
40_10_5_sigma_orig	0.93	66.27	94.21	37
60_20_8_fsr_orig	0.93	64.58	94.23	47
60_20_8_sigma_orig	0.93	65.58	94.31	37

G1 – ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji; G0 - ilość decyzji prawdziwie negatywnych (brak mikroemulsji); AUROC - pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca.



**Rycina 17.** Wyniki kumulatywnej wrażliwości zbioru liczącego 407 zmiennych w poszczególnych grupach zmiennych.



**Rycina 18.** Wartości wrażliwości [%] dla wyselekcjonowanego siedemnastowójściowego wektora.

Wszystkie wybrane sieci neuronowe, które zastosowano w analizie wrażliwościowej, charakteryzowały się wartością pola powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca (AUROC) większą lub równą 0.93. Ilość pozytywnie zaklasyfikowanych mikroemulsji wynosiła od 62 do 71%, a ilość pozytywnie rozpoznanych obszarów bez mikroemulsji była większa od 93%. Sieć 200\_80\_40\_20\_fsr\_orig, złożona z 4 warstw ukrytych, z

logarytmiczną funkcją aktywacji wg Bilskiego (*fsr*), trenowana na oryginalnym zbiorze danych charakteryzowała się największym odsetkiem prawidłowo rozpoznanych mikroemulsji (G1), tj. ponad 71%. Z kolei sieć 200\_100\_80\_40\_20\_10\_fsr\_orig najtrafniej przewidywała obszary, barku obecności mikroemulsji. Stwierdzono ponad 95% prawidłowo rozpoznanych wartości G0 (tab. 7).

W celu wykonania analizy wrażliwościowej zmiennych wejściowych użyto sieci neuronowych trenowanych na całym zbiorze danych. Spośród nich wybrano 10 sieci charakteryzujących się najwyższą wartością AUROC (tab. 7). Sieci te posłużyły do utworzenia rankingu wrażliwości. Jako punkt odcięcia zmiennych w rankingu przyjęto wartość 5% dla gradientu względnej wrażliwości.

### *Modelowanie heurystyczne.*

Zredukowany zbiór danych z siedemnastoma zmiennymi wejściowymi poddano procedurze wstępnego przetwarzania. W jej wyniku uzyskano pięć zbiorów tj., z dodatkowym szumem („rand”), skalowanych („scale”), z równoważonymi klasami („orig\_balance\_plus”, „orig\_balance\_minus”) i oryginalnych („orig”), podzielonych na zbiory uczące i testowe zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania. Tak przygotowane zbiory danych posłużyły do wytrenowania modeli heurystycznych. Jako kryterium oceny sprawności modeli przyjęto: pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca (AUROC), ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji (G1) oraz ilość decyzji prawdziwie negatywnych (G0).

Wytrenowano i przetestowano około 60 000 wariantów modeli sztucznych sieci neuronowych. Jako osobny wariant modelu traktowano zarówno architekturę sieci neuronowej jak też i ilość kroków uczenia oraz zastosowany typ wstępnego przetwarzania zbioru uczącego: „rand”, „scale”, „orig\_balance\_plus”, „orig\_balance\_minus” i „orig”. Na podstawie uzyskanych wartości AUROC oraz po zredukowaniu redundantnych architektur i kroków uczenia wybrano 5 sieci neuronowych, które posłużyły do opracowania systemu wspomaganie decyzji (tab. 9, 11). Analizowane sieci neuronowe posiadały od dwóch do trzech warstw ukrytych. W przeważającej części funkcją aktywacji była logarytmiczna funkcja aktywacji wg Bilskiego (*fsr*). O dobrym dopasowaniu świadczą wartości AUROC w granicach od 0.83 do 0.85, a także G0 w zakresie od 89 do 93%. W celu ustalenia stabilności modeli, wyselekcjonowane architektury sieci wytrenowano ponownie z zastosowaniem tzw. techniki multistartu (tab. 8). Odchylenie od średniej arytmetycznej dla modeli trenowanych zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania wynosiło dla AUROC, G1 i G0, odpowiednio 0.58%, 1.97% i 0.83%.



**Tabela 8.** Wyniki badań stabilności modeli sztucznych sieci neuronowych. Podano wartości średnie z dziesięciu modeli  $\pm$  odchylenie standardowe.

Zbiór	AUROC	G1	G0
10cv	0.84 $\pm$ 0.58%	60.72 $\pm$ 1.97%	89.76 $\pm$ 0.83%
cała baza danych	0.91 $\pm$ 0.27%	75.83 $\pm$ 1.67%	95.05 $\pm$ 0.52%

**Tabela 9.** Wyniki dwudziestu najlepszych sieci neuronowych wytrenowanych na zbiorze danych 17in\_10cv. Kolorem czerwonym oznaczono sieci włączone do komitetu ekspertów.

Architektura ANN	AUROC	G1	G0	Próg [%]	Iteracje	Zbiór
40_10_5_fsr	0.85	50.15	92.51	84	10 mln	orig_balance_minus
40_10_5_fsr	0.85	48.34	92.42	86	20 mln	orig_balance_minus
60_20_8_fsr	0.84	53.01	91.44	83	20 mln	orig_balance_plus
40_10_5_fsr	0.84	48.1	92.8	84	5 mln	orig_balance_minus
120_80_40_20_fsr	0.84	45.11	93.57	57	5 mln	orig
60_20_8_sigma	0.84	57.11	89.24	75	10 mln	orig_balance_plus
7_5_fsr	0.84	52.16	90.39	82	20 mln	orig_balance_minus
15_7_5_fsr	0.84	43.57	93.53	87	10 mln	orig_balance_plus
120_50_30_20_10_fsr	0.84	50.9	91.74	59	20 mln	orig
200_80_40_20_fsr	0.84	42.2	93.74	57	5 mln	orig
7_5_fsr	0.84	55.39	89.48	80	10 mln	orig_balance_minus
7_5_fsr	0.84	51.75	90.22	80	5 mln	orig_balance_minus
40_10_5_fsr	0.83	47.24	91.79	85	5 mln	orig_balance_plus
60_20_8_fsr	0.83	47.07	91.88	85	5 mln	orig_balance_minus
80_40_20_10_fsr	0.83	45.74	92.14	90	5 mln	orig_balance_minus
15_7_5_fsr	0.83	42.83	93.06	88	5 mln	orig_balance_plus
60_20_8_fsr	0.83	41.65	93.36	87	5 mln	orig_balance_plus
120_80_40_20_fsr	0.83	38.64	94.97	79	20 mln	orig
60_20_8_sigma	0.83	48.74	90.91	75	5 mln	orig_balance_plus
20_sigma	0.83	45.91	91.21	43	10 mln	orig

G1 – ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji; G0 – ilość decyzji prawdziwie negatywnych; AUROC - pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca.

Uwzględniono 17 algorytmów klasyfikacyjnych, tj. *RotationForest*, *RandomForest*, *NBTree*, *LTM*, *REPTree*, *J48*, *SimpleCart*, *Ftree*, *J48graft*, *LADTree*, *IBk*, *BayesNetworkClassifier*, *ADABOOST*, *ADTree*, *SVM*, *DecisionStump* i *VotedPerceptron*, na podstawie których wytrenowano 170 modeli przy użyciu środowiska *WEKA*. Spośród nich, modele *RotationForest*, *RandomForest* i *NBTreeModel* uzyskały wartość AUROC większą niż 0.8. Najkorzystniejszym z punktu widzenia

przewidywania obszarów mikroemulsyjnych był model *RandomForest*, dla którego wartość G1 wynosiła 55%. Włączono go do komitetu ekspertów (tab. 10). Podczas dalszej optymalizacji parametrów charakterystycznych dla tego algorytmu ustalono, że zwiększenie ilości drzew nie wpłynęło znacząco na poprawę wyników badań. Ponadto ograniczenie wielkości pojedynczych drzew i zmniejszenie ilości losowo wybieranych zmiennych przy każdym rozgałęzieniu poniżej 5 niekorzystnie wpłynęło na jakość modelu. Z tego względu zdecydowano o zastosowaniu algorytmu *RandomForest* z ustawieniami standardowymi, który włączono do systemu wspomagania decyzji.

**Tabela 10.** Wyniki testowania algorytmów obliczeniowych środowiska *WEKA* na zbiorze 17in\_10cv\_orig. Kolorem czerwonym oznaczono model włączony do komitetu ekspertów.

Algorytm	EG	EF	G1	G0	AUROC
<i>RotationForest</i>	14.55	0.85	53.94	93.53	0.89
<i>RandomForest</i>	14.36	0.86	55.13	93.44	0.88
<i>NBTree</i>	16.55	0.83	54.57	91.01	0.83
<i>LTM</i>	16.81	0.83	59.97	89.04	0.79
<i>REPTree</i>	16.96	0.83	52.47	91.03	0.76
<i>J48</i>	15.78	0.84	60.50	90.19	0.76
<i>SimpleCart</i>	16.24	0.84	56.25	90.80	0.75
<i>Ftree</i>	17.11	0.83	56.01	89.51	0.75
<i>J48graft</i>	15.12	0.85	56.70	92.08	0.74
<i>LADTree</i>	20.27	0.80	10.54	97.77	0.74
<i>IBk</i>	16.81	0.83	58.06	89.70	0.74
<i>BayesNetworkClassifier</i>	29.79	0.70	59.31	72.71	0.73
<i>ADABoost</i>	20.99	0.79	11.23	96.51	0.73
<i>ADTree</i>	20.92	0.79	10.99	96.63	0.71
<i>SVM</i>	16.10	0.84	34.33	96.68	0.66
<i>DecisionStump</i>	21.05	0.79	0.00	100.00	0.55
<i>VotedPerceptron</i>	20.98	0.79	9.83	96.82	0.53

EG – błąd całkowity, EF – skuteczność systemu, G1 – ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji; G0 – ilość decyzji prawdziwie negatywnych; AUROC - pole powierzchni pod wykresem funkcji charakterystyki zależności odbiorca-nadawca.

**Tabela 11.** Sieci neuronowe wchodzące w skład komitetu ekspertów. Proces uczenia przeprowadzono na zbiorze 10cv\_orig.

Architektura ANN	EG	EF	G1	G0	AUROC	Próg [%]
40_10_5_fsr_balance_minus_10m	16.2	0.84	50.2	92.5	0.85	84
60_20_8_fsr_balance_plus_20m	16.5	0.84	53.0	91.4	0.84	83
60_20_8_sigma_balance_plus_10m	17.4	0.83	57.1	89.2	0.84	75
120_50_30_20_10_fsr_balance_none_20m	16.7	0.83	50.9	91.7	0.84	59
7_5_fsr_balance_minus_10m	17.5	0.82	55.4	89.5	0.84	80
RandomForest_100trees_1000maxnodes_5mtry	14.3	0.86	55.1	93.4	0.88	-
Komitet ekspertów, metoda głosowania (ECV)	16.3	0.84	64.9	88.5	0.77	-
Komitet ekspertów, metoda uśredniania (ECA)	15.4	0.85	53.4	92.8	0.87	75

Spośród sieci neuronowo-rozmytych wybrano model 50\_lin\_fuzzy, którego wartość AUROC wynosiła 0.69. Następnie przy użyciu programu *Nets2010* uzyskano 50 reguł logicznych o charakterze liczbowym (tab. 12). Otrzymane reguły numeryczne przekształcono w ich reprezentację lingwistyczną. Uzyskane w ten sposób zbiór poddano analizie przy użyciu algorytmu drzewa decyzyjnego (*RandomTree*) w programie *WEKA*. W procedurze modelowania utworzono drzewo składające się z 17 liści i 5 rozgałęzień (ryc. 19). Model charakteryzował się wysoką wartością AUROC, tj. 0.97 oraz błędem całkowitym mniejszym niż 15%. W celu łatwiejszej interpretacji reguł w tabeli 13 przedstawiono zakresy liczbowe dla poszczególnych przedziałów.

**Tabela 12.** Wyniki testowania sześciu sieci neuronowo-rozmytych wytrenowanych na zbiorze danych 17in\_10cv. Kolorem czerwonym oznaczono sieć z której uzyskano reguły logiczne.

Architektura sieci	G1	G0	AUROC	Próg[%]	Iteracje	Zbiór
50_lin_fuzzy	13.41	96.83	0.69	88	20 mln	orig
90_lin_fuzzy	11.17	97.79	0.63	80	20 mln	orig
70_lin_fuzzy	10.29	97.52	0.64	95	20 mln	orig
70_lin_fuzzy	9.64	97.78	0.63	95	10 mln	orig
100_lin_fuzzy	9.34	97.84	0.58	87	20 mln	orig
95_lin_fuzzy	9.25	98.3	0.71	86	1 mln	orig

**Tabela 13.** Zakres liczbowy poziomów zmiennych przyjętych dla ekstrakcji reguł logicznych.

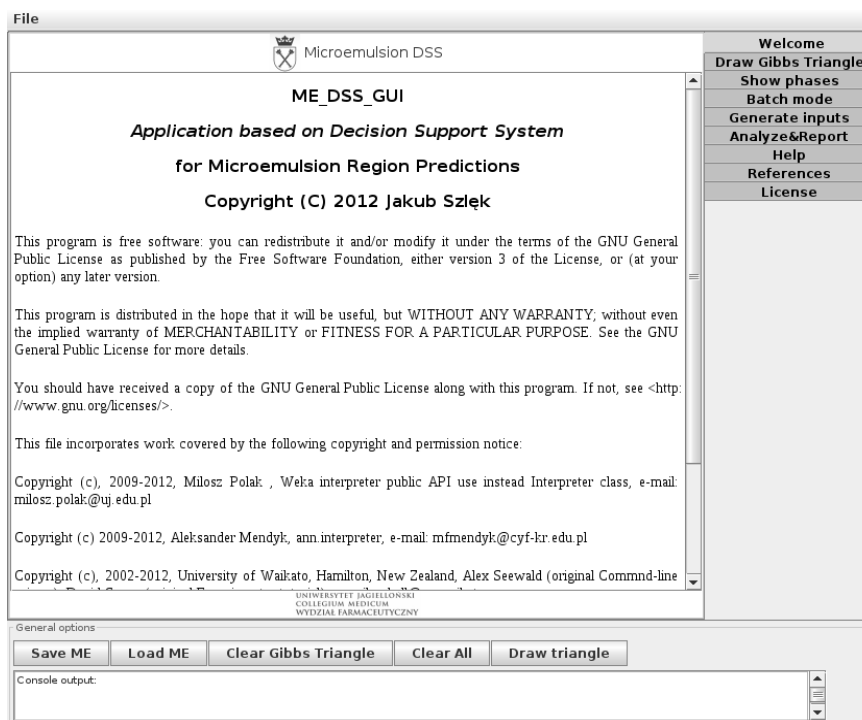
poziom	pI T	deskryptor ilości fragmentów cząsteczki T	indeks Balabana T	energia konformacyjna KT [kcal/mol]	zawartość TP [%]
Najniższy	0; 2.45	1; 1.2	1.61; 2.21	0; 6.4	0; 14.1
Niski	2.46; 4.9	1.3; 1.4	2.22; 2.82	6.5; 12.8	14.2; 28.1
Średni	4.91; 7.36	1.5; 1.6	2.83; 3.42	12.9; 19.2	28.2; 42.2
Wysoki	7.37; 9.81	1.7; 1.8	3.43; 4.03	19.3; 25.6	42.3; 56.3
Najwyższy	9.82; 12.3	1.9; 2	4.04; 4.63	25.7; 32	56.4; 70.





## 2. Charakterystyka opracowanej aplikacji komputerowej ME\_DSS do obsługi systemu wspomagania decyzji.

W celu ułatwienia obsługi systemu wspomagania decyzji, przy przewidywaniu obszarów mikroemulsji na podstawie składu jakościowego i ilościowego formułacji napisałem kod oprogramowania ME\_DSS (ryc. 20). Podstawę systemu stanowi graficzny interfejs użytkownika (*ang. Graphical User Interface, GUI*) z zaimplementowanym systemem wspomagania decyzji opartym na modelach sztucznych sieci neuronowych i modelu *RandomForest*.

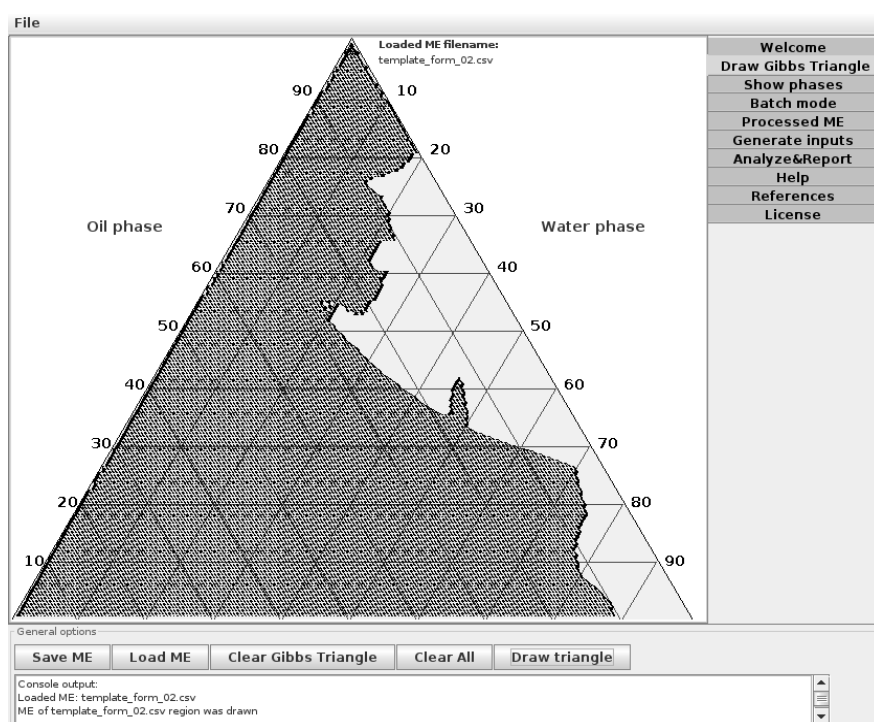


Rycina 20. Okno tytułowe programu ME\_DSS.

Program składa się z 18 klas i ponad 5 000 linii kodu. Aplikacja ME\_DSS posiada 4 główne moduły:

- moduł rysowania diagramów fazowych (ryc. 21),

- moduł predykcji pojedynczych punktów na diagramie fazowym oraz całych diagramów fazowych,
- moduł generowania formulacji do predykcji (ryc. 23),
- moduł do automatycznej optymalizacji składu mikroemulsji ze względu na zadane kryteria dotyczące zawartości fazy wodnej i olejowej układu mikroemulsyjnego (ryc. 24).



Rycina 21. Okno modułu rysowania trójkątów Gibbsa.

Ponadto w programie umieszczono dokumentację i instrukcję dotyczącą zasad korzystania z dostępnych funkcji. Każdy z modułów działa niezależnie i może być wybiórczo zastosowany podczas eksperymentu numerycznego. Modele stanowią odrębne pliki źródłowe kodu. Zaletą aplikacji jest możliwość ich zmiany. Wówczas wymagana jest ponowna kompilacja plików źródłowych. Skład ilościowy i jakościowy formulacji może być definiowany ręcznie lub z wykorzystaniem trybu automatycznego, tj. pracy w pętli. Program posiada także funkcję generowania formulacji plików wejściowych do przewidywania obecności mikroemulsji. W trybie ręcznym podawane są zakresy deskryptorów chemicznych i odstępów pomiędzy generowanymi

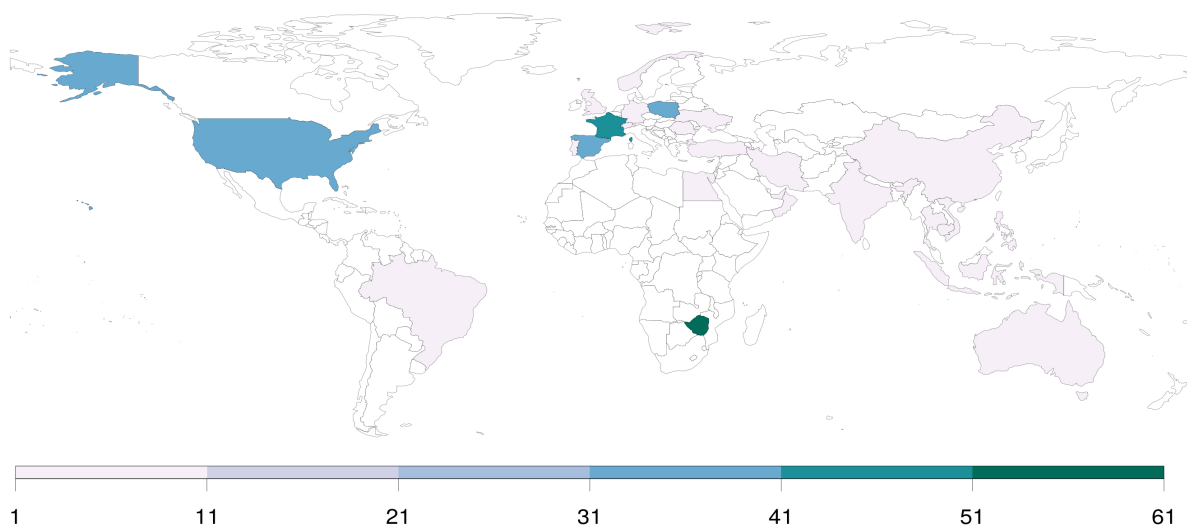


wartościami oraz proporcja tenzydu/kotenzydu/tenzydu pomocniczego. W trybie automatycznym podawane są w kolejnych kolumnach wartości, z których generator ma utworzyć macierz wszystkich możliwych kombinacji. Po wygenerowaniu plików wejściowych dla systemu, kolejnym etapem jest przewidywanie obecności mikroemulsji. Użytkownik może wybrać pomiędzy przewidywaniem pojedynczego punktu na diagramie fazowym pojedynczej formułacji lub kilku formułacji. Każdy trójkąt fazowy zapisywany jest w oddzielnym pliku tekstowym, który może być przekształcony w graficzny obraz trójkąta Gibbsa z zaznaczonymi obszarami mikroemulsji.

Przy użyciu modułu generatora można przewidzieć obszar występowania mikroemulsji. Wprowadzono również do programu moduł automatycznej optymalizacji. Analiza przewidzianych obszarów mikroemulsji polega na określeniu granicznych ilości fazy wodnej i olejowej, przy której powstanie mikroemulsja. Raport zawiera nazwy plików formułacji, posortowane zgodnie ze wzrastającą powierzchnią mikroemulsji, spełniających kryteria wyboru.

Opracowane oprogramowanie dostępne na licencji GNU GPL v3 jest darmowe i otwarte (ang. *Open-Source*). Aplikacja oraz pliki źródłowe umieszczone są na serwerze *sourceforge.net* (<http://sourceforge.net/projects/medss/>), szeroko znanym na świecie serwisie udostępniającym Wolne Oprogramowanie. Program został aktualnie pobrany około 300-krotnie przez użytkowników z 28 krajów z Europy, Azji, Ameryki Północnej i Południowej, Afryki oraz Australii (ryc. 22). Pojawiła się również zwrotna komunikacja od jego użytkowników świadcząca o zainteresowaniu tego typu oprogramowaniem.

Program może być uruchomiony na dowolnym komputerze z zainstalowaną maszyną wirtualną Java (ang. *Java Virtual Machine, JVM*). Java jest technologią dostępną w każdym szeroko stosowanym systemie operacyjnym dzięki czemu ME\_DSS może być uruchomiony w dowolnej konfiguracji sprzętowo-programowej. Oprogramowanie zostało przetestowane pod systemem operacyjnym Linux i Windows, zarówno na instalacjach natywnych jak też i maszynach wirtualnych [202]. Jest to aktualnie jedyny na świecie tego typu program komputerowy wyposażony w graficzny interfejs użytkownika i dostępny darmowo dla dowolnego systemu operacyjnego.



Rycina 22. Kraje z których pobierano program ME\_DSS. Skala barwna odzwierciedla ilość pobrań.

File

Qualitative values

Dre.En. KO-TE from:  to  Step

Bal.In. OL-PH from:  to  Step

Max.Proj.Ar. OL-PH from:  to  Step

Bal.In. TE from:  to  Step

Conn.Gra. TE from:  to  Step

Dre.En. TE from:  to  Step

Fr.Co. TE from:  to  Step

pl TE from:  to  Step

pH=14.00 TE from:  to  Step

Pl.En. TE from:  to  Step

HLB TE from:  to  Step

Ion.Str. WA-PH from:  to  Step

Quantitative values

OL-PH  to  Step

Ratio KO-TE from:  to  Step

Ratio TE from:  to  Step

Ratio MISC-TE from:  to  Step

WA-PH  to  Step

Use Internal Data  Use external file

Start Generating Inputs

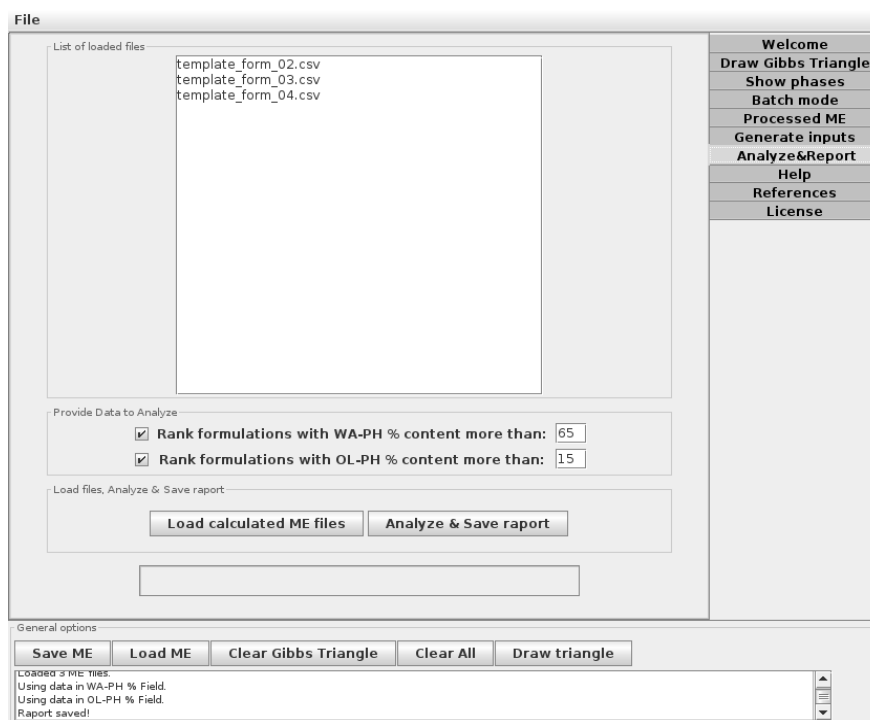
Restore Default Values

General options

Console output:  
 Loaded ME: template\_form\_02.csv  
 ME of template\_form\_02.csv region was drawn  
 Set formulations batch mode state changed.

[Welcome](#)  
[Draw Gibbs Triangle](#)  
[Show phases](#)  
[Batch mode](#)  
[Processed ME](#)  
[Generate inputs](#)  
[Analyze&Report](#)  
[Help](#)  
[References](#)  
[License](#)

Rycina 23. Okno modułu generowania formułacji mikroemulsji do predykcji.



Rycina 24. Okno modułu do automatycznej optymalizacji składu mikroemulsji.



### 3. Zastosowanie programu ME\_DSS do sporządzania mikroemulsji.

Składniki mikroemulsji, zależnie od właściwości i ich funkcji usystematyzowano w 4 grupach: olej, tenzyd, kotenzyd i ew. tenzyd pomocniczy (tab. 14). Biorąc pod uwagę stosunek ilościowy składników i ich rodzaj, przy użyciu ME\_DSS wygenerowano predykcje obszarów mikroemulsji dla 1008 trójkątów fazowych Gibbsa. Spośród nich, na podstawie wielowartościowego kryterium regułowego (rozdz. III.4.1) wytypowano dwadzieścia trójkątów fazowych (tab. 15), z których każdy spełniał minimum jeden warunek, tj. co najmniej jeden ze składników nie występował w zbiorze uczącym. Posłużyły one do oceny efektywności predykcji ME\_DSS.

#### *Walidacja ME\_DSS na przykładzie sporządzonych mikroemulsji.*

Ocenę sprawności systemu przeprowadzono na podstawie zastosowanych dwóch miar. Pierwszą było porównanie położenia środka geometrycznego kształtu przewidzianego przez ME\_DSS i obszaru mikroemulsji wyznaczonego eksperymentalnie (równ. 16, rozdz. III.3.1, str. 73), co jest uzasadnione największym prawdopodobieństwem uzyskania mikroemulsji pośrodku przewidzianego obszaru. Drugą miarą było porównanie eksperymentalnie wyznaczonych punktów w polu trójkąta z przewidzianymi przez ME\_DSS obszarami (równ. 12 – 15, rozdz. III.3.1, str. 73).

**Tabela 14.** Substancje pomocnicze użyte do sporządzania mikroemulsji.

T	KT	TP	O
Brij® 96, LSS, Tween® 80, Labrasol®, PEG400	Capmul® MCM, Brij® 96, PEG400, cytrynian trietylu	glikol propylenowy, cytrynian trietylu, Labrasol®, Capmul® MCM	IPM, Miglyol® 812N, Capmul® MCM

Spośród dwudziestu trójkątów fazowych przewidzianych przez system ME\_DSS w dziewiętnastu przypadkach potwierdzono eksperymentalnie obecność układów izotropowych. Porównanie położenia środka geometrycznego obszaru przewidzianego przez ME\_DSS i obszaru

mikroemulsji wyznaczonego eksperymentalnie wskazuje, że system poprawnie przewidział położenie obszaru mikroemulsji w czternastu z dwudziestu trójkałów fazowych uzyskując 70% skuteczność wg miary C1 (równ. 16, rozdz. III.3.1, str. 73). Środek geometryczny przewidzianego kształtu obszaru mikroemulsji dla układów ME01 – ME05, ME07 – ME09, ME13, ME14, ME16, ME17, ME19, ME20 (ryc. 25 - 29, 31 - 33, 37, 40, 41, 43, 44) znajdował się wewnątrz obszaru mikroemulsji wyznaczonego eksperymentalnie. W przypadku dwóch kolejnych układów tj. ME06 i ME12, środek geometryczny znajdował się na granicy obszaru wyznaczonego eksperymentalnie (ryc. 30, 36). Natomiast obszary mikroemulsji ME10, ME11, ME15, ME18 zostały błędnie przewidziane przez system (ryc. 34, 35).

**Tabela 15.** Skład jakościowy układów wyznaczonych przez program ME\_DSS.

trójkał Gibbsa	T	KT	TP	O	stosunek T+KT+TP
ME1	Brij® 96		-		1+1+0
ME2	LSS	Capmul® MCM	-	IPM	4+1+0
ME3	Tween® 80		-		1+1+0
ME4	Brij® 96		-	Miglyol® 812N	1+1+0
ME5	LSS	Brij® 96			1+9+10
ME6	Tween® 80		PG	IPM	1+9+10
ME7	Brij® 96		Labrasol®		4+1+1
ME8	Tween® 80	Capmul® MCM		Miglyol® 812N	1+1+1
ME9			TEC		1+1+1
ME10	Labrasol®		-	IPM	1+1+0
ME11	PEG400		-		1+1+0
ME12	LSS				1+10+9
ME13	Tween® 80	PEG400	Capmul® MCM		1+1+1
ME14	Brij® 96			IPM	1+1+1
ME15	LSS		PG		1+10+9
ME16	Labrasol®	Brij® 96	Capmul® MCM		1+1+1
ME17			-		1+1+0
ME18	Brij® 96	TEC	-	Capmul® MCM	1+1+0
ME19	Tween® 80		-		1+1+0
ME20	Labrasol®	Brij® 96	-	Miglyol® 812N	1+1+0

LSS, laurylosiarczan sodu; IPM, izopropylu mirystynian; TEC, cytrynian trietylu; PG, propylenowy glikol.

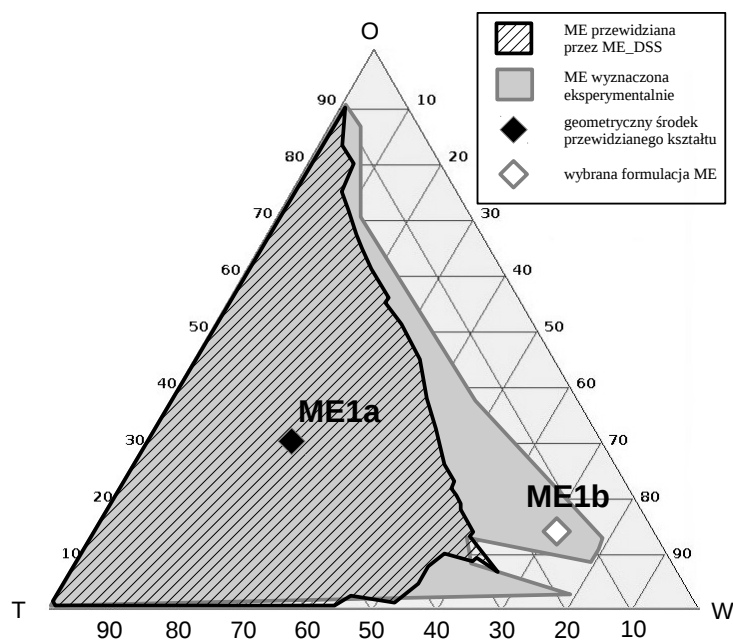
Eksperymentalne określenie obszaru występowania mikroemulsji stało się podstawą do utworzenia zewnętrznego zbioru walidacyjnego. Obszary trójkątów fazowych próbkowano w celu określenia obecności (liczba 1) lub braku (liczba 0) mikroemulsji stosując metodę miareczkowania bezwodnych mikroemulsji wodą. W ten sposób dla każdego trójkąta uzyskano 765 punktów stanowiących zewnętrzny zbiór walidacyjny. Łącznie zbiór składał się z 15 300 punktów wyznaczonych eksperymentalnie, wśród których 1900 stanowiły punkty, w których obserwowano powstanie mikroemulsje, a 13 400 stanowiły punkty, w których mikroemulsja nie powstała. Przewidziane przez ME\_DSS obszary występowania mikroemulsji wraz z wyznaczonymi eksperymentalnie obszarami przedstawiono na rycinach 25 – 44.

**Tabela 16.** Walidacja ME\_DSS na zewnętrznym zbiorze eksperymentalnym.

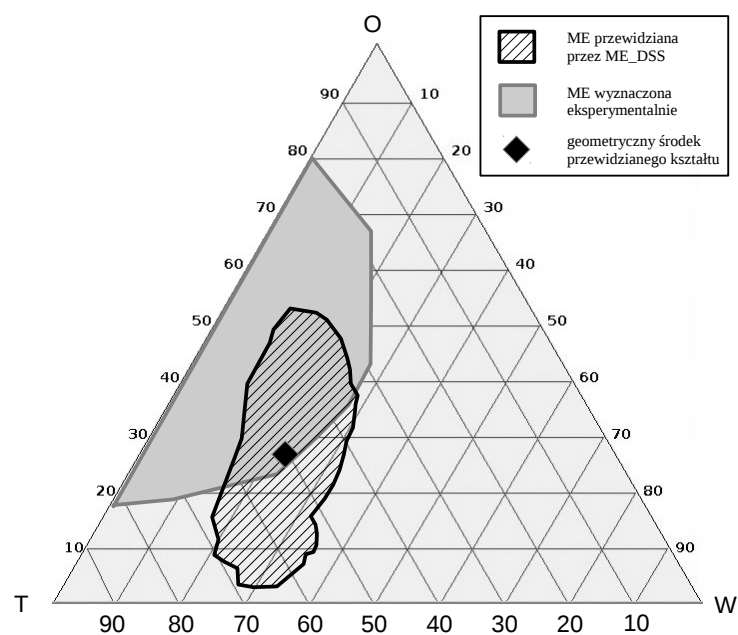
	<b>G0</b>	<b>G1</b>	<b>EF</b>	<b>EG</b>	<b>C1</b>
ME_DSS	90.44%	52.51%	0.857	14.25%	70%

C1, ilość poprawnie przewidzianych środków geometrycznych obszaru mikroemulsji; EG, błąd całkowity; EF, skuteczność systemu; G1, ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji; G0, ilość decyzji prawdziwie negatywnych.

Porównując punkty wyznaczone eksperymentalnie z obszarem mikroemulsji przewidzianym przez ME\_DSS, wyliczono parametry charakteryzujące jakość opracowanego systemu (tab. 16). Program ME\_DSS przewidział powstanie mikroemulsji w 994 punktach na 1900 oraz brak wystąpienia mikroemulsji w 12 134 na 13 400 punktów. Błąd całkowity (EG) na poziomie 14%, ilość poprawnie sklasyfikowanych mikroemulsji (G1) 52% i ilość decyzji prawdziwie negatywnych (G0) na poziomie 90% są porównywalne z otrzymanymi wcześniej wynikami uzyskanymi dla sieci neuronowych trenowanych na zbiorach utworzonych zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania [150].

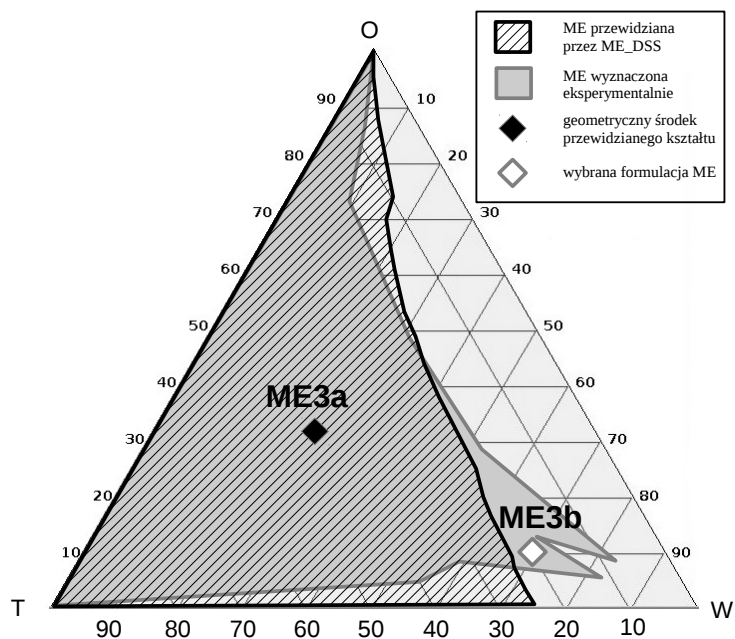


**Rycina 25.** Obraz trójkąta ME1 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

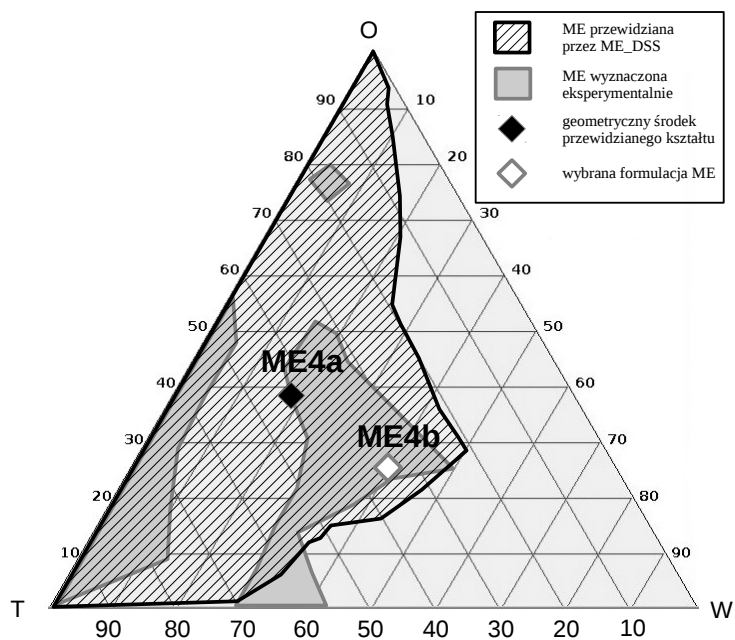


**Rycina 26.** Obraz trójkąta ME2 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

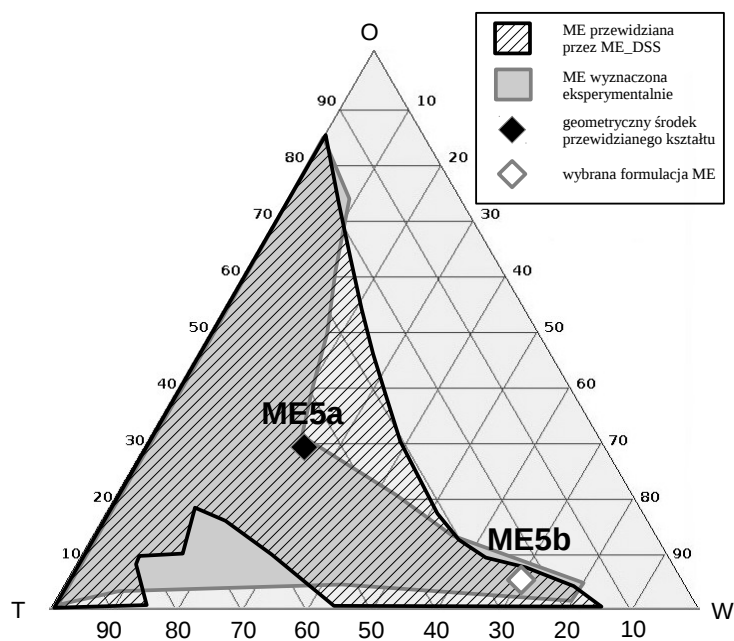




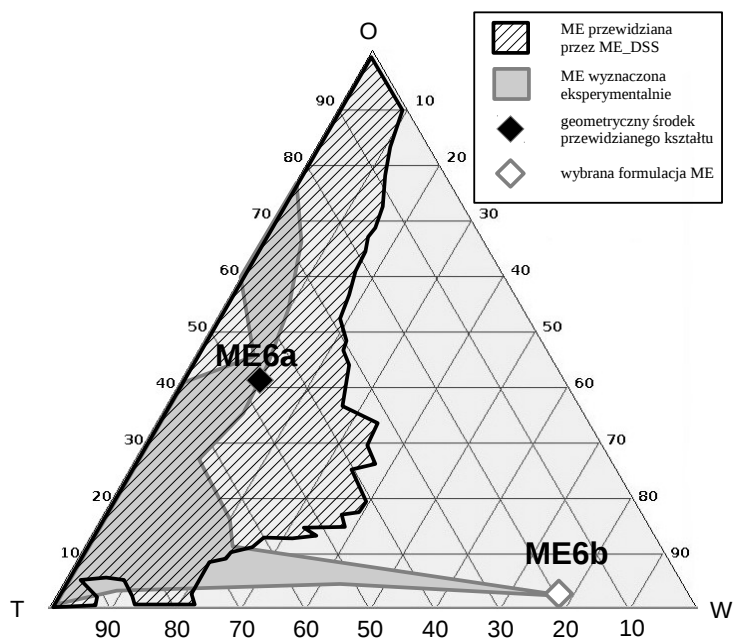
**Rycina 27.** Obraz trójkąta ME3 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



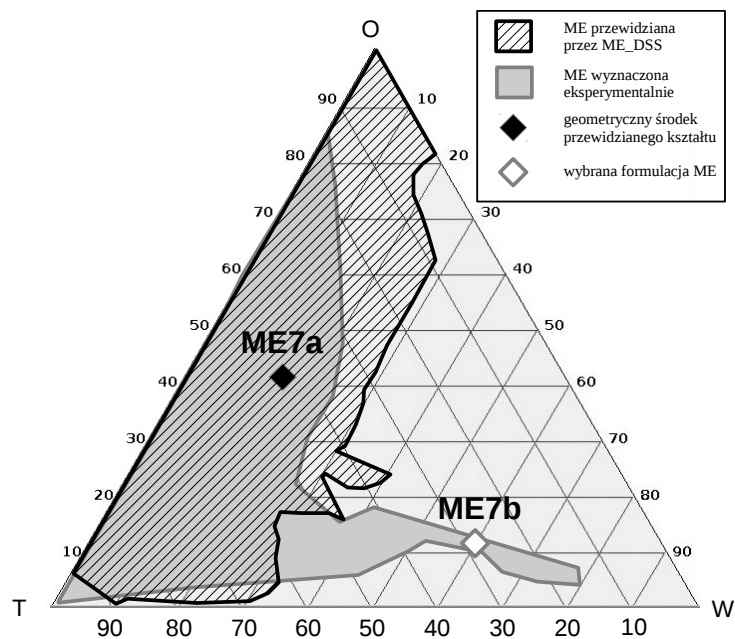
**Rycina 28.** Obraz trójkąta ME4 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



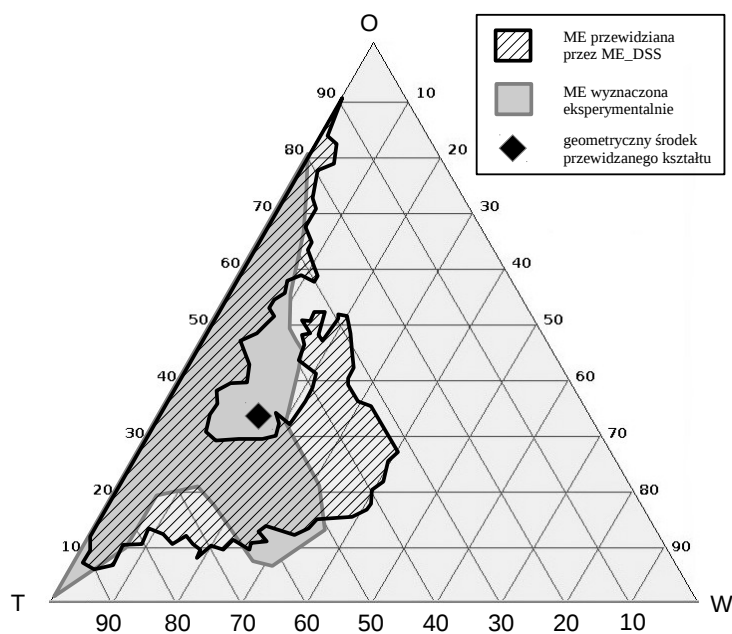
Rycina 29. Obraz trójkąta ME5 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



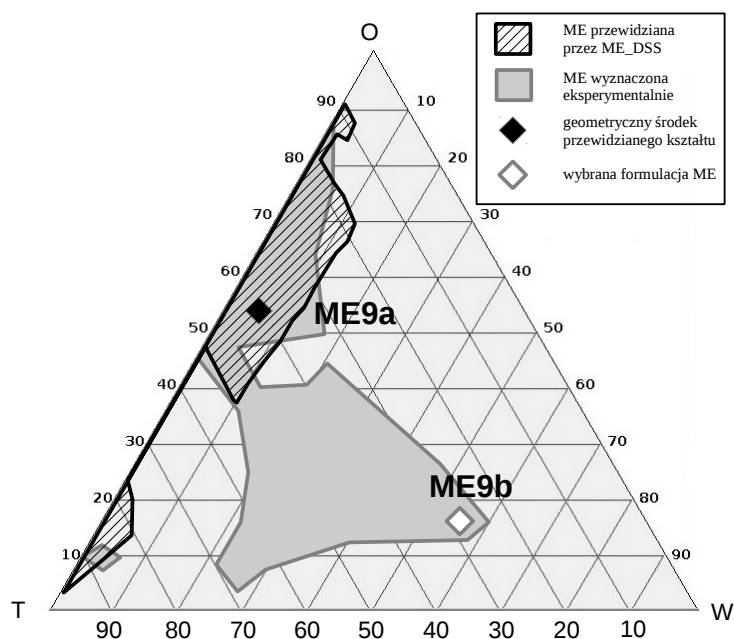
Rycina 30. Obraz trójkąta ME6 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



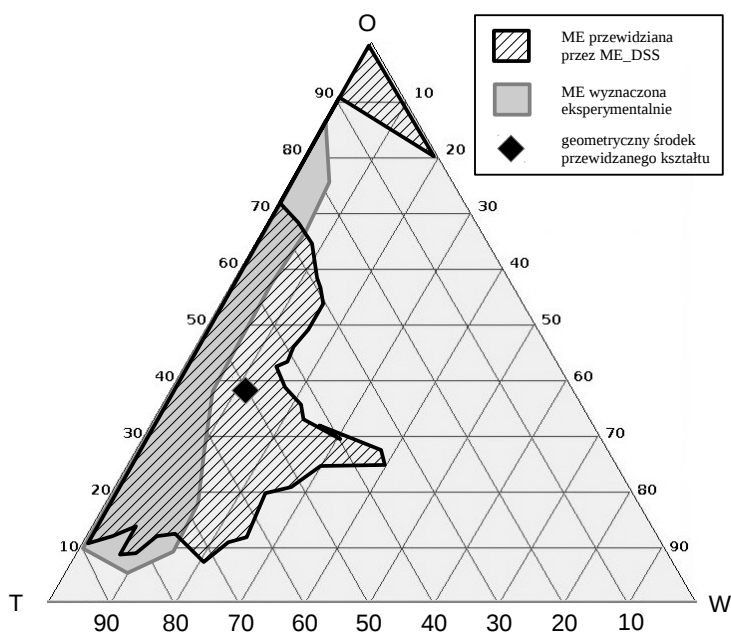
**Rycina 31.** Obraz trójkąta ME7 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



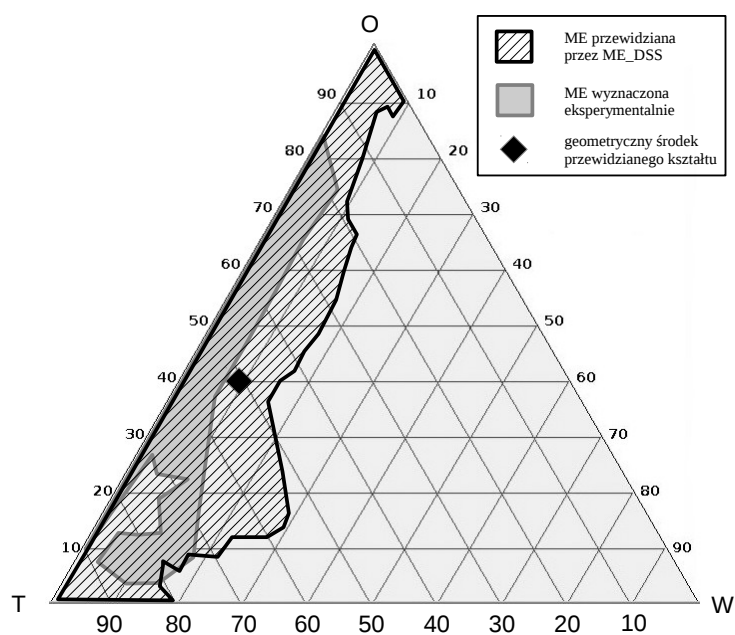
**Rycina 32.** Obraz trójkąta ME8 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



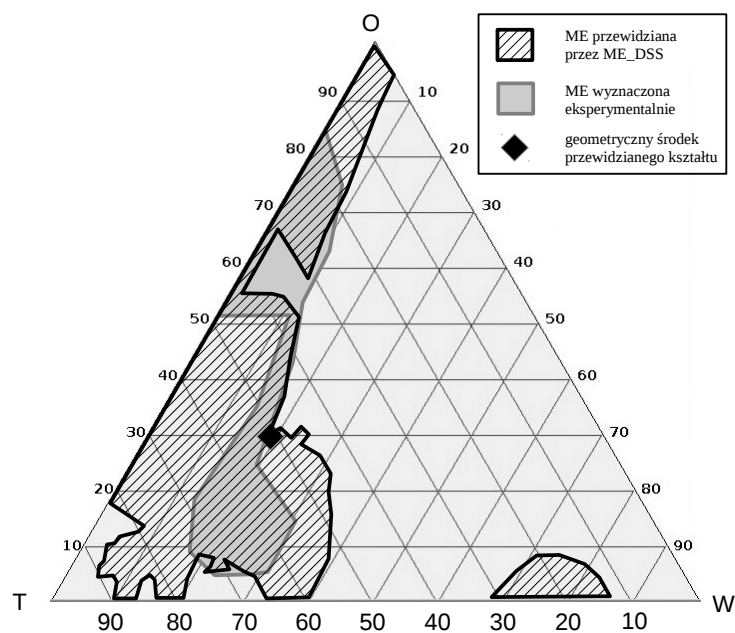
Rycina 33. Obraz trójkąta ME9 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



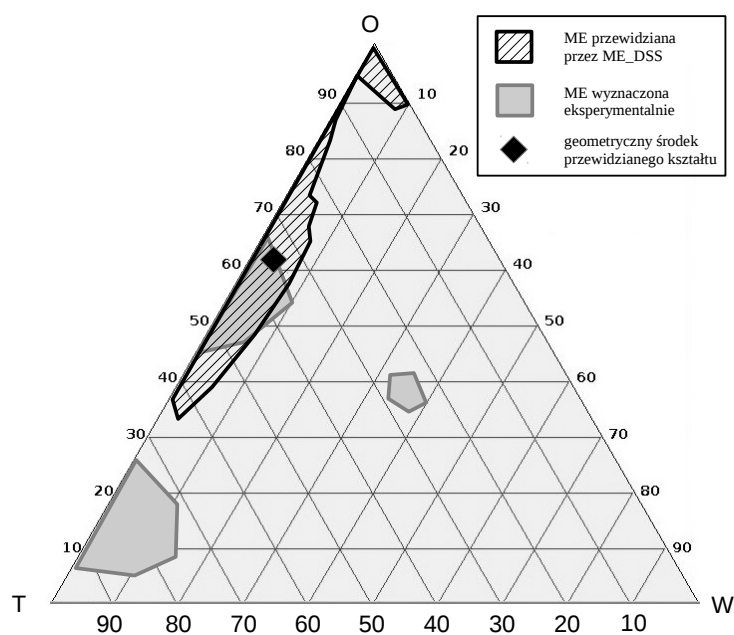
Rycina 34. Obraz trójkąta ME10 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



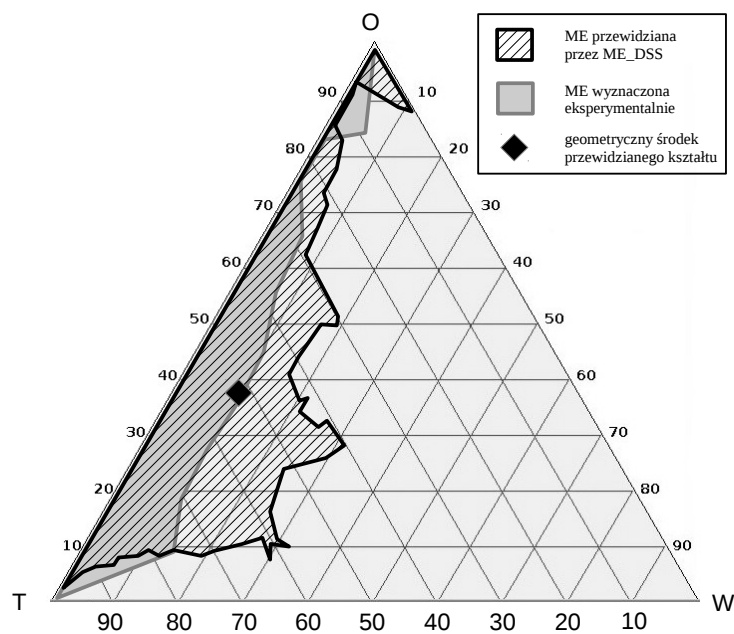
Rycina 35. Obraz trójkąta ME11 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



Rycina 36. Obraz trójkąta ME12 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

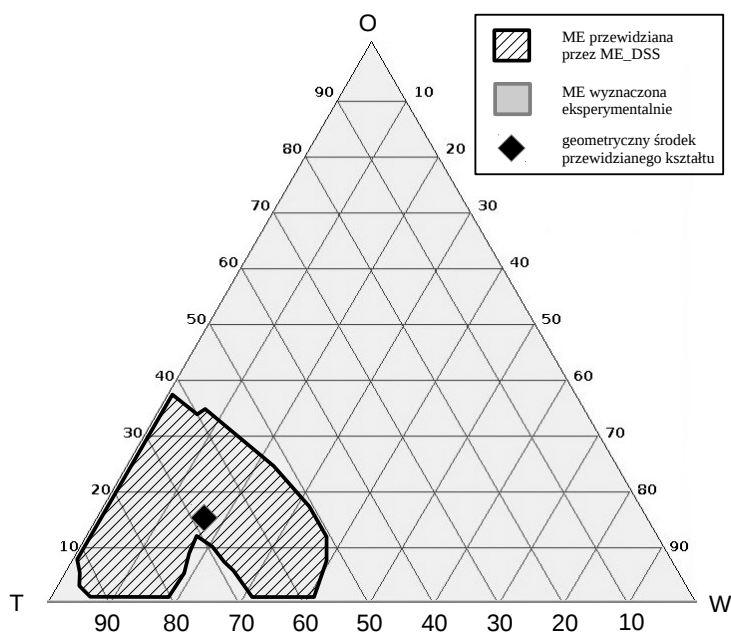


**Rycina 37.** Obraz trójkąta ME13 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

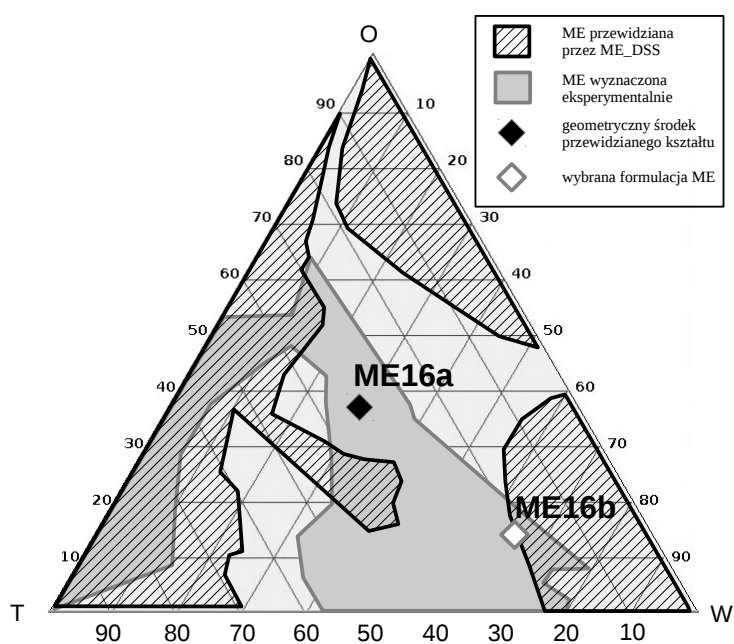


**Rycina 38.** Obraz trójkąta ME14 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

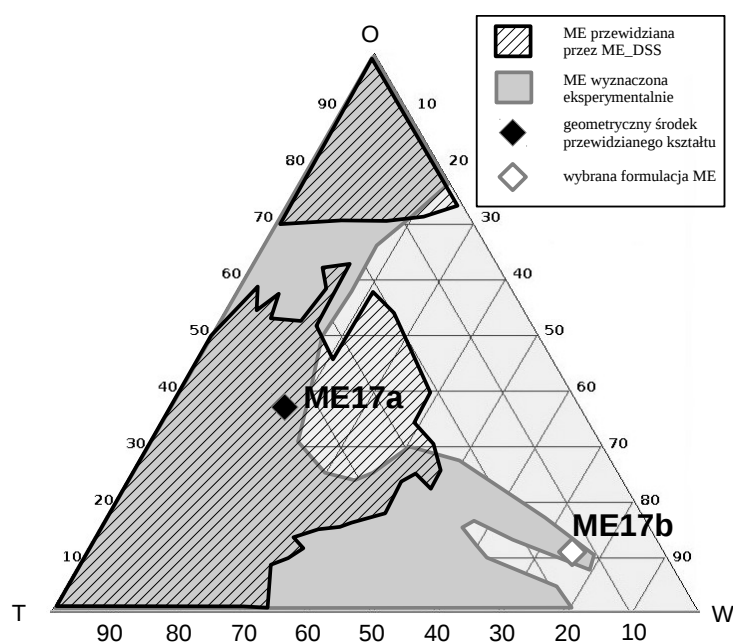




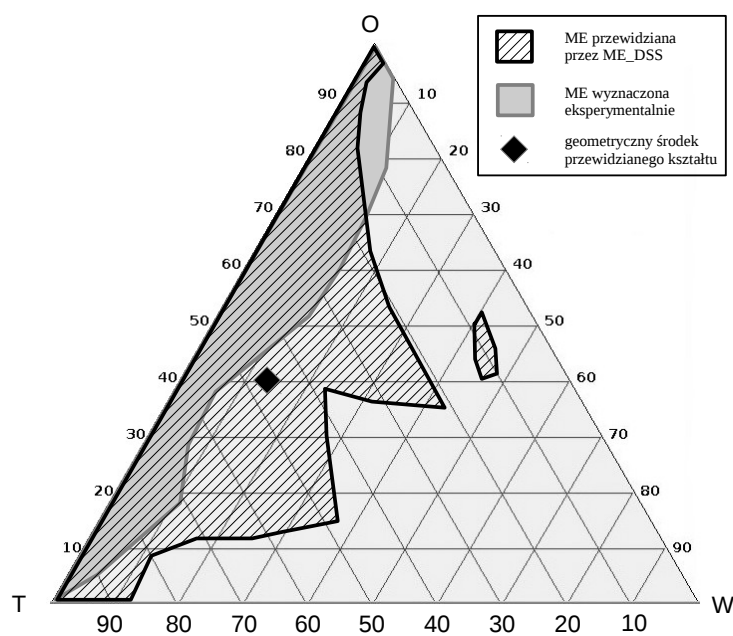
Rycina 39. Obraz trójkąta ME15 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



Rycina 40. Obraz trójkąta ME16 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

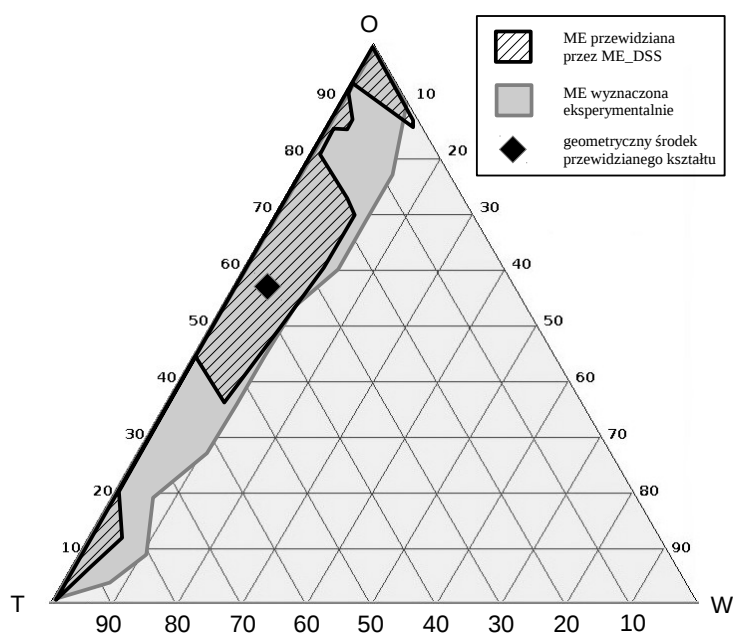


**Rycina 41.** Obraz trójkąta ME17 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

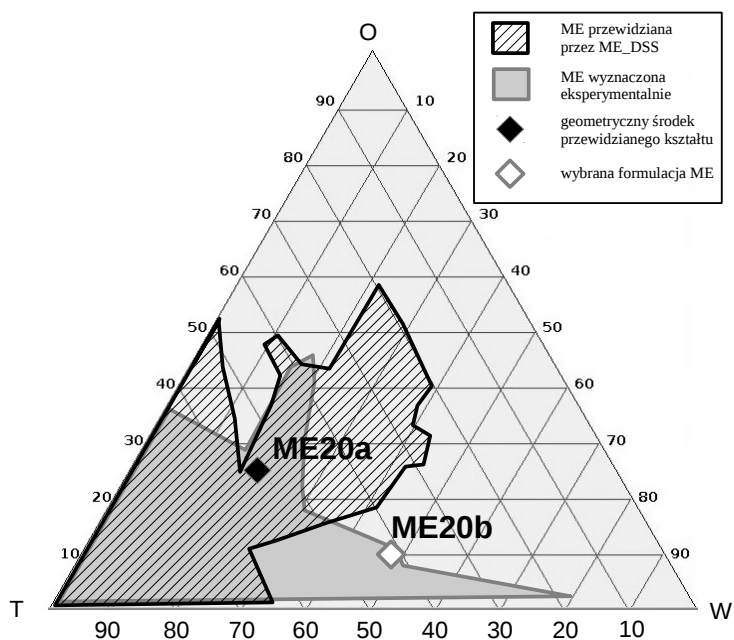


**Rycina 42.** Obraz trójkąta ME18 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.





**Rycina 43.** Obraz trójkąta ME19 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.



**Rycina 44.** Obraz trójkąta ME20 wygenerowany przez ME\_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.

### Właściwości fizykochemiczne sporządzonych mikroemulsji.

Spośród analizowanych 20 trójkątów Gibbsa (ME1 – ME20, tab. 15), do oceny właściwości układów mikroemulsyjnych wybrano 10 trójkątów fazowych, w których zidentyfikowano układy o największej powierzchni obszaru mikroemulsyjnego. Wybrano dwa punkty z wyznaczonego obszaru dla każdego układu tj. punkt odpowiadający środkowi geometrycznemu przewidzianego obszaru mikroemulsji oznaczony literą „a” oraz punkt leżący w obrębie eksperymentalnie wyznaczonego obszaru mikroemulsyjnego, ale o zawartości wody większej o co najmniej 20% w stosunku do formulacji „a” („b”). W ten sposób określono składy 20 układów mikroemulsyjnych, 15 czteroskładnikowych zawierających fazę wodną, olejową, tenzyd i kotenzyd oraz pięć wzbogaconych o tzw. tenzyd pomocniczy (tab. 17). Po ich sporządzeniu dokonano oceny ich właściwości fizykochemicznych oraz stabilności.

Stosując metodę barwnikową stwierdzono, że mikroemulsje serii „a” są układami typu w/o, z wyjątkiem układu ME5a, natomiast układy serii „b” są typu o/w, z wyjątkiem ME4b. Po rozcieńczeniu wodą w równej ilości w stosunku do ich masy trzy układy spośród mikroemulsji typu w/o (ME1a, ME3a, ME17a) oraz cztery układy typu o/w (ME3b, ME16b, ME17b, ME20b) były klarowne. Pozostałe układy zarówno serii „a” i „b” uległy zmętnieniu lub rozwarstwieniu.

Analizę eksploracyjną danych charakteryzujących badane mikroemulsje przeprowadzono przy użyciu techniki klasteryzacji hierarchicznej. Zastosowanie tej techniki pozwoliło ustalić wspólne cechy formulacji, które sprzyjały powstawaniu stabilnych mikroemulsji. Metoda klasteryzacji polega na grupowaniu elementów w klasy, w ten sposób aby ich składowe były podobne do siebie, a jednocześnie poszczególne grupy były jak najbardziej zróżnicowane. Wyniki klasteryzacji hierarchicznej są przedstawiane w formie drzewa zwanego dendrogramem [200]. Do przeprowadzenia analizy wybrano pakiet *pvclust* środowiska statystycznego R, który oprócz klasteryzacji umożliwia także ocenę prawdopodobieństwa wyodrębnienia poszczególnych klas, tzw. separowalność [199]. Podstawę do utworzenia bazy danych stanowiły wyniki właściwości fizykochemicznych 17 formulacji przedstawionych w tabeli 18. Formułacje ME5a, ME5b i ME6a zostały wykluczone z uwagi na otrzymane w badaniach wartości zmętnienia spoza zakresu wyznaczonego na podstawie krzywej wzorcowej (tab. 18).

W wyniku przeprowadzonej klasteryzacji hierarchicznej, z prawdopodobieństwem  $p=95\%$ , wyodrębniono dwie grupy mikroemulsji (ryc. 45):

- ME4b, ME7b, ME9b, ME16b – klaster K1
- ME1a, ME3a, ME3b, ME4a, ME6b, ME7a, ME9a, ME16a, ME17a, ME17b, ME20a, ME20b – klaster K2

Tabela 17. Skład mikroemulsji serii „a” i serii „b”.

formulacja	T	KT	TP	O	skład ilościowy [%] W / T / KT / TP / O
ME1a ME1b	Brij® 96	Capmul® MCM	-	IPM	23 / 23.5 / 23.5 / - / 30 70 / 7.5 / 7.5 / - / 15
ME3a ME3b	Tween® 80	Capmul® MCM	-	IPM	24 / 23.5 / 23.5 / - / 29 70 / 10 / 10 / - / 10
ME4a ME4b	Brij® 96	Capmul® MCM	-	Miglyol® 812N	20 / 20 / 20 / - / 40 40 / 17.5 / 17.5 / - / 25
ME5a ME5b	LSS	Glikol prop.	Brij® 96	IPM	22.5 / 2.4 / 21.4 / 23.7 / 30 70 / 1.25 / 11.25 / 12.5 / 5
ME6a ME6b	Tween® 80	Glikol prop.	Capmul® MCM	IPM	10 / 16.7 / 16.7 / 16.7 / 40 66 / 7 / 7 / 7 / 13
ME7a ME7b	Brij® 96	Capmul® MCM	Labrasol®	Miglyol® 812N	15 / 30 / 7.5 / 7.5 / 40 60 / 20 / 5 / 5 / 10
ME9a ME9b	Tween® 80	TEC	Capmul® MCM	IPM	5 / 13.3 / 13.3 / 13.3 / 55 55 / 10 / 10 / 10 / 15
ME16a ME16b	Labrasol®	Brij® 96	Capmul® MCM	IPM	30 / 11 / 11 / 11 / 37 65 / 6.66 / 6.66 / 6.66 / 15
ME17a ME17b	Labrasol®	Brij® 96	-	Capmul® MCM	16 / 22.5 / 22.5 / - / 39 77.5 / 6.25 / 6.25 / - / 10
ME20a ME20b	Labrasol®	Brij® 96	-	Miglyol® 812N	20 / 27 / 27 / - / 26 47.5 / 21.25 / 21.25 / - / 10

IPM, mirystynian izopropylu; LSS, laurylosiarczan sodu



**Tabela 18.** Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych.

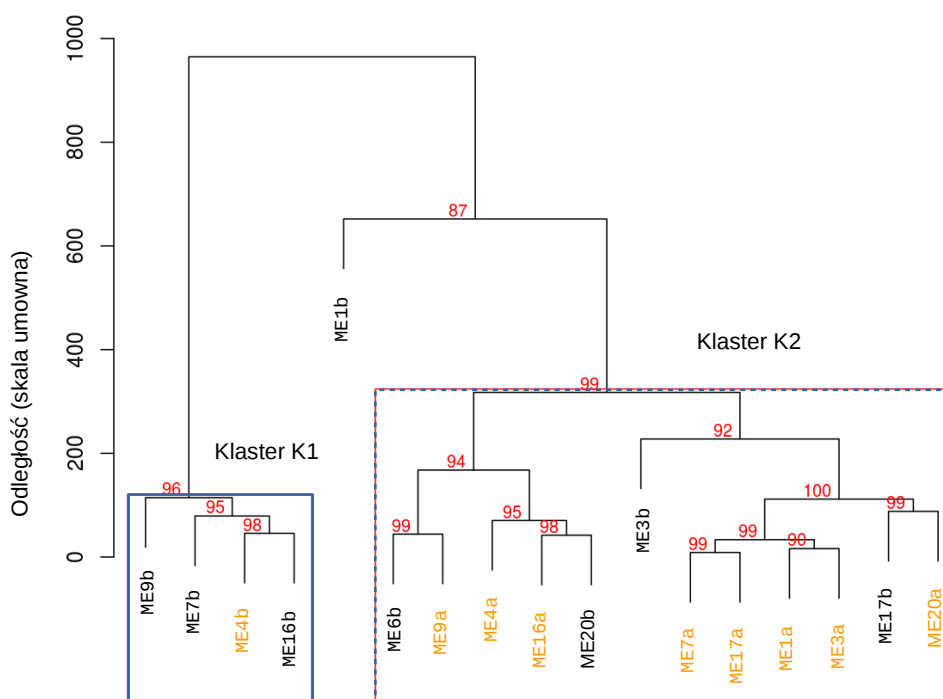
formulacja	pH	przewodnictwo [ $\mu$ S/cm]	gęstość [g/mL]	lepkość [mPa·s]	zmętnienie [NTU]	współczynnik refrakcji	napięcie powierzchniowe [mN/m]	typ mikroemulsji	rozcień- czanie wodą	klaster
ME1a	5.79 ± 0.02	47.77 ± 0.92	0.9485	101.3 ± 0.9	12.22 ± 0.14	1.425	28.62 ± 0.11	w/o	+	K2
ME3a	4.73 ± 0.02	41.93 ± 0.42	0.9723	90.3 ± 1.6	2.04 ± 0.03	1.424	28.62 ± 0.03	w/o	+	K2
ME4a	5.39 ± 0.03	112.63 ± 0.90	0.9692	78.4 ± 1.0	2.04 ± 0.02	1.434	28.85 ± 0.13	w/o	-	K2
ME4b	5.36 ± 0.01	253.00 ± 3.00	0.9921	93.3 ± 6.5	5.94 ± 0.16	1.407	27.74 ± 0.06	w/o	-	K1
ME6a	5.43 ± 0.02	0.56 ± 0.08	0.9511	30.0 ± 2.7	> 200	1.426	28.27 ± 0.06	w/o	-	-
ME7a	4.86 ± 0.00	29.67 ± 0.21	0.9893	109.1 ± 1.3	7.29 ± 0.09	1.441	30.37 ± 0.04	w/o	-	K2
ME9a	5.77 ± 0.00	0.56 ± 0.14	0.9371	28.4 ± 0.6	0.70 ± 0.01	1.436	29.05 ± 0.13	w/o	-	K2
ME16a	3.11 ± 0.05	88.50 ± 0.71	0.9562	28.1 ± 0.3	3.78 ± 0.04	1.415	29.91 ± 0.42	w/o	-	K2
ME17a	5.17 ± 0.05	32.43 ± 0.17	1.0274	113.6 ± 0.7	0.31 ± 0.00	1.442	29.90 ± 0.08	w/o	+	K2
ME20a	6.02 ± 0.07	16.60 ± 0.31	1.0136	176.7 ± 1.4	0.84 ± 0.02	1.437	30.62 ± 0.09	w/o	-	K2

**Tabela 18 cd.** Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych.

formulacja	pH	przewodnictwo [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	gęstość [g/mL]	lepkość [mPa·s]	zmętnienie [NTU]	współczynnik refrakcji	napięcie powierzchniowe [mN/m]	typ mikroemulsji	rozcień- czanie wodą	klaster
ME1b	$5.68 \pm 0.02$	$14.43 \pm 0.31$	0.9805	$476.8 \pm 20.8$	$27.22 \pm 1.03$	1.383	$36.22 \pm 0.66$	o/w	-	-
ME3b	$5.45 \pm 0.01$	$25.90 \pm 0.72$	0.9896	$110.6 \pm 7.1$	$166.26 \pm 1.95$	1.368	$32.74 \pm 0.58$	o/w	+	K2
ME5a	$7.65 \pm 0.01$	$152.83 \pm 0.45$	0.9728	47044.4	> 200	1.421	b.d.	o/w	-	-
ME5b	$5.70 \pm 0.02$	$444.00 \pm 1.00$	1.0086	$9.6 \pm 0.4$	> 200	1.369	$30.31 \pm 0.13$	o/w	-	-
ME6b	$5.59 \pm 0.05$	$33.03 \pm 0.85$	1.0092	$23.7 \pm 0.1$	$30.18 \pm 0.03$	1.373	$28.38 \pm 0.05$	o/w	-	K2
ME7b	$5.38 \pm 0.00$	$321.00 \pm 2.65$	1.0023	$57.3 \pm 1.8$	$1.70 \pm 0.04$	1.381	$29.70 \pm 0.10$	o/w	-	K1
ME9b	$4.66 \pm 0.01$	$251.33 \pm 4.04$	0.9925	$44.9 \pm 2.6$	$93.55 \pm 0.06$	1.385	$28.81 \pm 0.06$	o/w	-	K1
ME16b	$5.40 \pm 0.01$	$259.33 \pm 2.52$	0.9821	$49.9 \pm 0.6$	$18.81 \pm 0.15$	1.374	$28.35 \pm 0.03$	o/w	+	K1
ME17b	$5.46 \pm 0.01$	$34.53 \pm 0.35$	1.0105	$122.0 \pm 1.4$	$67.35 \pm 0.01$	1.361	$27.23 \pm 0.08$	o/w	+	K2
ME20b	$5.35 \pm 0.04$	$125.60 \pm 0.72$	1.0060	$8.6 \pm 0.1$	$0.32 \pm 0.03$	1.358	$29.81 \pm 0.02$	o/w	+	K2

Klaster K1 zawierał trzy mikroemulsje typu o/w (ME7b, ME9b, ME16b) i jedną typu w/o (ME4b), zaś klaster K2 cztery układy typu o/w (ME3b, ME6b, ME17b i ME20b) i osiem układów typu w/o (ME1a, ME3a, ME4a, ME7a, ME9a, ME16a, ME17a i ME20a). Ze względu na odmienne właściwości fizykochemiczne od pozostałych formułacji mikroemulsja ME1b nie została przyporządkowana do żadnego z klastrów (ryc. 45).

Na podstawie wartości środkowych właściwości fizykochemicznych z klastrów K1 i K2 wykazano, że największe różnice pomiędzy klastrami dotyczą następujących parametrów: przewodnictwa, lepkości oraz stopnia zmętnienia układów (tab. 19).



**Rycina 45.** Dendrogram dla klasteryzacji hierarchicznej właściwości fizykochemicznych mikroemulsji. W rozgałęzieniach podano wartości procentowe przybliżonego nieobciążonego estymatora prawdopodobieństwa wyodrębnienia poszczególnych klas mikroemulsji.

(Niebieska linia ciągła – mikroemulsje klastra K1; niebieska przerywana linia – mikroemulsje klastra K2; kolor czarny układy typu o/w, żółty w/o).

W pierwszej grupie (klaster K1) znajdują się układy o medianie wartości przewodnictwa 256.2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , lepkości 53.6  $\text{mPa}\cdot\text{s}$  oraz stopniu zmętnienia 12.4 NTU. Mikroemulsje klastra K2 charakteryzowały się 8-krotnie niższą wartością przewodnictwa, około 2-krotnie wyższą lepkością oraz 4-krotnie niższym stopniem zmętnienia (tab. 19).

**Tabela 19.** Wartości środkowe (mediana) właściwości fizykochemicznych mikroemulsji klastra K1 i K2. W nawiasach podano odchylenie kwartylne.

właściwości fizykochemiczne	klaster	
	K1	K2
pH	5.37 (0.31)	5.42 (0.27)
Przewodnictwo [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	256.2 (11.1)	33.8 (14.6)
Gęstość [ $\text{g}/\text{mL}$ ]	0.992 (0.003)	0.989 (0.022)
Lepkość [ $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ]	53.6 (8.8)	95.8 (41.5)
Zmętnienie [NTU]	12.4 (16.3)	2.9 (8.0)
Współczynnik refrakcji	1.383 (0.006)	1.425 (0.032)
Napięcie powierzchniowe [ $\text{mN}/\text{m}$ ]	28.58 (0.42)	29.05 (0.70)

Ocenę struktury mikroemulsji poszczególnych klastrów wykonano na podstawie analizy obrazu zdjęć z mikroskopu skaningowego wykonanych metodą zamrażania i łamania. Na podstawie wyliczeń odległości euklidesowej właściwości fizykochemicznych poszczególnych układów wybrano reprezentatywne obrazy dla każdego z klastrów K1 (ME16b), K2 (ME17b) oraz mikroemulsję ME1b (ryc. 46). Następnie przy użyciu programu *ImageJ* [1] obrazy przeskalowano i wykadrowano, a deskryptory charakteryzujące tzw. chropowatość amplitudową próbek obliczono używając rozszerzenia *SurfCharJ* [38]. Parametry amplitudowe opisujące badany materiał wprowadzają statystyczną informację na temat kształtu, rozkładu wysokości oraz podstawowych własności próbki. Obliczone parametry chropowatości obejmowały m.in. skośność ( $R_{sk}$ ) i kurtozę profilu powierzchni ( $R_{ku}$ ), maksymalną wysokość pików ( $R_p$ ) i zagłębień ( $R_v$ ) oraz znormalizowaną względem topologii powierzchnię próbki ( $SA$ ).

Jeżeli powierzchnia próbki charakteryzuje się symetrycznym rozkładem wysokości pików wtedy wartości parametru  $R_{sk}$  są zbliżone do 0. Jeżeli na powierzchni próbki obecne są piki i zagłębienia o zmiennej amplitudzie wówczas deskryptor ten przyjmuje wartości dodatnie, zwykle



większe od 1. Kurtoza profilu powierzchni (Rku) jest miarą spłaszczenia powierzchni w porównaniu z rozkładem normalnym, dla którego parametr ten przyjmuje wartość 0. Wartości ujemne są charakterystyczne dla szerokich i płaskich pików, natomiast wartości ujemne wskazują na obecność wyższych i bardziej wąskich pików.

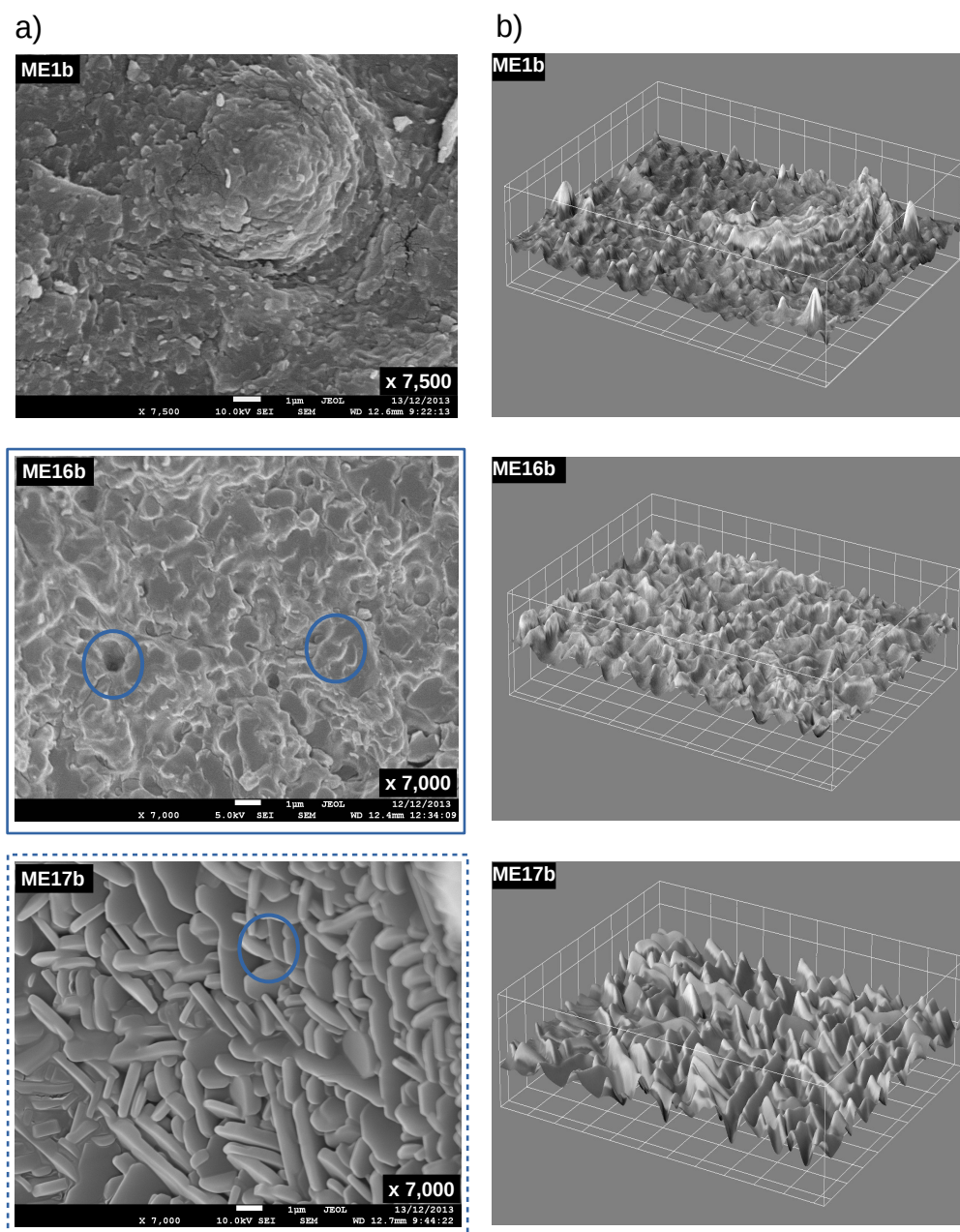
Na podstawie odchyłeń względnych wykazano, że największe różnice w parametrach chropowatości dotyczą skośności (Rsk) i kurtozy profilu powierzchni (Rku) oraz znormalizowanej względem topologii powierzchni próbki (SA). Natomiast w przypadku maksymalnej wysokości pików (Rp) i zagłębień (Rv) odchylenia względne były niewielkie (tab. 20).

**Tabela 20.** Deskryptory powierzchni obliczone na podstawie analizy obrazu zdjęć z mikroskopu skaningowego.

formulacja	Rsk	Rku	Rv	Rp	SA
ME1b	0.982	1.3391	-95.4197	127.0202	435.5652
ME16b	0.6157	0.1659	-96.8978	109.6927	479.1176
ME17b	0.1476	-0.3038	-93.8894	100.3515	282.3092
S <sub>rel</sub> ME1b [%]	122.27	210.30	3.15	34.64	45.18
S <sub>rel</sub> ME16b [%]	135.52	990.30	4.63	24.31	50.17
S <sub>rel</sub> ME17b [%]	882.45	695.39	4.83	35.88	124.00

Na podstawie wartości chropowatości obrazów mikroemulsji wykazano, że układ **ME17b** charakteryzuje się symetrycznym rozkładem pików i dolin (Rsk zbliżony do 0), których kształt jest płaski (ujemna wartość Rku). W konsekwencji powierzchnia przełamu próbki jest najmniejsza (SA około 282). Charakterystyka układu **ME17b** wskazuje na obecność w strukturze wydłużonych, płaskich aglomeratów cząstek fazy rozproszonej (ryc. 46, niebieski owal).

Z kolei mikroemulsja **ME16b** charakteryzuje się obecnością większej ilości pików (Rsk około 0.61) o kształcie zbliżonym do paraboli (Rku = 0.16). Charakterystyka mikroemulsji **ME16b** wskazuje na obecność sieci kanałów oraz nielicznych zagłębień, które odpowiadają micelom usuniętym z powierzchni w trakcie przygotowywania próbki (ryc. 46, niebieskie owale).



**Rycina 46.** Obrazy mikroemulsji wykonane przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej z zamrażaniem i łamaniem próbki (a). Topologiczne przekształcenie obrazów wykonane przy użyciu programu *ImageJ* (b).

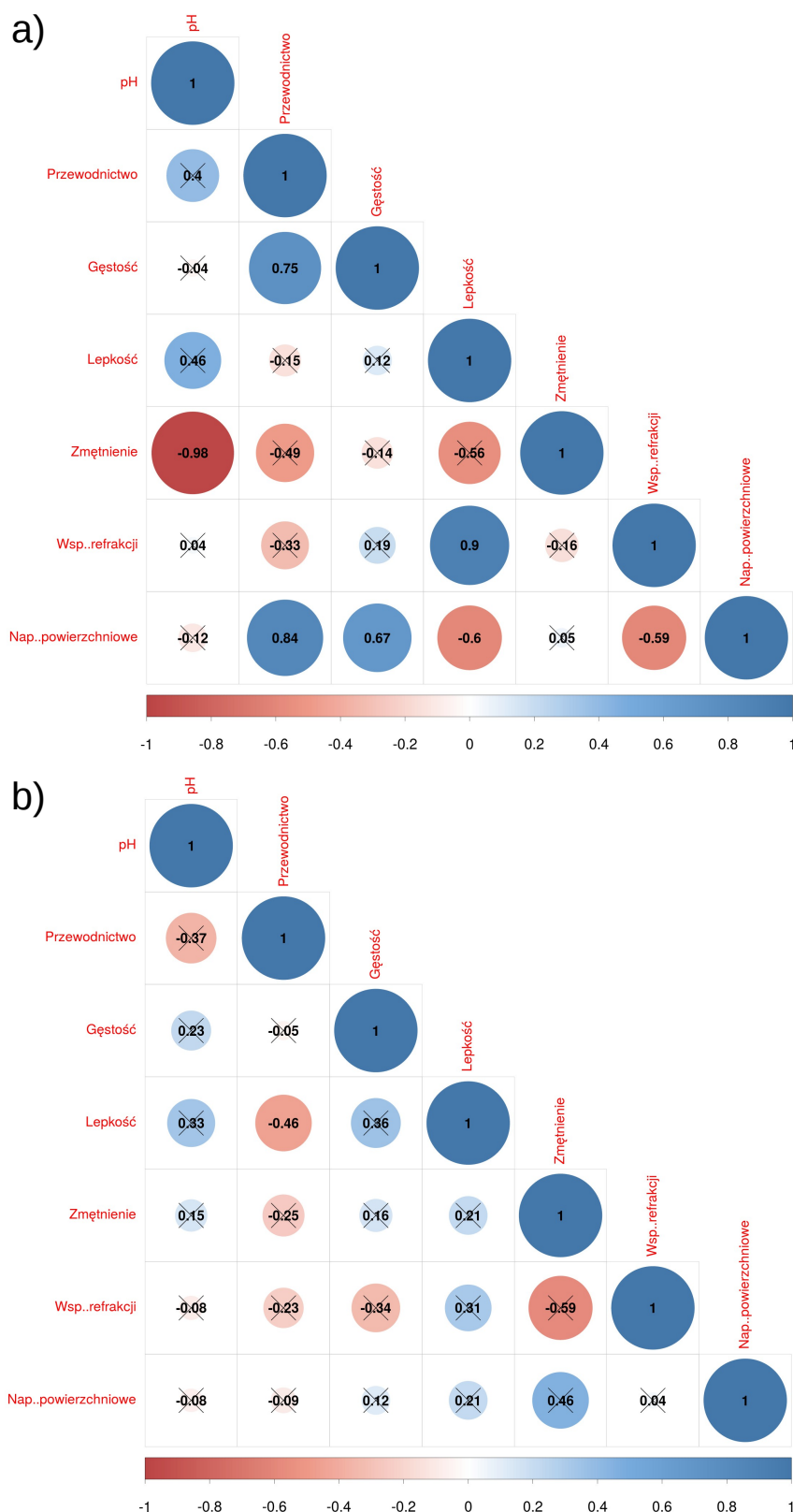
(Linia ciągła - mikroemulsje klastra K1; linia przerywana - mikroemulsje K2)

Układ **ME1b**, który nie został przyporządkowany do któregoś z klastrów posiadał odmienną strukturę o czym wybitnie świadczą obliczone wartości chropowatości. Charakterystyka numeryczna wskazuje na obecność większej liczby pików ( $R_{sk} = 0.98$ ), które są wąskie i strzeliste ( $R_{ku} = 1.3391$ ) (ryc. 46).

Dalszy etap eksploracji danych stanowiło poszukiwanie zależności pomiędzy formułacjami mikroemulsji w klastrach K1 i K2. W tym celu analizując korelację przy użyciu pakietu *corrplot* środowiska statystycznego R wyznaczono współczynniki korelacji liniowej ( $r$ ) dla właściwości fizykochemicznych (ryc. 47).

Wyznaczone współczynniki korelacji liniowej określają stopień zgodności pomiędzy zmiennymi i przyjmują wartości z przedziału  $\langle -1; 1 \rangle$ . Znak współczynnika korelacji informuje o kierunku korelacji, natomiast bezwzględna wartość o sile związku. Jeżeli wartości te są bliskie 1 lub -1 to wartości są ze sobą skorelowane a punkty rozłożone są wzdłuż prostej. Przyjmuje się bezwzględne wartości współczynnika korelacji:  $0.2 \leq r < 0.4$  korelacja niska,  $0.4 \leq r < 0.6$  korelacja umiarkowana,  $0.6 \leq r < 0.8$  korelacja wysoka,  $0.8 \leq r < 0.9$  korelacja bardzo wysoka,  $0.9 \leq r < 1.0$  korelacja praktycznie pełna. Wysoka wartość współczynnika korelacji nie zawsze oznacza występowanie zależności przyczynowo-skutkowej między badanymi zmiennymi. Ponadto zwraca się uwagę na test istotności współczynnika korelacji, który wskazuje na wiarygodność korelacji, która zależy m.in. od liczebności próby.

Wartości współczynników  $r$  dla mikroemulsji klastra K1, wskazujące na korelacje praktycznie pełną, uzyskano w przypadku wartości zmętnienia i pH ( $r = -0.98$ ) oraz lepkości i współczynnika refrakcji ( $r = 0.9$ ) (ryc. 47 a). Równocześnie korelacje te są istotne statystycznie. Wartości pH układów klastra K1 były skorelowane negatywnie ze stopniem zmętnienia. W związku z tym mikroemulsje ME4b, ME7b i ME16b, których wartości pH mieściły się w granicach od 5.36 do 5.40 charakteryzowały się niskim stopniem zmętnienia, mniejszym niż 19 NTU. Z kolei mniejsze wartości pH charakteryzujące układ ME9b towarzyszyły większemu stopniowi zmętnienia układu (93 NTU). Spośród mikroemulsji klastra K1 wartościami współczynnika refrakcji 1.374 i 1.385 charakteryzowały się układy ME16b i ME7b o lepkości odpowiednio około 50 mPa·s i 57 mPa·s. W przypadku układu ME4b większa wartość współczynnika refrakcji (1.407) była związana z większą lepkością mikroemulsji (93.3 mPa·s).



**Rycina 47.** Matryce korelacji liniowej właściwości fizykochemicznych, a) klastra K1, b) klastra K2. W okręgach podano wartości współczynnika korelacji ( $r$ ). Wartości przekreślone wskazują na brak istotności ( $p > 0.01$ ).

Z kolei dla klastra K2 najwyższą wartość współczynnika korelacji, która zarazem była jedyną wartością istotną statystycznie, wykazano dla przewodnictwa i lepkości ( $r = -0.46$ ) (ryc. 47 b). W związku z powyższym istnieje umiarkowana siła negatywnej korelacji wartości przewodnictwa oraz lepkości układów klastra K2. Na przykład spośród mikroemulsji klastra K2 układy ME1a, ME7a, ME17a, ME20a, ME3b, ME17b charakteryzowały się wartościami lepkości od około 101 mPa·s do około 177 mPa·s, którym towarzyszyły wartości przewodnictwa od 26 do około 48  $\mu\text{S/cm}$ . Z kolei w przypadku mikroemulsji trzech układów (ME4a, ME16a, ME20b) mniejszym wartościom lepkości, odpowiednio 78, 28 i 8.6 mPa·s, towarzyszyły wartości przewodnictwa większe niż 113, 89 i 126  $\mu\text{S/cm}$ .

Wyniki uzyskane w analizie korelacyjnej klastra K1 i K2 wskazują na duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi układami. Są one także zbieżne z wynikami klasteryzacji hierarchicznej i dodatkowo uzasadniają wybór dwóch klastrów spośród badanych mikroemulsji.

#### *Stabilność sporządzonych mikroemulsji.*

Ocenę stabilności właściwości fizykochemicznych dokonano w oparciu o wyniki pomiaru: pH, przewodnictwa, gęstości, lepkości, zmętnienia, współczynnika refrakcji, napięcia powierzchniowego oraz średnicy cząstek fazy rozproszonej metodą dyfrakcji promieni lasera po 30 dniowym okresie przechowywania w komorze klimatycznej (temp. 25°C/60 % RH) (tab. 21).

Na podstawie porównania wartości  $p$  testu  $t$ -Studenta z przyjętym poziomem istotności  $\alpha = 0.05$  określono statystycznie znaczące ( $p < 0.025$ ) różnice właściwości fizykochemicznych badanych układów klastra K1 i K2. Wykazano także wpływ typu mikroemulsji na zmianę wartości ww. parametrów.

Wartości pH oraz przewodnictwa wszystkich układów klastra K1 po 30 dniowym okresie przechowywania w komorze klimatycznej (temp. 25°C/60 % RH) zmieniły się w istotny statystycznie sposób. W przypadku klastra K2 pH i przewodnictwo układów ME9a, ME17a oraz ME3b nie uległo istotnym statystycznie zmianom. Wartości pH i przewodnictwa mikroemulsji ME1b, która nie została przyporządkowana do żadnego z klastrów nie uległy zmianom.

Istotne statystycznie zmiany zmętnienia wykazano w przypadku jednej mikroemulsji klastra K1 (ME4b) oraz dwóch mikroemulsji klastra K2 (ME4a, ME6b). Wszystkie wymienione układy po przechowywaniu w komorze klimatycznej (30 dni, 25°C/60% RH) charakteryzowały się zmętnieniem większym niż 200 NTU. Ponadto dla ww. mikroemulsji stwierdzono istotną statystycznie zmianę wartości lepkości.

Porównując wartości względnych różnic ( $S_{rel}$  [%]) gęstości oraz współczynnika refrakcji badanych układów wykazano ich niewielkie zmiany, maksymalnie 0.37%.

Ze względu na wysoką polidispersyjność mikroemulsji ME7b klastra K1 nie było możliwe określenie dla niej średnicy cząstek fazy rozproszonej metodą dyfrakcji promieni lasera. Z tego względu wielkość tę obliczono na podstawie zdjęć z mikroskopu skaningowego z wykorzystaniem narzędzi analizy obrazu programu *ImageJ* [1]. Wyliczona średnica cząstek wyniosła 130 nm.

Na podstawie analizy istotności statystycznej zmian właściwości fizykochemicznych badanych mikroemulsji do dalszych badań wybrano 14 układów, trzy z klastra K1 (ME7b, ME9b, ME16b), dziesięć z klastra K2 (ME1a, ME3a, ME7a, ME9a, ME16a, ME17a, ME20a, ME3b, ME17b, ME20b) oraz układ ME1b. Układy te charakteryzowały się największą stabilnością po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C/60% RH) oraz średnicą cząstek fazy rozproszonej nie przekraczającą 130 nm (tab. 22).

**Tabela 21.** Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C/60% RH).

Kolorem czerwonym oznaczono formułacje odrzucone w badaniach stabilności.

formulacja	pH	przewodnictwo [ $\mu\text{S/cm}$ ]	gęstość [g/mL]	lepkość [mPa·s]	zmętnienie [NTU]	współczynnik refrakcji	napięcie powierzchniowe [mN/m]	typ mikroemulsji	rozcień- czanie wodą	klaster
ME1a	5.66 ± 0.06	49.37 ± 0.18	0.9492	101.1 ± 1.3	12.14 ± 0.22	1.425	28.63 ± 0.02	w/o	+	K2
ME3a	4.88 ± 0.01	39.45 ± 0.47	0.9731	90.8 ± 2.9	2.02 ± 0.1	1.423	28.62 ± 0.04	w/o	+	K2
ME4a	5.33 ± 0.01	131.04 ± 0.69	0.9695	84.9 ± 1.9	> 200	1.434	29.01 ± 0.04	o/w	-	K2
ME4b	5.43 ± 0.02	91.98 ± 0.65	0.9919	185.8 ± 10.4	> 200	1.408	27.75 ± 0.03	o/w	-	K1
ME6a	5.48 ± 0.01	0.92 ± 0.05	0.9523	65.2 ± 2.1	> 200	1.428	28.62 ± 0.25	w/o	-	-
ME7a	4.81 ± 0.02	30.56 ± 0.32	0.9894	108.6 ± 1.0	7.24 ± 0.05	1.438	30.29 ± 0.10	w/o	-	K2
ME9a	5.75 ± 0.02	0.70 ± 0.11	0.9370	28.7 ± 0.5	0.69 ± 0.04	1.434	28.92 ± 0.04	w/o	-	K2
ME16a	3.22 ± 0.01	77.11 ± 0.52	0.9557	29.5 ± 2.7	3.75 ± 0.09	1.413	29.78 ± 0.13	w/o	-	K2
ME17a	5.13 ± 0.03	32.87 ± 0.67	1.0273	113.1 ± 1.0	0.26 ± 0.04	1.441	30.00 ± 0.06	w/o	+	K2
ME20a	5.86 ± 0.02	17.50 ± 0.27	1.0133	175.9 ± 1.0	0.89 ± 0.08	1.436	30.66 ± 0.17	w/o	-	K2

**Tabela 21 cd.** Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C/60% RH). Kolorem czerwonym oznaczono formułacje odrzucone w badaniach stabilności.

formulacja	pH	przewodnictwo [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	gęstość [g/mL]	lepkość [mPa·s]	zmętnienie [NTU]	współczynnik refrakcji	napięcie powierzchniowe [mN/m]	typ mikroemulsji	rozcień- czanie wodą	klaster
ME1b	5.48 ± 0.45	14.69 ± 0.36	0.9801	454.5 ± 21.3	27.01 ± 0.22	1.383	36.15 ± 0.45	o/w	-	-
ME3b	5.23 ± 0.64	26.15 ± 0.17	0.9894	107.8 ± 4.4	167.81 ± 0.95	1.369	32.37 ± 0.08	o/w	+	K2
ME5a	7.47 ± 0.06	580.95 ± 0.21	0.9723	54133.3	> 200	1.424	b.d	o/w	-	-
ME5b	5.37 ± 0.02	338.11 ± 0.67	1.0081	11.2 ± 0.2	> 200	1.364	30.26 ± 0.22	o/w	-	-
ME6b	5.23 ± 0.01	44.42 ± 2.55	1.0095	42.1 ± 1.9	> 200	1.378	28.47 ± 0.23	o/w	-	K2
ME7b	5.20 ± 0.02	308.99 ± 1.02	1.0028	57.0 ± 1.2	1.78 ± 0.33	1.382	29.62 ± 0.04	o/w	-	K1
ME9b	4.41 ± 0.02	263.38 ± 0.95	0.9929	44.3 ± 1.0	94.04 ± 0.38	1.388	28.84 ± 0.03	o/w	-	K1
ME16b	5.05 ± 0.02	277.11 ± 3.58	0.9827	49.2 ± 0.4	18.54 ± 0.25	1.378	28.35 ± 0.06	o/w	+	K1
ME17b	5.06 ± 0.02	36.81 ± 0.26	1.0103	122.9 ± 1.6	67.28 ± 0.12	1.364	27.23 ± 0.03	o/w	+	K2
ME20b	4.96 ± 0.02	130.06 ± 1.07	1.0065	8.3 ± 0.1	0.29 ± 0.02	1.356	29.81 ± 0.07	o/w	+	K2



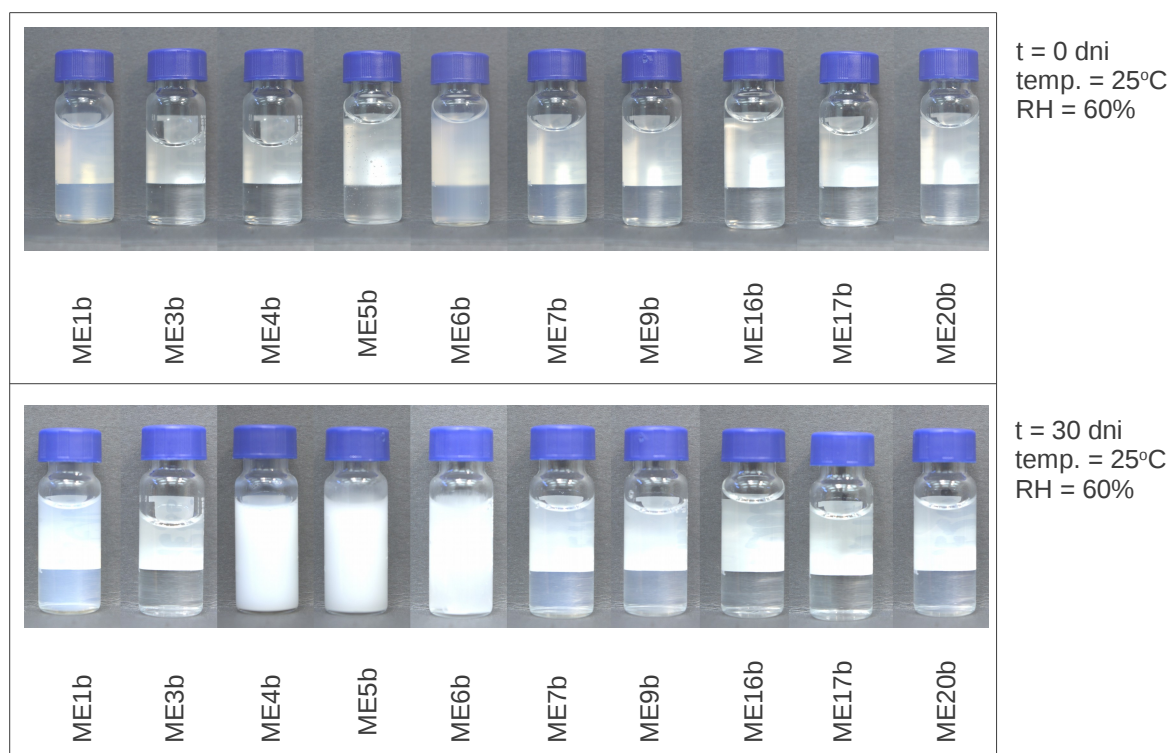
**Tabela 22.** Wartości  $p$  dwustronnego testu  $t$ -Studenta oraz względna różnica ( $S_{rel}$ ) dla wartości zmierzonych przed i po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C, 60% RH).

Kolorem czerwonym oznaczono formułacje odrzucone w badaniach stabilności.

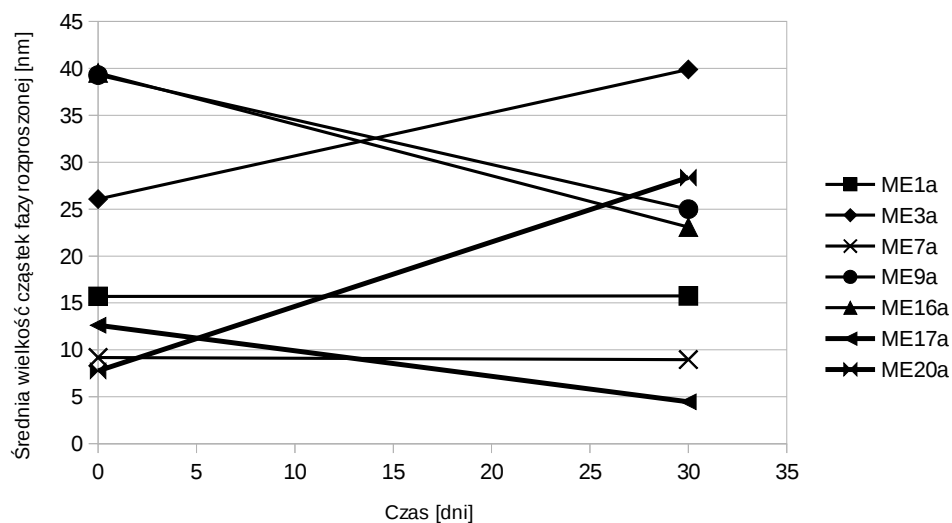
formulacja	wartość $p$					$S_{rel}$ [%]	
	pH	przewodnictwo	lepkość	zmętnienie	napięcie powierzchniowe	gęstość	współczynnik refrakcji
ME1a	0.024	0.042	0.837	0.623	0.884	0.07	0.00
ME3a	0.000	0.002	0.807	0.757	0.909	0.08	0.07
ME4a	0.030	0.000	0.006	0.000	0.115	0.03	0.00
ME4b	0.006	0.000	0.000	0.000	0.749	0.02	0.07
ME6a	0.018	0.003	0.000	0.000	0.079	0.13	0.14
ME7a	0.018	0.016	0.625	0.448	0.265	0.01	0.21
ME9a	0.196	0.261	0.542	0.696	0.176	0.01	0.14
ME16a	0.020	0.000	0.423	0.626	0.644	0.05	0.14
ME17a	0.300	0.332	0.517	0.248	0.174	0.01	0.07
ME20a	0.019	0.019	0.466	0.353	0.758	0.03	0.07
ME1b	0.485	0.392	0.264	0.747	0.892	0.04	0.00
ME3b	0.584	0.586	0.593	0.284	0.335	0.02	0.07
ME5a	0.007	0.000	0.000	0.000	b.d.	0.05	0.21
ME5b	0.000	0.000	0.003	0.000	0.750	0.05	0.37
ME6b	0.000	0.002	0.000	0.000	0.557	0.03	0.36
ME7b	0.000	0.002	0.822	0.698	0.247	0.05	0.07
ME9b	0.000	0.007	0.728	0.092	0.480	0.04	0.22
ME16b	0.000	0.002	0.168	0.184	0.932	0.06	0.29
ME17b	0.000	0.001	0.504	0.498	1.000	0.02	0.22
ME20b	0.000	0.004	1.000	0.223	0.942	0.21	0.15



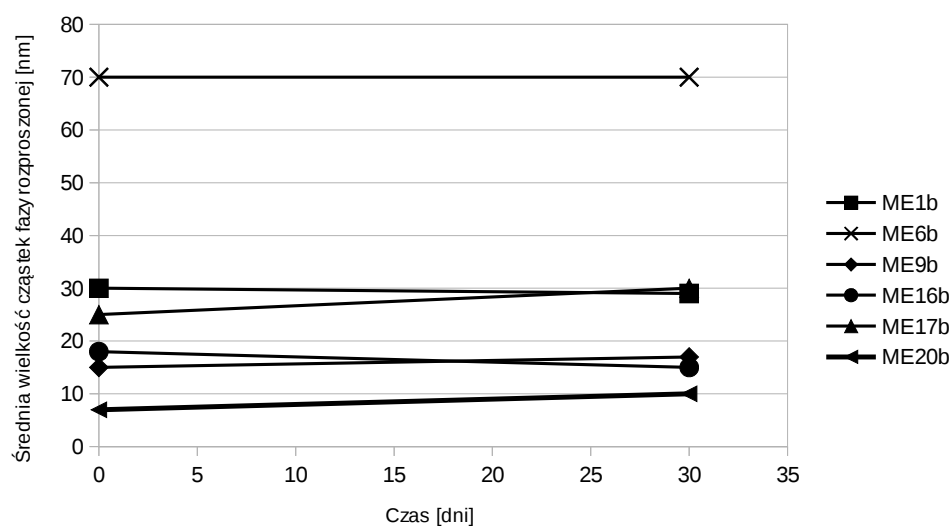
**Rycina 48.** Mikroemulsje serii „a” bezpośrednio po sporządzeniu i po 30 dniach przechowywania w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).



**Rycina 49.** Mikroemulsje serii „b” bezpośrednio po sporządzeniu i po 30 dniach przechowywania w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).



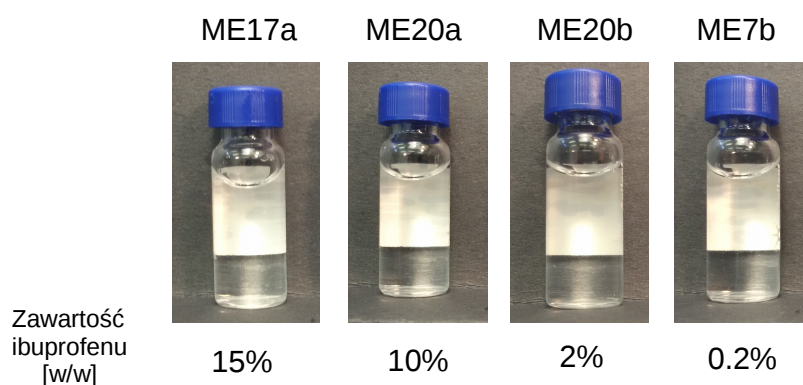
**Rycina 50.** Zmiany średnicy cząstek fazy rozproszonej mikroemulsji serii „a” po przechowywaniu w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).



**Rycina 51.** Zmiany średnicy cząstek fazy rozproszonej mikroemulsji serii „b” po przechowywaniu w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).

### Mikroemulsje z substancją leczniczą.

Zgodnie z przedstawioną wcześniej metodyką badań (rozdz. III.6.4. str. 84) oznaczono zawartość ibuprofenu w wybranych układach mikroemulsyjnych. Największe stężenie ibuprofenu tj. 15 i 10% stwierdzono w czteroskładnikowych mikroemulsjach klastra K2, zawierających Labrasol<sup>®</sup>, Brij<sup>®</sup> 96, Capmul<sup>®</sup> MCM lub Miglyol<sup>®</sup> 812N i wodę, ME17a i ME20a. W kolejnych pięciu mikroemulsjach, tj. ME1a, ME3a, ME7a, ME9a, ME16a maksymalna ilość rozpuszczonego ibuprofenu wynosiła 5%, a w ME20b 2%. W przypadku pozostałych mikroemulsji klastra K2, tj. ME3b oraz ME17b już niewielka zawartość ibuprofenu, tj. 0.1% powodowała rozdział faz. Natomiast w przypadku klastra K1, tylko mikroemulsja ME7b po rozpuszczeniu 0.2% substancji leczniczej nie uległa zmianie (ryc. 52).

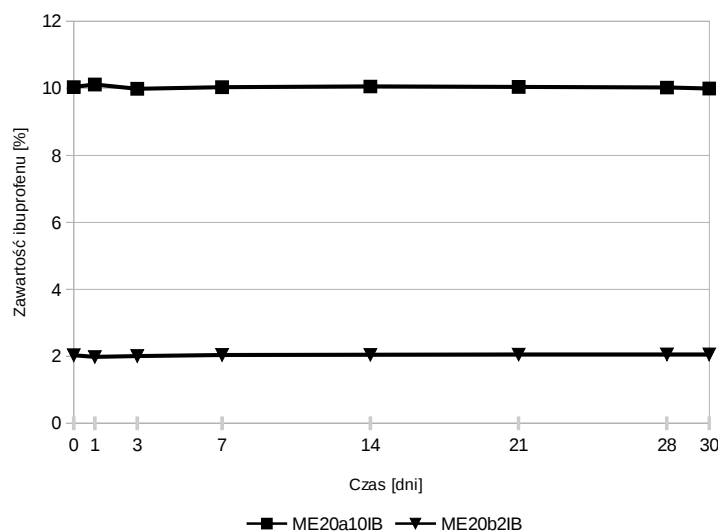


**Rycina 52.** Mikroemulsje z ibuprofenem. Na dalszej ścianie fiolki widoczna jest biała etykieta.

Mikroemulsje zawierające substancję leczniczą zostały poddane badaniu stabilności w oparciu o test wahadłowy (rozdz. III.4.5, str. 84). W mikroemulsjach ME20a10IB typu w/o oraz ME20b2IB typu o/w zawierających odpowiednio 10% lub 2% ibuprofenu nie stwierdzono zmian świadczących o wytrąceniu się substancji leczniczej. Mikroemulsje te wybrano do oceny właściwości fizykochemicznych bezpośrednio po sporządzeniu, po przechowywaniu w komorze klimatycznej (25°C/60% RH) w porównaniu z mikroemulsjami bez substancji leczniczej. Z tego względu wykonano analizę właściwości fizykochemicznych ww. układów i porównano z mikroemulsjami bez substancji leczniczej.

Powyższa analiza wykazała, że obecność substancji leczniczej wpływa na zmianę wartości pH, przewodnictwa oraz lepkości układów mikroemulsyjnych. Wartość pH uległa zmniejszeniu o 0.7 i 1.3 odpowiednio dla mikroemulsji ME20a10IB i ME20b2IB. Zmianę tę przypisuje się wprowadzonej substancji leczniczej o charakterze słabego kwasu (ibuprofen,  $pK_a = 4.5$ ) [51]. W przypadku mikroemulsji typu o/w (ME20b2IB) wartość przewodnictwa zwiększyła się w zakresie od 125.6  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (ME20b) do 141.8  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , a lepkość o 3.1  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ . Natomiast w przypadku mikroemulsji typu w/o (ME20a), uzyskano ponad dwukrotnie mniejszą wartość przewodnictwa 7.5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dla mikroemulsji ME20a10IB oraz zmniejszenie lepkości o około 25  $\text{mPa}\cdot\text{s}$  (ME20a10IB).

Analiza wyników badań stabilności ww. mikroemulsji zawierających ibuprofen po 30 dniach przechowywania w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH) wskazuje na brak istotnych statystycznie zmian w zakresie lepkości, zmętnienia, napięcia powierzchniowego, współczynnika refrakcji oraz gęstości. Obie mikroemulsje pozostały klarowne. Analiza średnicy cząstek fazy rozproszonej wykazała niewielkie różnice w zakresie od 10 do 44 nm (tab. 23). Istotne statystycznie zmiany dotyczyły jedynie pH oraz przewodnictwa ww. układów. Wartość pH w obu mikroemulsjach uległa zmniejszeniu o 0.1, a wartość przewodnictwa zwiększyła się o 0.56  $\mu\text{S}/\text{cm}$  i 3.67  $\mu\text{S}/\text{cm}$  odpowiednio dla mikroemulsji ME20a10IB i ME20b2IB.



**Rycina 53.** Zawartość ibuprofenu w mikroemulsjach przechowywanych w komorach klimatycznych (25°C, 60% RH).

Metodą HPLC potwierdzono również stabilność substancji leczniczej w ww. mikroemulsjach. Względne odchylenia zawartości ibuprofenu bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 30 dniowym okresie przechowywania mieściły się w granicach od 1.3 do 3.8% (ryc. 53).

**Tabela 23.** Właściwości fizykochemicznych badanych układów mikroemulsyjnych.

formulacja	d50 [nm]	pH	przewodnictwo [ $\mu$ S/cm]	gęstość [g/mL]	lepkość [mPa·s]	zmętnienie [NTU]	współczynnik refrakcji	napięcie powierzchniowe [mN/m]	typ
<i>mikroemulsja bez substancji leczniczej</i>									
ME20a	28	6.02±0.07	16.60±0.31	1.0136	176.7±1.4	0.84±0.02	1.438	30.62±0.09	w/o
ME20b	10	5.35±0.04	125.60±0.72	1.0086	8.6±0.01	0.32±0.03	1.358	29.81±0.02	o/w
<i>mikroemulsja z ibuprofenem, t = 0 dni</i>									
ME20a10IB	18	5.30±0.05	7.54±1.16	1.0110	151.2±1.7	1.58±0.46	1.442	30.65±0.05	w/o
ME20b2IB	6	4.09±0.02	141.80±0.54	1.0073	11.7±0.7	0.25±0.69	1.363	29.60±0.01	o/w
<i>mikroemulsja z ibuprofenem, t = 30 dni, 25°C/60% RH</i>									
ME20a10IB	62	5.20±0.02*	8.10±0.07	1.0113	151.3±0.8	1.68±0.30	1.442	30.74±0.12	w/o
ME20b2IB	16	3.99±0.01*	145.47±0.52*	1.0071	10.6±1.7	0.31±0.02	1.365	29.58±0.06	o/w

\* - istotne statystycznie zmiany, przyjęcie hipotezy  $H_1$ ,  $p < 0.025$





## V. Omówienie i dyskusja wyników.

Zwiększająca się ilość substancji leczniczych trudno lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie skłania do poszukiwania nowych rozwiązań w zakresie form leku o zwiększonej dostępności farmaceutycznej i biologicznej. Mikroemulsyjne postaci leku ze względu na właściwości fizykochemiczne mogą być rozpatrywane jako nośniki substancji leczniczych. Z technologicznego punktu widzenia największą trudność w formułowaniu mikroemulsyjnych postaci leku stanowi dobór składu ilościowego oraz jakościowego formulacji odpowiedniego dla danej substancji leczniczej i dostosowanego do drogi podania. W świetle tych faktów wszelkie działania zmierzające do modyfikacji poszczególnych etapów w procesie projektowania leku zyskują na znaczeniu. W ten obszar wpisuje się m.in. opracowanie systemów wspomaganie decyzji do przewidywania obszaru występowania układów mikroemulsyjnych. System taki, oprócz cech badawczych polegających na automatycznej akwizycji i generalizacji wiedzy, może być zastosowany w przemyśle do wykonywania wysokowydajnych testów przesiewowych (ang. *high throughput screening*, HTS) *in silico* w celu efektywnego poszukiwania i znajdowania optymalnych składów formulacji mikroemulsji.

W związku z tak postawionym założeniem badawczym zastosowano techniki eksploracji danych do opracowania systemu wspomaganie decyzji, który przewiduje formowanie układów mikroemulsyjnych na podstawie ich składu ilościowego i jakościowego. W tym celu na podstawie piśmiennictwa utworzono bazę danych i opracowano modele obliczeniowe. Zaprojektowano i napisano także w języku Java kod aplikacji komputerowej ME\_DSS do obsługi systemu wspomaganie decyzji opartego na ww. modelach. ME\_DSS to pierwszy tego typu program komputerowy wyposażony w interfejs graficzny i opublikowany na licencji wolnego oprogramowania. Stosując ME\_DSS przewidziano obszary występowania mikroemulsji w przypadku ponad 1000 układów fazowych. Następnie dokonano oceny właściwości fizykochemicznych oraz stabilności wybranych 20 formulacji. Wyniki analizy danych eksperymentalnych posłużyły do oceny sprawności modeli na zewnętrznym zbiorze walidacyjnym. Stosując ME\_DSS do poszukiwań *in silico* optymalnych składów mikroemulsji ze względu na zadane wcześniej kryteria otrzymano dwa stabilne układy mikroemulsyjne o zawartości 10 i 2% ibuprofenu.

### *Ocena i analiza wyników zastosowanych narzędzi eksploracji danych.*

Narzędzia użyte do eksploracji bazy danych, tj. sztuczne sieci neuronowe oraz algorytmy oparte na drzewach decyzyjnych (*randomForest*), posłużyły do zidentyfikowania kluczowych zmiennych niezależnych wchodzących w skład modeli, na bazie których utworzono system wspomagania decyzji. Opracowany program, którego podstawą jest szeroka baza danych, zarówno pod kątem ilości zmiennych (407) i rekordów (ponad 300 000), może być użyty zarówno do interpolowania wartości, jak też do ich ekstrapolacji, tj. przewidywania obszarów mikroemulsji o składzie nie prezentowanym podczas procesu uczenia. Wybór programu *cxcalc* pakietu *Marvin* do obliczania deskryptorów chemicznych podyktowany był nabytym doświadczeniem w trakcie prac z zakresu mikrocząstek kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) [204]. Ponadto program umożliwia obliczenie deskryptorów molekularnych dla cząsteczek składników mikroemulsji o masie cząsteczkowej większej niż 1000 Da.

Redukcję wektora wejściowego przeprowadzono po wykonaniu analizy wrażliwościowej, do której włączono 10 modeli sieci neuronowych. Porównanie uzyskanych wyników uczenia sieci neuronowych na pełnej bazie danych z ich architekturami wskazuje, że poprzez zastosowanie modeli o większej ilości warstw i większej liczbie neuronów uzyskano lepsze rezultaty predykcji obszarów mikroemulsji. Powyższe obserwacje są zgodne z nowym podejściem do uczenia sztucznych sieci neuronowych tzw. *deep-learning* [47]. Zakłada ono, że regiony sieci neuronowych o skomplikowanej architekturze mogą automatycznie wydobywać cechy najbardziej istotne dla części zbiorów danych. W związku z tym sieci o większej liczbie warstw ukrytych i większej liczbie neuronów charakteryzują się mniejszymi błędami generalizacji w przypadku dużych zbiorów danych [87, 155].

Analizę rankingu wrażliwości zmiennych przeprowadzono w oparciu o doświadczenie zdobyte podczas eksperymentu numerycznego, który dotyczył oceny właściwości peletek sporządzonych metoda ekstruzji i sferonizacji [157]. Rozpatrując ranking wrażliwości tylko dla grupy wyselekcjonowanych 17 zmiennych wykazano, że na proces tworzenia oraz stabilność mikroemulsji wpływają m.in. takie czynniki jak ilość fazy wodnej, stosunek ilości fazy olejowej do ilości tenzydu oraz liczba HLB tenzydu [8, 14, 15, 20, 30].

Wyniki badań w zakresie rodzaju zmiennych niezależnych wskazują, że oprócz składu ilościowego istotny wpływ na predykcje systemu ma skład jakościowy, który został wyrażony w postaci deskryptorów chemicznych właściwości przestrzennych i elektrycznych cząsteczek. Podobne wnioski przedstawili Taha i wsp. [207, 208] oraz Chen-Wen i wsp. [35], którzy również wykazali wpływ wartości deskryptorów opisujących właściwości elektryczne oraz przestrzenne tenzydu, kotenzydu i oleju na proces formowania mikroemulsji.

Taha i wsp. [207, 208] wykazali, że zwiększając stosunek ilości tenzydu do kotenzydu można zwiększyć ilość wody w układzie mikroemulsyjnym. Podobną zależność stwierdzono w przeprowadzonych badaniach własnych w oparciu o eksperymenty numeryczne z użyciem ME\_DSS. W formulacjach zawierających Brij®96, Labrasol® i Miglyol®812N, tj. ME20 i ME7, zwiększając stosunek tenzydu do kotenzydu z wartości (1+1) do wartości (4+1) uzyskano zwiększenie powierzchni przewidzianej mikroemulsji o 16% (ryc. 31, 44).

Modelowanie za pomocą sztucznych sieci neuronowych przeprowadzono na zbiorze danych składającym się z siedemnastu wejść, przygotowanym zgodnie z procedurą 10-krotnego wzajemnego sprawdzania. Spośród 60 000 wytrenowanych modeli najlepsze wyniki wartości AUROC uzyskano dla sieci dwu-, trój- lub pięciowarstwowych, których każda warstwa ukryta składała się z co najmniej 5 neuronów. Znaczną przewagę architektur stanowią sieci o funkcji aktywacji *fsr* [22]. W większości przypadków do wytrenowania bardziej złożonych sieci potrzebna była większa ilość iteracji, tj. 10 lub 20 milionów. Powyższe obserwacje są zgodne z charakterystyką sieci wielowarstwowych zawartą w piśmiennictwie [150, 155, 156, 166, 175, 193]. Doświadczenia własne z zakresu zastosowania metod obliczeniowych [152, 203, 227] umożliwiły włączenie do systemu eksperckiego modeli o optymalnych zdolnościach predykcyjnych.

Model neuronowo-rozmyty 50\_lin\_fuzzy posłużył do ekstrakcji numerycznego zbioru reguł logicznych na podstawie których utworzono drzewo decyzyjne (ryc. 8). Analiza gałęzi tego drzewa, które wskazują na powstawanie układów mikroemulsyjnych prowadzi do uzyskania następujących reguł:

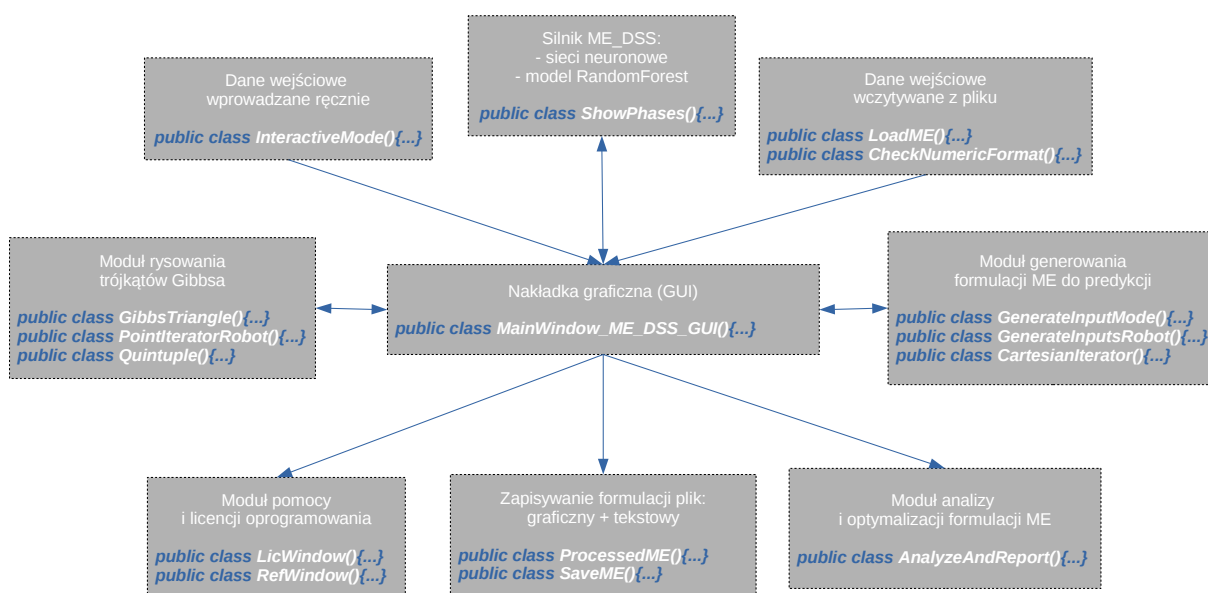
- do sporządzenia mikroemulsji powinien być użyty tenzyd (T), którego punkt izoelektryczny (pI) jest mniejszy niż 9.81,
- jeżeli wartość liczbowa punktu izoelektrycznego (pI) tenzydu (T) mieści się w granicach od 2.46 do 4.9, konieczny jest dodatek tenzydu pomocniczego (TP) w ilości mniejszej niż 56.3%,

- jeżeli wartość liczbowa punktu izoelektrycznego (pI) tenzydu (T) jest mniejsza niż 2.46 powstanie mikroemulsji uzależnione jest od deskryptora ilości fragmentów jego cząsteczki, która powinna wynosić od 1.3 do 1.8,
- jeżeli wartość liczbowa punktu izoelektrycznego (pI) tenzydu (T) jest mniejsza niż 2.46 oraz wartość deskryptora ilości fragmentów cząsteczki jest w granicach od 1.3 do 1.4 powstanie mikroemulsji uzależnione jest dodatkowo od wartości indeksu Balabana tenzydu, która powinna wynosić od 2.22 do 4.03,
- jeżeli wartość liczbowa punktu izoelektrycznego (pI) tenzydu (T) jest mniejsza niż 2.46 oraz wartość deskryptora ilości fragmentów cząsteczki jest w granicach od 1.7 do 1.8 to powstanie mikroemulsji uzależnione jest od energii konformacyjnej kotenzydu (KT), której wartość powinna się mieścić w granicach od 12.9 do 32 kJ/mol.

Zbudowany system wspomagania decyzji oparto na Komitecie Ekspertów tj. złożeniu szeregu modeli, których kolektywna odpowiedź stanowi rezultat pracy całego systemu. Zastosowano opisaną w piśmiennictwie [153] zasadę redundantności, która stanowi, że sprawność predykcyjna komitetu ekspertów jest większa niż któregokolwiek jego elementu z osobna. Doświadczenie zdobyte przeze mnie podczas wcześniejszych prac eksperymentalnych z zakresu integracji systemów wspomagania decyzji w aplikacji komputerowej [167, 204] pozwoliło na włączenie do ME\_DSS zarówno modeli sztucznych sieci neuronowych jak i modelu *RandomForest*. Moja praktyka informatyczna zaowocowała także wprowadzeniem szeregu oryginalnych modułów do generowania i optymalizacji formulacji. Podejmowane wcześniej przez innych badaczy próby połączenia sieci neuronowych i *RandomForest* nie prowadziły do implementacji ich w oprogramowaniu takim jak ME\_DSS, dlatego pod tym względem zastosowany w niniejszej pracy system wspomagania decyzji można uznać za nowatorski [154].

Ponadto sposób kodowania bazy danych dla aplikacji ME\_DSS z uwzględnieniem deskryptorów molekularnych składników mikroemulsji zapewnia zdolność do przewidywania występowania mikroemulsji, w przypadku zastosowania substancji pomocniczych nie występujących w bazie danych. Zostało to przedstawione na przykładzie poprawnego przewidywania przez ME\_DSS obszarów występowania mikroemulsji zawierających Labrasol® i Capmul® MCM (ryc. 34, 41).

Zaletą programu ME\_DSS jest jego modułarna budowa (ryc. 54), dzięki której w oparciu o standardowy system *JUnit* można niezależnie testować każdy moduł. Łatwiejsze staje się wówczas wyszukiwanie i eliminacja wszelkich błędów programu. Definicja wszystkich głównych klas jako publicznych umożliwia również prostą ich dostępność z każdego modułu, co poprawia elastyczność kodu oraz jego czytelność. Wymienione wyżej cechy programu predestynują go do pracy grupowej, co umożliwia również licencja Open Source, na jakiej ME\_DSS został opublikowany. Wg najlepszej wiedzy autora jest to jedyny tego typu program komputerowy, który posiada graficzny interfejs użytkownika oraz jest dostępny darmowo dla dowolnego systemu operacyjnego, umożliwiając tym samym pracę z wykorzystaniem maszyn o niewygodnych parametrach technicznych, a co za tym idzie i cenie.



Rycina 54. Moduły składowe aplikacji ME\_DSS.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że zastosowanie technik drążenia danych pozwala na analizę wielowymiarowych zagadnień. Opracowane modele umożliwiają ocenę zależności pomiędzy składem jakościowym i ilościowym formulacji a powstawaniem mikroemulsji. Należy podkreślić, że selekcja zmiennych wejściowych oraz budowanie modeli zostało przeprowadzone bez żadnych założeń teoretycznych analizowanych zagadnień, czyli na podstawie tzw. modelowania empirycznego, opartego o dane eksperymentalne.

*Ocena przydatności systemu wspomaganie decyzji w oparciu o właściwości fizykochemiczne sporządzonych mikroemulsji.*

W oparciu o wielowartościowy ranking spośród ponad 1000 układów fazowych wybrano 20 formułacji mikroemulsji, które poddano ocenie właściwości fizykochemicznych. Układy te zawierały co najmniej jeden składnik, który nie występował w bazie danych użytej do opracowania systemu wspomaganie decyzji. Ocena właściwości fizykochemicznych badanych układów miała na celu zawężenie przestrzeni eksperymentalnej oraz wybór stabilnych mikroemulsji, do których wprowadzano ibuprofen jako modelową substancję leczniczą. Zwrócono uwagę w szczególności na lepkość oraz przewodnictwo mikroemulsji jako czynniki najbardziej różnicujące układy należące do klastra K1 i K2.

Ocena lepkości w rozcieńczonych układach mikroemulsyjnych opiera się na regule Einsteina,  $\eta_t = 1 + 2.5\Phi$ , która dotyczy zależności lepkości układów dyspersyjnych ( $\eta_t$ ) od ułamka molowego fazy rozproszonej ( $\Phi$ ) [161]. Jednakże przy wyższej wartości ułamka molowego nie znajduje ona uzasadnienia, ponieważ zwiększenie ilości wody w układach typu w/o prowadzi do zwiększenia średnicy cząstek fazy rozproszonej i ich agregacji, co wiąże się ze zwiększeniem lepkości układów [13]. Dalsze zwiększenie ilości fazy wodnej powoduje zmianę struktury mikroemulsji na dwuciągłą, a jej lepkość osiąga wartość maksymalną. Rozcieńczanie układu dwuciągłego prowadzi z powrotem do zmniejszenia jego lepkości [7]. Z kolei zmiany przewodnictwa mikroemulsji wraz ze wzrostem ilości wody w mieszaninie związane są z lepkością i strukturą wewnętrzną układów [125]. W układach typu w/o wzrost przewodnictwa w miarę zwiększania udziału fazy wodnej tłumaczy się zwiększającą się liczbą cząstek fazy rozproszonej, na powierzchni których gromadzą się ładunki. Tworzeniu struktury dwuciągłej towarzyszy wzrost przewodnictwa, który związany jest z formowaniem w strukturze wewnętrznej kanałów zawierających fazę wodną lub agregatów cząstek fazy rozproszonej działających jak nośniki ładunków elektrycznych [121, 161]. Przejście układu dwuciągłego do typu o/w związane jest z ustabilizowaniem się wartości przewodnictwa na ogół na niższym poziomie w stosunku do mikroemulsji dwuciągłej [131, 160]. Do oceny zależności pomiędzy przewodnictwem i lepkością układów rozproszonych stosuje się empiryczną regułę Waldena, która dotyczy stałej wartości iloczynu lepkości i przewodnictwa. W przypadku niektórych mikroemulsji zwiększenie udziału fazy wodnej prowadzi do zwiększenia lepkości układów i zmniejszenia przewodnictwa [205].

Jednakże na podstawie badań wykazano, że reguła ta nie obowiązuje dla części układów i obserwuje się zwiększenie wartości przewodnictwa wraz ze wzrostem lepkości układów [170, 171].

W świetle tych faktów charakterystyka lepkości i przewodnictwa reprezentatywnych mikroemulsji klastra K1 i K2, tj. ME16b i ME17b, wskazuje, że tylko układ ME17b spełnia regułę Waldena. Ponadto wartość współczynnika korelacji lepkości i przewodnictwa mikroemulsji klastra K2 ( $r = -0.46$ ) świadczy o występowaniu odwrotnie proporcjonalnej zależności wartości przewodnictwa od lepkości. W przypadku siedmiu układów mikroemulsyjnych klastra K2: ME1a, ME3a, ME7a, ME17a, ME20a, ME3b, ME17b o wartościach przewodnictwa mniejszych niż 48  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , wartości lepkości były większe niż 90  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ , a kolejne dwie mikroemulsje (ME16a, ME20b) charakteryzowały się 2-krotnie większymi wartościami przewodnictwa ( $> 89 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) oraz 3-krotnie mniejszymi wartościami lepkości ( $< 28 \text{mPa}\cdot\text{s}$ ). Różnice te w przypadku badanych układów mikroemulsyjnych klastra K1 i K2 (ME16b i ME17b) można tłumaczyć odmienną strukturą wewnętrzną. Do jej oceny posłużono się analizą obrazów z mikroskopu skaningowego wykonanych techniką zamrażania i łamania [18, 96]. Analizowane układy zawierały jako tenzyd Labrasol<sup>®</sup>, kotenzyd Brij<sup>®</sup> 96 oraz mirystynian izopropylu lub Capmul<sup>®</sup> MCM jako fazę olejową, a ilość wody wynosiła odpowiednio 65 i 77.5%. Pomimo dużej zawartości wody w obu układach, na podstawie obrazów mikroskopowych zidentyfikowano obecność struktury dwuciągłej. Jak wynika z danych z piśmiennictwa układy zawierające niejonowe tenzydy mogą charakteryzować się strukturą dwuciągłą niezależnie od ilości wody w układzie (10 - 90%) [26].

Biorąc pod uwagę wyniki badań stabilności, mikroemulsje zaliczone do klastra K2 charakteryzowały się mniejszą zmiennością właściwości fizykochemicznych od pozostałych, sporządzonych na podstawie wskazań systemu ME\_DSS. Formułacje z grupy klastra K2 (ME20a, ME20b) zostały wybrane do dalszych badań, oceny ich właściwości. Po rozpuszczeniu ibuprofenu jako modelowej substancji leczniczej stwierdzono zmianę wartości parametrów takich jak pH, przewodnictwo i lepkość. Jednocześnie nie wykazano zmian ich cech fizycznych, a średnica cząstek fazy rozproszonej mieściła się w granicy od 16 do 62 nm. Wartości pH obu mikroemulsji zmniejszyły się odpowiednio o 0.7 i 1.3. Natomiast mniejsze wartości przewodnictwa oraz lepkości uzyskano w przypadku ME20a, a większe w przypadku ME20b. Podobne zjawiska, tj. zmniejszenie pH, przewodnictwa i lepkości stwierdziła Djekic [51] w badaniach mikroemulsji zawierających ibuprofen oraz Labrasol<sup>®</sup> jako tenzyd. Wprowadzenie substancji leczniczej do układu spowodowało zmniejszenie wartości pH o około 1, przewodnictwa o około 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$  oraz lepkości o około 100  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ . Z kolei Djordjevic [52] w badaniach mikroemulsji zawierających Labrasol<sup>®</sup> wykazała

zwiększenie lepkości oraz przewodnictwa po rozpuszczeniu amfiflowej substancji leczniczej (diklofenak dietyloaminy). Dane z piśmiennictwa wskazują na to, iż zmiany wartości przewodnictwa oraz lepkości związane są m.in. z siłą oddziaływania cząstek fazy rozproszonej pomiędzy sobą [170, 172, 174, 209]. Odnosząc ten fakt do otrzymanych wyników badań można przypuszczać, że rozpuszczenie ibuprofenu w układzie mikroemulsyjnym ME20a spowodowało zmniejszenie siły oddziaływania cząstek fazy rozproszonej, natomiast w przypadku układu ME20b zwiększenie siły oddziaływania i większą agregację cząstek fazy rozproszonej. Jednakże potwierdzenie występowania tych zjawisk wymagałoby przeprowadzenia dalszych badań.

Pomimo, że ME\_DSS nie został zaprojektowany do przewidywania powstania mikroemulsji z substancją leczniczą, wykazano jego użyteczność podczas zawężenia przestrzeni eksperymentalnej w celu wyselekcjonowania potencjalnych układów mogących być nośnikami substancji leczniczej. Uzyskane formułacje zawierające 2% i 10% substancji leczniczej wskazują, że dzięki zastosowaniu ME\_DSS można ułatwić proces poszukiwania potencjalnych składów jakościowych i ilościowych w badaniach preformulacyjnych. Na podstawie danych z piśmiennictwa wynika, że najczęściej formułuje się mikroemulsje zawierające 5% ibuprofenu [34, 49, 50, 179], dlatego wart jest podkreślenia fakt otrzymania stabilnej mikroemulsji zawierającej dwukrotnie większą ilość substancji leczniczej.



## VI. Wnioski

1. Narzędzia eksploracji danych, tj. sztuczne sieci neuronowe oraz drzewa decyzyjne są przydatne do projektowania mikroemulsyjnych postaci leku oraz nadają się do implementacji w postaci aplikacji komputerowej jako tzw. system wspomaganie decyzji.
2. Predykcja obszaru występowania mikroemulsji zależy nie tylko od składu ilościowego, ale także składu jakościowego formulacji, który wyraża się poprzez deskryptory molekularne poszczególnych jej składników.
3. Kodowanie składu jakościowego mikroemulsji za pomocą ww. deskryptorów molekularnych pozwala na przewidywanie układów mikroemulsyjnych o nieznanym dotychczas składzie jakościowym, co zostało potwierdzone w pracach laboratoryjnych.
4. Opracowana aplikacja komputerowa ME\_DSS spełnia kryteria walidacji zewnętrznej prowadzonej zarówno numerycznie jak też podczas prac formulacyjnych i jest jedynym aktualnie darmowo dostępnym komputerowym systemem wspomaganie formulacji mikroemulsji z graficznym interfejsem użytkownika.
5. Prace doświadczalne potwierdziły możliwość uzyskania mikroemulsji z modelową substancją leczniczą w procesie formulacji wspomaganie systemem komputerowym ME\_DSS pracującym w trybie wysokowydajnych testów przesiewowych (HTS) *in silico*.



## VII. Piśmiennictwo

1. Abramoff M.D.; Magalhaes P.J.; Ram S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **2004**, 11(7), 36-42.
2. Acharya D.P.; Hartley P.G. Progress in microemulsion characterization. *Curr Opin Colloid In*, **2012**, 17(5) 274-280.
3. Acharya S.P.; Pundarikakshudu K.; Upadhyay P.; Shelat P.; Lalwani A. Development of phenytoin intranasal microemulsion for treatment of epilepsy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **2015**, 45(4), 375-384.
4. Agatonovic-Kustrin S.; Glass B.D.; Wisch M.H.; Alany R.G. Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ANN methodology. *Pharm Res*, **2003**, 20(11), 1760-1765.
5. Aggarwal N.; Goindi S.; Khurana R. Formulation, Characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2013**, 105, 158-166.
6. Ajaz S.H.; Xuanqiang Y.; Johnson R.D. Application of Neural Computing in Pharmaceutical Product Development. *Pharm Res*, **1991**, 8(10), 1248-1252.
7. Ajith C.J.; Animesh K.R. Phase Behavior and Properties of a Microemulsion in the Presence of NaCl. *Langmuir*, **1994**, 10(7), 2084-2087.
8. Alany R.G.; Rades T.; Nicoll J.; Tucker I.G.; Davies N.M. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention, *J Control Release*, **2006**, 111, 145–152.
9. Amani A.; York P.; Chrystyn H.; Clark B.J.; Do D.Q. Determination of factors controlling the particle size in nanoemulsions using Artificial Neural Networks. *Eur J Pharm Sci*, **2008**, 35(1-2), 42-51.
10. Amarji B.; Garg N.K.; Singh B.; Katare O.P. Microemulsions mediated effective delivery of methotrexate hydrogel: More than a tour de force in psoriasis therapeutics. *J Drug Target*, **2016**, 24 (2), 147-160.
11. Andrade S.M.; Costa S.M. Fluorescence quenching of acridine orange in microemulsions induced by the non-steroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Photochem Photobiol Sci*, **2003**, 2, 605-610.
12. Angelico R.; Palazzo G.; Colafemmina G.; Cirkel P.A.; Giustini M.; Ceglie A. Water diffusion and head group mobility in polymer-like reverse micelles: evidence of a sphere-to-rod-to-sphere transition. *J. Phys. Chem. B.*, **1998**, 102, 2883–2889.
13. Arvidsson A.; Soderman O. The microemulsion phase in the didecyldimethylammonium bromide/dodecane/water system. Phase diagram, microstructure, and nucleation kinetics of excess oil phase. *Langmuir*, **2001**, 17(12), 3567-3572.

14. Baran Jr. J.R.; Pope G.A.; Wade W.H.; Weerasooriya V.; Yapa A. Microemulsion Formation with Chlorinated Hydrocarbons. *J Colloid Interface Sci*, **1994**, 168(1), 67-72.
15. Baroli B.; López-Quintela M.A.; Delgado-Charro M.B.; Fadda A.M.; Blanco-Méndez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *J Control Release*, **2000**, 69, 209-218.
16. Barot B.S.; Parejiya P.B.; Patel H.K.; Gohel M.C.; Shelat P.K. Microemulsion-based gel of terbinafine for the treatment of onychomycosis: Optimization of formulation using D-optimal design. *AAPS PharmSciTech*, **2012**, 13(1), 184-192.
17. Baspinar Y.; Bertelmann E.; Pleyer U.; Buech G.; Siebenbrodt I.; Borchert H.-H. Corneal permeation studies of everolimus microemulsion. *J Ocul Pharmacol Ther*, **2008**, 24(4), 399-402.
18. Ben-Barak I.; Talmon Y. Direct-Imaging Cryo-SEM of Nanostructure Evolution in Didodecyldimethylammonium Bromide-Based Microemulsions. *Z. Phys. Chem.*, **2012**, 226, 665-674.
19. Benival D.M.; Devarajan P.V. In situ lipidization as a new approach for the design of a self microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of doxorubicin hydrochloride for oral administration. *J Biomed Nanotechnol*, **2015**, 11 (5), 913-922.
20. Bera A.; Ojha K.; Kumar T.; Mandal A. Phase Behavior and Physicochemical Properties of (Sodium Dodecyl Sulfate + Brine + Propan-1-ol + Heptane) Microemulsions. *J. Chem. Eng. Data*, **2012**, 57(3), 1000–1006.
21. Berk N.F. Scattering properties of a model bicontinuous structure with a well defined length scale, *Phys Rev Lett*, **1987**, 58(25), 2718-2721.
22. Bilski J. The backpropagation learning with logarithmic transfer function. *Proceedings of the Fifth Conference Neural Networks and Soft Computing*, **2000**, 71-77, Zakopane, Polska.
23. Bolzinger M.A.; Thevenin M.A.; Grossiord J.L.; Poelman M.C. Characterisation of a sucrose ester microemulsion by freeze fracture electron micrograph and small-angle neutron scattering experiments. *Langmuir*, **1999**, 15, 2307–2315.
24. Bourquin J.; Schmidli H.; van Hoogevest P.; Leuenberger H. Comparison of artificial neural networks (ANN) with classical modelling techniques using different experimental designs and data from a galenical study on a solid dosage form. *Eur J Pharm Sci*, **1998**, 6(4), 287-300.
25. Brevnov D.A.; Finklea H.O.; Ryswyk H.V. Ac voltammetry studies of electron transfer kinetics for a redox couple attached via short alkanethiols to a gold electrode, *J Electroanal Chem*, **2000**, 493, 100-107.
26. Burauer S.; Belkoura L.; Stubenrauch C; Strey R. Bicontinuous microemulsions revisited: a new approach to freeze fracture electron microscopy (FFEM), *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2003**, 228(1–3), 159-170.
27. Butkiewicz B.S. *Metody wnioskowania przybliżonego: właściwości i zastosowanie*. Oficyna Wydawnicza PW, Warszawa, **2001**.

28. Caliph S.M.; Charman W.N.; Porter C.J. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J Pharm Sci*, **2000**, 89, 1073–1084.
29. Cantor R.S. Statistical thermodynamics of curvature elasticity in surfactant monolayer films: A molecular approach. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 99, 7124-7150.
30. Cantor R.S. The stability of bicontinuous microemulsions: A molecular theory of the bending elastic properties of monolayers comprised of ionic surfactants and nonionic cosurfactants. *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 4765-4784.
31. Carlfors J.; Blute I.; Schmidt V. Lidocaine in microemulsion - a dermal delivery system. *Journal Of Dispersion Science And Technology*, **1991**, 12(5), 467-482.
32. Cavalcanti A.L.M.; Reis M.Y.F.A.; Silva G.C.L.; Ramalho Í.M.M.; Guimarães G.P.; Silva J.A.; Saraiva K.L.A.; Damasceno B.P.G.L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation, *Int J Pharm*, **2016**, 506(1–2), 351-360.
33. Chan J.; Maghraby G.M.M.E.; Craig J.P.; Alany R.G. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*, **2007**, 328(1), 65-71.
34. Chen Y.; Tuo J.; Huang H.; Liu D.; You X.; Mai J.; Song J.; Xie Y.; Wu C.; Hu H. Optimized mixed oils remarkably reduce the amount of surfactants in microemulsions without affecting oral bioavailability of ibuprofen by simultaneously enlarging microemulsion areas and enhancing drug solubility. *Int J Pharm*, **2015**, 487 (1-2), art. no. 14784, 17-24.
35. Chen-Wen L.; Sheng-Yong Y.; Rui H.; Wan-Jun T.; Zong-Ning Y. Development of Quantitative Structure-Property Relationship Models for Self-Emulsifying Drug Delivery System of 2-Aryl Propionic Acid NSAIDs. *J Nanomater*, **2011**, Article ID 206320, 1-12.
36. Chieng, T.-H.; Gan, L.-M.; Chew, C.-H.; Ng, S.-C.; Pey, K.-L. Microporous polymeric materials by polymerization of microemulsions containing different alkyl chain lengths of cationic surfactants, *Polymer*, **1996**, 37(13), 2801-2809.
37. Chieng, T.-H.; Gan, L.-M.; Teot, W.-K.; Pey, K.-L. Porous polymeric membranes by bicontinuous microemulsion polymerization: effect of anionic and cationic surfactants. *Polymer*, **1996**, 37(26), 5917-5925.
38. Chinga G.; Johnsen P. O.; Dougherty R.; Berli E. L.; Walter J. Quantification of the 3D microstructure of SC surfaces. *Journal of Microscopy*, **2007**, 227, 254–265.
39. Corswant C.; Thoren P.; Engstrom S. Triglyceride-based microemulsion from intravenous administration of sparingly soluble substances. *J Pharm Sci*, **1998**, 87, 200–208.
40. Currie F.; Holmberg K.; Westman G. Regioselective nitration of phenols and anisols in microemulsion. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2001**, 182, 321-327.
41. Cxcalc Calculator Plugins, program do obliczania deskryptorów molekularnych struktur chemicznych, *Marvin 5.2.12*, **2012**, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

42. Da Silva G.B.R.F; Scarpa M.V.; Carlos I.Z.; Quilles M.B.; Lia R.C.C.; Do Egito E.S.T.; De Oliveira A.G. Oil-in-water biocompatible microemulsion as a carrier for the antitumor drug compound methyl dihydrojasmonate. *Int J Nanomedicine*, **2015**, 10, 585-594.
43. Danielsson I.; Lindman B. The definition of a microemulsion. *Colloids and Surfaces*, **1981**, 3, 391–392.
44. Darole P.S.; Hegde D.D.; Nair H.A. Formulation and Evaluation of Microemulsion Based Delivery System for Amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*, **2008**, 9, 122 – 128.
45. Davies J.T. A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. *Proc. 2nd Int. Congr. Surface Act.*, **1959**, 1, 426 – 438, London, Butterworths.
46. Dekker M.; Attwood D. *Colloidal Drug Delivery Systems*, red. Jörg Kreuter, Inc. New York, **1994**, 31-71.
47. Deng L.; Yu D. Deep Learning: Methods and Applications. *Foundations and Trends in Signal Processing*, **2013**, 7(3–4), 197–387.
48. Djekic L.; Ibric S.; Primorac M. The application of artificial neural networks in the prediction of microemulsion phase boundaries in PEG-8 caprylic/capric glycerides based systems. *Int J Pharm*, **2008**, 361(1-2), 41-46.
49. Djekic L.; Martinovic M.; Stepanović-Petrović R.; Micov A.; Tomić M.; Primorac M. Formulation of hydrogel-thickened nonionic microemulsions with enhanced percutaneous delivery of ibuprofen assessed in vivo in rats. *Eur J Pharm Sci*, **2016**, 92, 255-265.
50. Djekic L.; Martinovic M.; Stepanovic-Petrovic R.; Tomic M.; Micov A.; Primorac M. Design of Block Copolymer Costabilized Nonionic Microemulsions and Their in Vitro and in Vivo Assessment as Carriers for Sustained Regional Delivery of Ibuprofen via Topical Administration. *J Pharm Sci*, **2015**, 104 (8), 2501-2512.
51. Djekic L.; Primorac M.; Filipic S.; Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int J Pharm*, **2012**, 433, 25–33.
52. Djordjevic L.; Primorac M.; Stupar M.; Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm*, **2004**, 271(1–2), 11-19.
53. Eastoe J.; Hetherington K.J.; Sharpe D.; Dong J.; Heenan R.K.; Steytler D. Mixing of alkanes with surfactant monolayers in microemulsions. *Langmuir*, **1996**, 12, 3876–3880.
54. Ee L.-S.; Wang J.; Ng S.-C.; Gan L.-M. Low temperature synthesis of PZT powders via microemulsion processing. *Mater Res Bull*, **1998**, 33(7), 1045-1055.
55. El Agamy H.I.; El Maghraby G.M. Natural and synthetic oil phase transition microemulsions for ocular delivery of tropicamide: Efficacy and safety. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2015**, 5, 67-75.
56. El Maghraby G.M.; Bosela A.A. Investigation of self-microemulsifying and microemulsion systems for protection of prednisolone from gamma radiation. *Pharm Dev Technol*, **2011**, 16(3), 237-242.

57. El-Hadidy G.N.; Ibrahim H.K.; Mohamed M.I.; El-Milligi M.F. Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: Formulation and in vitro evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, **2012**, 38(1), 64-72.
58. Fanun M.; Wachtel E.; Antalek B.; Aserin A.; Garti N. A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2001**, 180, 173–186.
59. Fatouros D.G.; Nielsen F.S.; Douroumis D.; Hadjileontiadis L.J.; Mullertz A. In vitro-in vivo correlations of self-emulsifying drug delivery systems combining the dynamic lipolysis model and neuro-fuzzy networks. *Eur J Pharm Biopharm.*, **2008**, 69(3), 887-98.
60. Fehér P.; Ujhelyi Z.; Vecsernyés M.; Fenyvesi F.; Damache G.; Ardelean A.; Costache M.; Dinischiotu A.; Hermenean A.; Bacskay I. Hepatoprotective effects of a self-micro emulsifying drug delivery system containing Silybum marianum native seed oil against experimentally induced liver injury. *Pharmazie*, **2015**, 70(4), 231-238.
61. Fujii M.; Shiozawa K.; Henmi T.; Yamanouchi S.; Suzuki H.; Yamashita N.; Matsumoto M. Skin permeation of indomethacin from gel formed by fatty-acid ester and phospholipid. *Int J Pharm*, **1996**, 137, 117–124.
62. Furedi-Milhofer H.; Kamishny A.; Yano J.; Aserin A.; Garti N. Crystallization of organic compounds in reverse micelles. III. Solubilization of aspartame. *Langmuir*, **2003**, 19, 5984–5990.
63. Gallarate M.; Gasco M.R.; Trotta M.; Chetoni P.; Saettone M.F. Preparation and evaluation in vitro of solutions and o/w microemulsions containing levobunolol as ion-pair, *Int J Pharm*, **1993**, 100(1), 219-225.
64. Gan L.-M.; Liu J.; Poon L.-P.; Chew C.-H.; Gan L.-H. Microporous polymeric composites from bicontinuous microemulsion polymerization using a polymerizable nonionic surfactant. *Polymer*, **1997**, 38(21), 5339-5345.
65. Gan L.M.; Chew C.H. Microporous polymer composites from microemulsion polymerization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **1997**, 123-124, 681-693.
66. Gan L.M.; Zhang K.; Chew C. H. Preparation of silica nanoparticles from sodium orthosilicate in inverse microemulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **1996**, 110, 199-206.
67. Garti N.; Aserin A.; Ezrahi S.; Tiunova I.; Berkovic G. Water Behavior in Nonionic Surfactant Systems I: Subzero Temperature Behavior of Water in Nonionic Microemulsions Studied by DSC. *J Colloid Interface Sci.*, **1996**, 178, 60-68.
68. Garti N.; Aserin A.; Ezrahi S.; Wachtel E. Water Solubilization and Chain Length Compatibility in Nonionic Microemulsions. *J Colloid Interface Sci.*, **1995**, 169, 428-436.
69. Garti N.; Aserin A.; Tiunova I.; Fanun M. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2000**, 170, 1–18.

70. Garti N.; Yagmur A.; Aserin A.; Spornath A.; Elfakess R.; Ezrahi S. Solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2004**, 230, 183-190.
71. Garti, N.; Aserin, A.; Wachtel, E.; Gans, O.; Shaul, Y. Water Solubilization in Nonionic Microemulsions Stabilized by Grafted Siliconic Emulsifiers. *J Colloid Interface Sci*, **2001**, 233, 286-294.
72. Goebel A.S.B.; Neubert R.H.H.; Wohlrab J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. *Int J Pharm*, **2011**, 404(1-2), 159-168.
73. Goebel A.S.B.; Schmaus G.; Neubert R.H.H.; Wohlrab J. Dermal peptide delivery using enhancer molecules and colloidal carrier systems - Part I: Carnosine. *Skin Pharmacol Phys*, **2012**, 25 (6), 281-287.
74. Griffin W.C.J. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *J Soc Cosmetics Chem*, **1954**, 5(4), 249-256.
75. Griffin W.C.J. Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. *J Soc Cosmetics Chem*, **1949**, 1(5), 311-326.
76. Guan Q.; Zhang G.; Sun S.; Fan H.; Sun C.; Zhanga S. Enhanced Oral Bioavailability of Pueraria Flavones by a Novel Solid Self-microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) Dropping Pills. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2016**, 39(5), 762-769.
77. Guo R.; Zhang Q.; Qian J.; Zou A. Hydrotrope and hydrotrope-solubilization action of penicillin-K in CTAB/n-C5H11OH/H2O system. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, **2002**, 196, 223–234.
78. Guo R.X.; Fu X.; Chen J.; Zhou L.; Chen G. Preparation and Characterization of Microemulsions of Myricetin for Improving Its Antiproliferative and Antioxidative Activities and Oral Bioavailability. *J Agr Food Chem*, **2016**, 64(32), 6286-6294.
79. Gupta R.R.; Jain S.K.; Varshney M. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**, 41(1), 25-32.
80. Habib F.; El-Mahdy M.; Maher S. Microemulsions for ocular delivery: Evaluation and characterization. *J Drug Deliv Sci Tec*, **2011**, 21(6), 485-489.
81. Haegel F.H.; Schlupen J.; Schultze J.W.; Winkels S.; Stromberg C. Anodic polymerization of thiophene derivatives from microemulsions and liquid crystals. *Electrochimica Acta*, **2001**, 46, 3973–3984.
82. Häger, M.; Holmberg, K.; Olsson, U. Synthesis of an amphiphilic polymer performed in an oil-in-water microemulsion and in a lamellar liquid crystalline phase. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, **2001**, 189, 9-19.
83. Hall M.; Frank E.; Holmes G.; Pfahringer B.; Reutemann P.; Witten I.H. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations*, **2009**, 11(1), 10-18.
84. Hasse A.; Keipert S. Development and characterisation of microemulsions for ocular application. *Eur J Pharm Biopharm*, **1997**, 43, 179–183.



85. Hegde R.R.; Bhattacharya S.S.; Verma A.; Ghosh A. Physicochemical and pharmacological investigation of water/oil microemulsion of non-selective beta blocker for treatment of glaucoma. *Curr Eye Res*, **2014**, 39(2), 155-163.
86. Himes R.; Lee S.; McMenigall K.; Russell-Jones G.J. Reduction in inflammation in the footpad of carrageenan treated mice following the topical administration of anti-TNF molecules formulated in a micro-emulsion. *J Control Release*, **2010**, 145(3), 210-213.
87. Hinton G.E. Learning multiple layers of representation. *Trends Cogn Sci*, **2007**, 11(10), 428-34.
88. Ho H.-O.; Hsiao C.-C.; Sheu M.-T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J Pharm Sci*, **1996**, 85(2), 138-143.
89. Hoar T.P.; Schulman J.H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. *Nature*, **1943**, 152, 102-103.
90. Hoppel M.; Caneri M.; Glatter O.; Valenta C. Self-assembled nanostructured aqueous dispersions as dermal delivery systems. *Int J Pharm*, **2015**, 495(1), 459-462.
91. Hoppel M.; Juric S.; Ettl H.; Valenta C. Effect of monoacyl phosphatidylcholine content on the formation of microemulsions and the dermal delivery of flufenamic acid. *Int J Pharm*, **2015**, 479(1), 70-76.
92. Hosny K.M.; Hassan A.H. Intranasal in situ gel loaded with saquinavir mesylate nanosized microemulsion: Preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Int J Pharm*, **2014**, 475 (1-2), e191-e197.
93. Hugger E.D.; Novak B.L.; Burton P.S.; Audus K.L.; Borchardt R.T. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J Pharm Sci*, **2002**, 91, 1991–2002.
94. Israelachvili J. N. The science and applications of emulsions — an overview. *Colloids Surf A*, **1994**, 91, 1-8.
95. Israelachvili J.N.; Mitchell D.J.; Ninham B.W.J. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Chem Soc Faraday Trans 2*, **1976**, 72, 1525-1568.
96. Issman L.; Talmon Y. Cryo-SEM specimen preparation under controlled temperature and concentration conditions. *J Microsc*, **2012**, 246(1), 60-69.
97. Iwanaga K.; Kushibiki T.; Miyazaki M.; Kakemi M. Disposition of lipid-based formulation in the intestinal tract affects the absorption of poorly water-soluble drugs. *Biol Pharm Bull*, **2006**, 29, 508–512.
98. Jain J.; Fernandes C.; Patravale V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. *AAPS PharmSciTech*, **2010**, 11(2), 826-831.
99. Jeirani Z.; Jan B.M.; Ali B.S.; Noor I.M.; Hwa S.C.; Saphanuchart W. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometr Intell Lab*, **2012**, 112, 1–7.

100. Junping W.; Takayama K.; Nagai T.; Maitani Y. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. *Int J Pharm*, **2003**, 251(1–2), 13-21.
101. Juškaite V.; Ramanauskiene K.; Briedis V. Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. *Evid-Based Compl Alt*, **2015**, art. no. 540916.
102. Kalam M.A.; Alshamsan A.; Aljuffali I.A.; Mishra A.K.; Sultana Y. Delivery of gatifloxacin using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation, transcorneal permeation and aqueous humor drug determination. *Drug Deliv*, **2016**, 23(3), 896-907.
103. Kale A.A.; Patravale V.B. Development and evaluation of lorazepam microemulsions for parenteral delivery. *AAPSP PharmSciTech*, **2008**, 9(3), 966-971.
104. Kantaria S.; Rees G.D.; Lawrence M.J. Formulation of electrically conducting microemulsion-based organogels. *Int J Pharm*, **2003**, 250, 65-83.
105. Kapoor Y.; Chauhan A. Ophthalmic delivery of Cyclosporine A from Brij-97 microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels. *Int J Pharm*, **2008**, 361(1-2), 222-229.
106. Karim F.T.; Kalam A.; Anwar R.; Miah M.M.; Rahman M.S.; Islam S.M.A. Preparation and evaluation of SEDDS of simvastatin by in vivo, in vitro and ex vivo technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **2015**, 41(8), 1338-1342.
107. Katiyar S.B.; Katiyar S.S.; Mishra S.P.; Sailaja L. Microemulsions: A novel drug carrier system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2013**, 20(2), 138-148.
108. Kawabata Y.; Wada K.; Nakatani M.; Yamada S.; Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *Int J Pharm*, **2011**, 25, 420(1), 1-10.
109. Kazemi P.; Khalid M.H.; Szlęk J.; Mirtič A.; Reynolds G.K.; Jachowicz R.; Mendyk A. Computational intelligence modeling of granule size distribution for oscillating milling. *Powder Technol*, **2016**, 301, 1252-1258.
110. Kesavan K.; Kant S.; Singh P.N.; Pandit J.K. Mucoadhesive chitosan-coated cationic microemulsion of dexamethasone for ocular delivery: In vitro and in vivo evaluation. *Curr Eye Res*, **2013**, 38 (3), 342-352.
111. Khalil E.; Al-Sotari S.T.; Taha M.O. Formulation and Characterization of IPM/Water/Nonionic-Ionic Surfactant Microemulsions. *J Chem Chem Eng*, **2012**, 6, 187-198.
112. Khiew P.S.; Huang N. M., Radiman S.; Ahmad S. Synthesis of NiS nanoparticles using a sugar-ester nonionic water-in-oil microemulsion. *Mater Lett*, **2004**, 58, 762–767.
113. Kluczykowska B. Mikroemulsje - nowe postacie leku. *Farm Pol*, **1996**, 19(52), 921-927.
114. Komesvarakul N.; Sanders M.D.; Szekeres E.; Acosta E.J.; Faller J.F.; Mentlik T.; Fisher L.B.; Nicoll G.; Sabatini D.A.; Scamehorn J.F. Microemulsions of triglyceride-based oils: The effect of co-oil and salinity on phase diagrams. *J Cosmet Sci*, **2006**, 57(4), 309-325.

115. Koop H.S.; De Freitas R.A.; De Souza M.M.; Savi-Jr. R.; Silveira J.L.M. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. *Carbohydr Polym*, **2014**, 116, 229-236.
116. Krauel K.; Girvan L.; Hook S.; Rades T. Characterisation of colloidal drug delivery systems from the naked eye to Cryo-FESEM. *Micron*, **2007**, 38, 796-803.
117. Kreilgaard M.; Pedersen E.J.; Jaroszewski J.W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Contr Release*, **2000**, 69, 421-433.
118. Kriwet K.; Müller-Goymann C.C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm*, **1995**, 125, 231-242.
119. Ktistis G.; I. Niopas. A study on the in-vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems. *J Pharm Pharmacol*, **1998**, 50, 413-418.
120. Kumar K.S.; Dhachinamoorthi. D.; Saravanan R.; UdayKumar G.; Shanmugam V. Microemulsions as Carrier for Novel Drug Delivery: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2011**, 10, 37-45.
121. Kumar P.; Mittal K. *Handbook of Microemulsions science and technology*. Merce Dekker Inc, New York, **1999**.
122. Kumar R.; Sinha V.R. Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery. *Colloid Surface B*, **2014**, 117, 82-88.
123. Kuntsche J.; Horst J.C.; Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int J Pharm*, **2011**, 417, 120-137.
124. Lawrence M.J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **1994**, 3, 257-269.
125. Lawrence M.J.; Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev*, **2012**, 64, 175-193.
126. Leitão H.; Somoza A.M.; Telo da Gama M.M.; Sottmann T.; Strey R. Scaling of the interfacial tension of microemulsions: A phenomenological description. *J Chem Phys*, **1996**, 105, 2875.
127. Li F.; Song S.; Guo Y.; Zhao Q.; Zhang X.; Pan W.; Yang X. Preparation and pharmacokinetics evaluation of oral self-emulsifying system for poorly water-soluble drug Lornoxicam. *Drug Delivery*, **2015**, 22(4), 487-498.
128. Li H.Y.; Pan T.T.; Cui Y.; Li X.X.; Gao J.F.; Yang W.Z.; Shen S.G. Improved oral bioavailability of poorly water-soluble glimepiride by utilizing microemulsion technique. *Int J Nanomedicine*, **2016**, 11, 3777-3788.
129. Lidich N.; Wachtel E.J.; Aserin A.; Garti N. Water-dilutable microemulsions for transepithelial ocular delivery of riboflavin phosphate. *J Colloid Interf Sci*, **2016**, 463, 342-348.
130. Lim G.K.; Wang J.; Ng S.C.; Chew C.H.; Gan L.M. Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes. *Biomaterials*, **1997**, 18, 1433-1439.

131. Lim W.H. Phase diagram, electrical conductivity, and viscosity study of alpha-sulfonated methyl esters derived from palm stearin/1-pentanol/ hydrocarbon/water systems. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2008**, 29 (6), 873-879.
132. Lin Y.-Q.; Gan Y.; Gan L.; Wang B.; Chen X.-X. Preparation of dexamethasone microemulsion for ocular application. *Chinese Pharmaceutical Journal*, **2006**, 41(5), 358-362.
133. Liu, X.; Wang, J.; Gan, L.-M.; Ng, S.-C.; Ding, J. An ultrafine barium ferrite powder of high connectivity from water-in-oil microemulsion. *J Magn Magn Mater*, **1998**, 184, 344-354.
134. LoNostro P.; Choi S.M.; Ku C.Y.; Chen S.H. Fluorinated microemulsions: a study of phase behaviour and structure. *J Phys Chem B*, **1999**, 103, 5347–5352.
135. Lu X.-X.; He L.; Li M.-Y.; Chen J.-N. Pharmacokinetic evaluation after oral administration of raloxifene hydrochloride self-microemulsion in rats. *Chinese Journal of New Drugs*, **2015**, 24(8), 936-941.
136. Lu X.; Chen W.; Li N.; Liu Z.; Long X. Preparation and Dissolution Evaluation of Breviscapine Self-microemulsion. *Journal of Chinese medicinal materials*, **2015**, 38(4), 821-826.
137. Lutz R.; Aserin A.; Wachtel E.J.; Ben-Shoshan E.; Danino D.; Garti N. A study of the emulsified microemulsion by SAXS, Cryo-TEM, SD-NMR, and electrical conductivity. *Dispers Sci Technol*, **2007**, 28, 1149-1157.
138. Ma S.-W.; Gan Y.; Gan L.; Zhu C.-L.; Zhu J.-B. Preparation and in vitro corneal retention behavior of novel cationic microemulsion/in situ gel system. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **2008**, 43(7), 749-755.
139. Madhav S.; Gupta D. A review on microemulsion based system, *IJPSR*, **2011**, 2(8), 1888-1899.
140. Mahdi E.S.; Sakeena M.H.; Abdulkarim M.F.; Abdullah G.Z.; Sattar M.A.; Noor A.M. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. *Drug Des Devel Ther*, **2011**, 5, 311-323.
141. Malcolmson C.; Lawrence M.J. A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems. *J Pharm Pharmacol*, **1993**, 45, 141-143.
142. Malcolmson C.; Lawrence M.J. A comparison between nonionic micelles and microemulsions as a mean of incorporating the poorly water soluble drug diazepam. *J Pharm Pharmacol*, **1981**, 33, 6P.
143. Malcolmson C.; Lawrence M.J. Three-component non-ionic oil-in-water microemulsions using polyoxyethylene ether surfactants, *Colloids Surf B Biointerfaces*, **1995**, 4, 97-109.
144. Mansa R.F.; Bridson R.H.; Greenwood R.W.; Barker H.; Seville J.P.K. Using intelligent software to predict the effects of formulation and processing parameters on roller compaction. *Powder Tech*, **2008**, 181(2), 217-225.

145. Martinez L.A.; Martínez C.G.; Klopotek B.B.; Lang J.; Neuner, A.; Braun A.M.; Oliveros E. Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen in micellar media and microemulsions, *J Photochem Photobiol B Biol*, **2000**, 58, 94–107.
146. Marvin 5.2.12 / 6.2.2 program do rysowania, wyświetlania i charakterystyki struktur chemicznych, 2012 / 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
147. McCulloch W.; Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, **1943**, 7, 115 – 133.
148. Mehta S.K.; Kavaljit X.X.; Bala K. Phase behaviour, structural effects, volumetric and transport properties in nonaqueous microemulsions. *Phys Rev E*, **1999**, 59, 4317–4325.
149. Mendyk A. Symulator sztucznych sieci neuronowych. *Nets2010*, Kraków, **2010**.
150. Mendyk A. Sztuczne sieci neuronowe jako uniwersalne narzędzia do modelowania w technologii postaci leku i biofarmacji: praca doktorska, Katedra TPLiB, UJ CM Wydział Farmaceutyczny, Kraków **2003**.
151. Mendyk A., Szlęk J., Jachowicz R.: ME\_expert 2.0: a heuristic decision support system for microemulsions formulation development, W: Formulation Tools for Pharmaceutical Development, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge **2013**.
152. Mendyk A.; Gures S.; Jachowicz R.; Szlęk J.; Polak S.; Wiśniowska B.; Kleinebudde P. From Heuristic to Mathematical Modeling of Drugs Dissolution Profiles: Application of Artificial Neural Networks and Genetic Programming. *Comput Math Methods Med*, **2015**, art. no. 863874.
153. Mendyk A.; Jachowicz R. Decision Support Systems for Pharmaceutical Formulation Development Based on Artificial Neural Networks. W: Chiang S. Jao (red.), *Decision Support Systems*, InTech, **2010**.
154. Mendyk A.; Jachowicz R. ME\_expert — a Neural Decision Support System as a Tool in the Formulation of Microemulsions. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, **2006**, 26(4), 25–32.
155. Mendyk A.; Jachowicz R. Neural network as a decision support system in the development of pharmaceutical formulation - Focus on solid dispersions. *Expert Syst App*, **2005**, 28(2), 285- 294.
156. Mendyk A.; Jachowicz R. Unified methodology of neural analysis in decision support systems built for pharmaceutical technology. *Expert Syst Appl*, **2007**, 32, 1124-1131.
157. Mendyk A.; Kleinebudde P.; Thommes M.; Yoo A.; Szlęk J.; Jachowicz R. Analysis of pellets properties with use of artificial neural networks. *Eur J Pharm Sci*, **2010**, 41(3-4), 421-429.
158. Molconvert command line tool, program do zmiany formatu i optymalizacji 3D struktur chemicznych pracujący w linii komend, Marvin 5.2.12, **2012**, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
159. Monnoyer Ph.; Fonseca A.; Nagy J. B. Preparation of colloidal AgBr particles from microemulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **1995**, 100, 233-243.

160. Moulik S.P.; Paul B.K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **1998**, 78(2), 99-195.
161. Moulik S.P.; Rakshit A.K. Physicochemistry and applications of microemulsions. *Journal of Surface Science and Technology*, **2006**, 22(3-4), 159-186.
162. Mukhopadhyay L.; Mitra N.; Bhattacharya P.K.; Moulik S.P. Thermodynamics of Formation of Biological Microemulsion (with Cinnamic Alcohol, Aerosol OT, Tween 20, and Water) and Kinetics of Alkaline Fading of Crystal Violet in Them. *J Colloid Interface Sci.*, **1997**, 186, 1-8.
163. Muller R.H, Hildebrand G.E. (red.): *Technologia nowoczesnych postaci leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, **1998**.
164. Narang A.S.; Delmarre D.; Gao D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm*, **2007**, 345(1-2), 9-25.
165. Okur N.U.; Yavasoglu A.; Karasulu H.Y. Preparation and evaluation of microemulsion formulations of naproxen for dermal delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2014**, 62(2), 135-143.
166. Osowski S. *Sieci neuronowe*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej Warszawa **1996**.
167. Paclawski A.; Szlęk J.; Lau R.; Jachowicz R.; Mendyk A. Empirical modeling of fine particle fraction for carrier-based pulmonary delivery formulations. *Int J Nanomedicine*, **2015**, 10, 801—810.
168. Panapisal V.; Charoensri S.; Tantituvanont A. Formulation of microemulsion systems for dermal delivery of silymarin. *AAPS PharmSciTech*, **2012**, 13(2), 389-399.
169. Patel V.; Kukadiya H.; Mashru R.; Surti N.; Mandal S. Development of microemulsion for solubility enhancement of clopidogrel. *Iran J Pharm Res*, **2010**, 9(4), 327-334.
170. Paul B.K.; Moulik S. P. The Viscosity Behaviours of Microemulsions : An Overview. *Proc. Indian National Science Academy – A*, **2000**, 66(5), 499 – 519.
171. Paul B.K.; Moulik S.P. Biological microemulsions: Part III--The formation characteristics and transport properties of saffola-aerosol OT-hexylamine-water system. *Indian J Biochem Biophys*, **1991**, 28(3), 174-183.
172. Paul B.K.; Moulik S.P. Uses and applications of microemulsions. *Current Science*, **2001**, 80(1), 990-1001.
173. Petchsomrit A.; Sermkaew N.; Wiwattanapatapee R. Hydroxypropylmethyl cellulose-based sponges loaded self-microemulsifying curcumin: Preparation, characterization, and in vivo oral absorption studies. *Journal of Applied Polymer Science*, **2016**, 133(6), art. no. 42966.
174. Podlogar F.; Gasperlin M.; Tomsic M.; Jamnik A.; Rogac M.B. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm*, **2004**, 276, 115–128.



175. Polikar R. Ensemble based systems in decision making. *Circuits and Systems Magazine, IEEE*, **2006**, 6(3), 21-45.
176. Pons R.; Carrera I.; Caelles J.; Rouch J.; Panizza P. Formation and properties of miniemulsions formed by microemulsions dilution. *Adv Colloid Interface Sci*, **2003**, 106, 129–146.
177. Qi J.; Zhuang J.; Wu W.; Lu Y.; Song Y.; Zhang Z.; Jia J.; Ping Q. Enhanced effect and mechanism of water-in-oil microemulsion as an oral delivery system of hydroxysafflor yellow A. *Int J Nanomedicine*, **2011**, 6, 985-991.
178. Raza K.; Negi P.; Takyar S.; Shukla A.; Amarji B.; Katare O.P. Novel dithranol phospholipid microemulsion for topical application: Development, characterization and percutaneous absorption studies. *Journal of Microencapsulation*, **2011**, 28 (3), 190-199.
179. Ren Q.; Deng C.; Meng L.; Chen Y.; Chen L.; Sha X.; Fang X. In vitro, ex vivo, and in vivo evaluation of the effect of saturated fat acid chain length on the transdermal behavior of ibuprofen-loaded microemulsions. *J Pharm Sci*, **2014**, 103 (6), 1680-1691.
180. Rhee Y.-S.; Park C.-W.; Nam T.-Y.; Shin Y.-S.; Chi S.-C.; Park E.-S. Formulation of parenteral microemulsion containing itraconazole. *Arch Pharm Res*, **2007**, 30(1), 114-123.
181. Ritschel W.A. Microemulsion technology in the reformulation of cyclosporine: the reason behind the pharmacokinetic properties of Neoral. *Clin Transplant*, **1996**, 10, 364–373.
182. Ritschel W.A. Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, **1991**, 13, 205–220.
183. Rowe R.C.; Sheskey P.J.; Quinn M.E. (eds). Pharmaceutical Excipients. [online] London: Pharmaceutical Press <<http://www.medicinescomplete.com/>>, Monografia: „Coconut oil”, dostęp 30 styczeń **2016**.
184. Ruela A.L.M.; Carvalho F.C.; Pereira G.R. Exploring the Phase Behavior of Monoolein/Oleic Acid/Water Systems for Enhanced Donepezil Administration for Alzheimer Disease Treatment. *J Pharm Sci*, **2016**, 105(1), 71-77.
185. Rusanov A.I. Equation of state and phase transitions in surface monolayer. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2004**, 237, 105-111.
186. Rutkowska D., Piliński M., Rutkowski L., *Sieci neuronowe, algorytmy genetyczne i systemy rozmyte*. PWN, Warszawa-Łódź **1997**.
187. Saha R.; Rakshit S.; Mitra R.K.; Pal S.K. Microstructure, morphology, and ultradynamics of a novel edible microemulsion. *Langmuir*, **2012**, 28, 8309-8317.
188. Samanen J.; Ali F.; Romoff T.; Calvo R.; Sorenson E.; Vasko J.; Storer B.; Berry D.; Bennett D.; Strohsacker M.; Powers D.; Stadel J.; Nichols A. Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro. *Med Chem*, **1991**, 34, 3114–3125.
189. Savelli M.P.; Solans C.; Pons R.; Clause M.; Erra P. Keratin cystine reactivity in microemulsion media: influence of cosurfactant chain length, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **1996**, 119, 155-162.

190. Savelli M.P.; Solans C.; Rodenas E.; Pons R.; Clause M.; Erra P. Kinetic study of keratin cystine reduction in W/O microemulsion media. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **1998**, 143, 103–110.
191. Shah B.; Khunt D.; Misra M.; Padh H. Non-invasive intranasal delivery of quetiapine fumarate loaded microemulsion for brain targeting: Formulation, physicochemical and pharmacokinetic consideration. *Eur J Pharm Sci*, **2016**, 91, 196-207.
192. Shah B.M.; Misra M.; Shishoo C.J.; Padh H. Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: Formulation and ex-vivo characterization. *Drug Deliv*, **2015**, 22(7), 918-930.
193. Sharkey A.J.C. *Combining Artificial Neural Nets–Ensembles and modular multi-net systems*. Springer, Londyn, **1999**.
194. Sharma G.; Wilson K.; van der Walle C.F.; Sattar N.; Petrie J.R.; Kumar M. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm*, **2010**, 76, 159-169.
195. Sheu M.-T.; Hsieh C.-M.; Chen R.-N.; Chou P.-Y.; Ho H.-O. Rapid-Onset Sildenafil Sublingual Drug Delivery Systems: In Vitro Evaluation and In Vivo Pharmacokinetic Studies in Rabbits. *J Pharm Sci*, **2016**, 105(9), 2774-2781.
196. Shinoda K.; Saito H. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT- method. *J. Colloid Interface Sci.*, **1969**, 30(2), 258-263.
197. Sintov A.C.; Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J Control Release.*, **2004**, 95, 173-183.
198. Sjöblom J.; Lindberg R.; Friberg S.E. Microemulsions-phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **1996**, 95, 125-287.
199. Suzuki R.; Shimodaira H. Pvclust, An R package for hierarchical clustering with p-values. *Bioinformatics*, **2006**, 22(12), 1540-1542.
200. Székely G. J.; Rizzo M. L. Hierarchical clustering via Joint Between-Within Distances: Extending Ward's Minimum Variance Method. *Journal of Classification*, **2005**, 22, 151-183.
201. Szekeres E.; Acosta E.; Sabatini D.A.; Harwell J.H. Modeling solubilization of oil mixtures in anionic microemulsions II. Mixtures of polar and non-polar oils. *J Colloid Interface Sci.*, **2006**, 294(1), 222-233.
202. Szlęk J.; Mendyk A.; Polak M.; Jachowicz R. ME\_DSS – system wspomaganie decyzji do przewidywania obszarów występowania mikroemulsji – od modelowania do implementacji w aplikacji komputerowej, *Konferencja PAN Modyfikacje technologiczne w aspekcie zwiększania skuteczności terapeutycznej*, 25 kwietnia **2013**, Wrocław, Polska.
203. Szlęk J.; Paclawski A.; Lau R.; Jachowicz R.; Kazemi P.; Mendyk A. Empirical search for factors affecting mean particle size of PLGA microspheres containing macromolecular drugs. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **2016**, 134, 137-147.



204. Szlęk J.; Paclawski A.; Lau R.; Jachowicz R.; Mendyk A. Heuristic modeling of macromolecules release from PLGA microspheres. *Int J Nanomed*, **2013**, 8, 4601–4611.
205. Szumała P.; Szeląg H. Water Solubilization Using Nonionic Surfactants from Renewable Sources in Microemulsion Systems. *Journal of Surfactants and Detergents*, **2012**, 15(4), 485-494.
206. Tabony J. Formation of cubic structures in microemulsions containing equal volumes of oil and water. *Nature*, **1986**, 319, 400.
207. Taha M.O.; Abdel-Halim H.; Al-Ghazawi M.; Khalil E. QSPR modeling of pseudoternary microemulsions formulated employing lecithin surfactants: Application of data mining, molecular and statistical modeling. *Int J Pharm*, **2005**, 295(1-2), 135-155.
208. Taha M.O.; Al-Ghazawi M.; Abu-Amara H.; Khalil E. Development of quantitative structure–property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and cosurfactants: application of data mining and molecular modeling. *Eur J of Pharm Sci*, **2002**, 15(5), 461-478.
209. Tomsic M.; Podlogar F.; Gasperlin M.; Bester-Rogac M.; Jamnik A. Water–Tween 40/Imwitor 308–isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: small-angle X-ray scattering study. *Int J Pharm*, **2006**, 327, 170–177.
210. Touw W.G.; Bayjanov J.R.; Overmars L.; Backus L.; Boekhorst J.; Wels M.; van Hijum S.A. Data mining in the Life Sciences with Random Forest: a walk in the park or lost in the jungle? *Brief Bioinform*, **2013**, 14(3), 315-326.
211. Trotta M.; Morel S.; Gasco M.R. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from (o/w) microemulsions. *Pharmazie*, **1997**, 52, 50–53.
212. Üstündag-Okur N.; Gökçe E.H.; Eğrilmez S.; Özer O.; Ertan G. Novel ofloxacin-loaded microemulsion formulations for ocular delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **2014**, 30(4), 319-332.
213. Wan T.; Xu T.; Pan J.; Qin M.; Pan W.; Zhang G.; Wu Z.; Wu C.; Xu Y. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*, **2015**, 493 (1-2), 111-120.
214. Wang C.-C.; Chen D.-H.; Huang T.-C. Synthesis of palladium nanoparticles in water-in-oil microemulsions, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2001**, 189, 145–154.
215. Warisnoicharoen W.; Lansley A.B.; Lawrence M.J. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *Int J Pharm*, **2000**, 198, 7–27.
216. Warisnoicharoen, W.; Lansley, A.B.; Lawrence, M.J. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *Int J Pharm.*, **2000**, 198(1), 7–27.
217. Weng T.; Qi J.; Lu Y.; Wang K.; Tian Z.; Hu K.; Yin Z.; Wu W. The role of lipid-based nano delivery systems on oral bioavailability enhancement of fenofibrate, a BCS II drug: Comparison with fast-release formulations. *Journal of Nanobiotechnology*, **2014**, 12(1), art. no. 39.
218. Winsor P. A. Hydrotrophy, solubilisation, and related emulsification processes. Part I. *Trans Faraday Soc*, **1948**, 44, 376 – 398.

219. Wirth R.; Hipp J.; CRISP-DM: Towards a Standard Process Modell for Data Mining, w: *Proceedings of the 4th International Conference on the Practical Applications of Knowledge Discovery and Data Mining*, August 27 – 31, **1998**, in New York.
220. Xu M.; Yu Q.; Zhao Q.; Chen W.; Lin Y.; Jin Y. Development and in vitro-in vivo evaluation of a water-in-oil microemulsion formulation for the oral delivery of troxerutin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **2016**, 42(2), 280-287.
221. Yano J.; Füredi-Milhofer H.; Wachtel E.; Nissim Garti E.; Crystallization of Organic Compounds in Reversed Micelles. I. Solubilization of Amino Acids in Water–Isooctane–AOT Microemulsions, *Langmuir*, **2000**, 16(26), 9996–10004.
222. Yao J.; Wang D.; Zhang X.; Booth-Genthe C.; Zhu P.; He L. Development of docetaxel Self-Microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for parenteral delivery: Preparation, Characterization and in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2012**, 7(6), 386-394.
223. Yu W.; Zou A.; Guo R.; Hydrotrope and hydrotrope-solubilization action of Vitamin C, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, **2000**, 167, 293–303.
224. Yu Z.J.; Neuman R.D. Reversed micellar solution-to-bicontinuous microemulsion transition in sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate/n-heptane/water system. *Langmuir*, **1995**, 11, 1081–1086.
225. Yuan Y.; Che X.; Zhao M.; Wang Y.; Liu Y.; Schwendeman A.; Li S. Development of cyclosporine A microemulsion for parenteral delivery. *Journal of Microencapsulation*, **2015**, 32(3), pp. 273-280.
226. Zadeh L.A. Fuzzy Sets. *Information and Control*, **1965**, 8, 338-353.
227. Zawbaa H.M.; Szlęk J.; Grosan C.; Jachowicz R.; Mendyk A. Computational Intelligence Modeling of the Macromolecules Release from PLGA Microspheres—Focus on Feature Selection. *PLoS ONE*, **2016**, 11(6): e0157610.
228. Zemb T.N. The DOC model of microemulsions: microstructure, scattering, conductivity and phase limits imposed by sterical constraints, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1997**, 129–130, 435-454.
229. Zhang J.; Michniak-Kohn B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *Int J Pharm*, **2011**, 421, 34–44.
230. Zhang X.; Wu Y.; Hong Y.; Zhu X.; Lin L.; Lin Q. Preparation and evaluation of dl-praeruptorin A microemulsion based hydrogel for dermal delivery. *Drug Delivery*, **2015**, 22(6), 757-764.
231. Zhi-hong Z.; Hong-ye D.; Bo P.; Hong-fei L.; Chun-lei L.; Min L.; Wei-san P. Design of an expert system for the development and formulation of push–pull osmotic pump tablets containing poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*, **2011**, 410(1-2), 41-47.
232. Zhu Y.; Zhang J.; Zheng Q.; Wang M.; Deng W.; Li Q.; Firempong C.K.; Wang S.; Tong S.; Xu X.; Yu J. In vitro and in vivo evaluation of capsaicin-loaded microemulsion for

enhanced oral bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2015**, 95 (13), 2678-2685.



## VIII. Spis tabel i rycin.

### Spis tabel

Tabela 1. Przykłady substancji stosowanych do sporządzania mikroemulsji [46, 107, 111, 113, 120, 121, 124, 125, 139, 163, 172].....	20
Tabela 2. Zalety i wady mikroemulsji.....	33
Tabela 3. Przykłady substancji leczniczych opracowanych w formie mikroemulsji dla różnych dróg podania leku.....	34
Tabela 4. Przykłady preparatów w formie mikroemulsji i układów samoemulgujących.....	36
Tabela 5. Lista komend zastosowanych w programie cxcalc warunkująca ilość i jakość otrzymanych deskryptorów cząsteczkowych.....	67
Tabela 6. Skład jakościowy bezwodnych mikroemulsji będących podstawą zbudowania bazy danych.....	90
Tabela 7. Charakterystyka dziesięciu najlepszych względem wartości AUROC sieci neuronowych wytrenowanych na całym zbiorze danych.....	95
Tabela 8. Wyniki badań stabilności modeli sztucznych sieci neuronowych. Podano wartości średnie z dziesięciu modeli $\pm$ odchylenie standardowe.....	98
Tabela 9. Wyniki dwudziestu najlepszych sieci neuronowych wytrenowanych na zbiorze danych 17in_10cv. Kolorem czerwonym oznaczono sieci włączone do komitetu ekspertów.....	98
Tabela 10. Wyniki testowania algorytmów obliczeniowych środowiska WEKA na zbiorze 17in_10cv_orig. Kolorem czerwonym oznaczono model włączony do komitetu ekspertów.....	99
Tabela 11. Sieci neuronowe wchodzące w skład komitetu ekspertów. Proces uczenia przeprowadzono na zbiorze 10cv_orig.....	100
Tabela 12. Wyniki testowania sześciu sieci neuronowo-rozmytych wytrenowanych na zbiorze danych 17in_10cv. Kolorem czerwonym oznaczono sieć z której uzyskano reguły logiczne.....	100
Tabela 13. Zakres liczbowy poziomów zmiennych przyjętych dla ekstrakcji reguł logicznych.....	101
Tabela 14. Substancje pomocnicze użyte do sporządzania mikroemulsji.....	109
Tabela 15. Skład jakościowy układów wyznaczonych przez program ME_DSS.....	110
Tabela 16. Walidacja ME_DSS na zewnętrznym zbiorze eksperymentalnym.....	111
Tabela 17. Skład mikroemulsji serii „a” i serii „b”.....	124
Tabela 18. Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych.....	125
Tabela 19. Wartości środkowe (mediana) właściwości fizykochemicznych mikroemulsji klastra K1 i K2. W nawiasach podano odchylenie kwartylnie.....	128

Tabela 20. Deskryptory powierzchni obliczone na podstawie analizy obrazu zdjęć z mikroskopu skaningowego.....	129
Tabela 21. Właściwości fizykochemiczne badanych układów mikroemulsyjnych po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C, 60% RH).....	135
Tabela 22. Wartości p dwustronnego testu t-Studenta oraz względna różnica ( $S_{rel}$ ) dla wartości zmierzonych przed i po przechowywaniu w komorze klimatycznej przez 30 dni (25°C, 60% RH).....	137
Tabela 23. Właściwości fizykochemicznych badanych układów mikroemulsyjnych.....	143

## Spis rycin

Rycina 1. Liczba publikacji z zakresu mikroemulsji. a) z dziedziny nauk o leku; b) według ich drogi podania. Utworzono na podstawie danych z portalu Web of Science® .....	19
Rycina 2. Zależność liczby HLB od współczynnika upakowania, zmodyfikowane wg [94].....	23
Rycina 3. Schemat diagramu fazowego Gibbsa układu olej/tenzyd/woda, zmodyfikowane na podstawie [125].....	25
Rycina 4. Diagram fazowy Gibbsa. Obszar mikroemulsji (kolor niebieski) wyznaczony doświadczalnie. Współrzędne punktu określają skład mikroemulsji: Brij® 96/Capmul® MCM (1+1) 32%, Miglyol® 812N 48% i woda 20%.....	26
Rycina 5. Struktury mikroemulsji. a) mikroemulsja typu w/o; b) mikroemulsja typu o/w; c) mikroemulsja o strukturze dwuciągłej. Zmodyfikowane na podstawie [120].....	28
Rycina 6. Techniki drażenia danych.....	41
Rycina 7. Metodyka CRISP-DM. Etapy procesu eksploracji danych. Zmodyfikowane na podstawie [219].....	43
Rycina 8. Drzewo klasyfikacyjne utworzone podczas eksperymentu numerycznego.....	45
Rycina 9. Trójwarstwowa sztuczna sieć neuronowa. W nazwie umieszcza się liczbę warstw ukrytych łącznie z warstwą wyjściową.....	46
Rycina 10. Schemat otrzymywania deskryptorów przy pomocy programu Marvin.....	66
Rycina 11. Notacja wykorzystana przy opisywaniu architektur sztucznych sieci neuronowych.....	69
Rycina 12. Zastosowana metodyka podczas ograniczania przestrzeni eksperymentalnej.....	80
Rycina 13. Krzywa wzorcowa oznaczenia zmętnienia metodą turbidymetryczną z użyciem spektrofotometru. ....	84
Rycina 14. Krzywa wzorcowa oznaczenia stężenie ibuprofenu w badanych próbkach metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	86
Rycina 15. Specyficzność metody.....	87
Rycina 16. Konstrukcja bazy danych.....	90

Rycina 17. Wyniki kumulatywnej wrażliwości zbioru liczącego 407 zmiennych w poszczególnych grupach zmiennych.....	95
Rycina 18. Wartości wrażliwości [%] dla wyselekcjonowanego siedemnastowejsiowego wektora.....	96
Rycina 19. Graficzna reprezentacja modelu drzewa decyzyjnego uzyskanego po agregacji reguł logicznych otrzymanych z sieci neuronowo-rozmytej. Węzły decyzyjne stanowią elipsy, a węzły końcowe to prostokąty. W węzłach końcowych w nawiasach zaznaczono ilość obserwacji prawdziwych/fałszywych dla danego atrybutu. ME, obecność mikroemulsji.....	102
Rycina 20. Okno tytułowe programu ME_DSS.....	103
Rycina 21. Okno modułu rysowania trójkątów Gibbsa.....	104
Rycina 22. Kraje z których pobierano programy ME_DSS. Skala barwna odzwierciedla ilość pobrań.....	106
Rycina 23. Okno modułu generowania formuł mikroemulsji do predykcji.....	106
Rycina 24. Okno modułu do automatycznej optymalizacji składu mikroemulsji.....	107
Rycina 25. Obraz trójkąta ME1 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	112
Rycina 26. Obraz trójkąta ME2 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	112
Rycina 27. Obraz trójkąta ME3 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	113
Rycina 28. Obraz trójkąta ME4 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	113
Rycina 29. Obraz trójkąta ME5 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	115
Rycina 30. Obraz trójkąta ME6 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	115
Rycina 31. Obraz trójkąta ME7 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	116
Rycina 32. Obraz trójkąta ME8 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	116
Rycina 33. Obraz trójkąta ME9 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	117
Rycina 34. Obraz trójkąta ME10 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	117
Rycina 35. Obraz trójkąta ME11 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	118

Rycina 36. Obraz trójkąta ME12 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	118
Rycina 37. Obraz trójkąta ME13 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	119
Rycina 38. Obraz trójkąta ME14 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	119
Rycina 39. Obraz trójkąta ME15 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	120
Rycina 40. Obraz trójkąta ME16 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	120
Rycina 41. Obraz trójkąta ME17 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	121
Rycina 42. Obraz trójkąta ME18 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	121
Rycina 43. Obraz trójkąta ME19 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	122
Rycina 44. Obraz trójkąta ME20 wygenerowany przez ME_DSS oraz obszar mikroemulsji wyznaczony eksperymentalnie.....	122
Rycina 45. Dendrogram dla klasteryzacji hierarchicznej właściwości fizykochemicznych mikroemulsji. W rozgałęzieniach podano wartości procentowe przybliżonego nieobciążonego estymatora prawdopodobieństwa wyodrębnienia poszczególnych klas mikroemulsji.....	127
Rycina 46. Obrazy mikroemulsji wykonane przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej z zamrażaniem i łamaniem próbki (a). Topologiczne przekształcenie obrazów wykonane przy użyciu programu ImageJ (b). .....	130
Rycina 47. Matryce korelacji liniowej właściwości fizykochemicznych, a) klastra K1, b) klastra K2. W okręgach podano wartości współczynnika korelacji (r). Wartości przekreślone wskazują na brak istotności ( $p > 0.01$ ). .....	132
Rycina 48. Mikroemulsje serii „a” bezpośrednio po sporządzeniu i po 30 dniach przechowywania w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).....	138
Rycina 49. Mikroemulsje serii „b” bezpośrednio po sporządzeniu i po 30 dniach przechowywania w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).....	138
Rycina 50. Zmiany średnicy cząstek fazy rozproszonej mikroemulsji serii „a” po przechowywaniu w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).....	139
Rycina 51. Zmiany średnicy cząstek fazy rozproszonej mikroemulsji serii „b” po przechowywaniu w komorze klimatycznej (25°C, 60% RH).....	139
Rycina 52. Mikroemulsje z ibuprofenem. Na dalszej ściance fiołki widoczna jest biała etykieta.....	140



Rycina 53. Zawartość ibuprofenu w mikroemulsjach przechowywanych w komorach klimatycznych w normalnych warunkach (25°C, 60% RH).....	141
Rycina 54. Moduły składowe aplikacji ME_DSS.....	149



## Publikacje własne

### 1. Publikacje związane z pracą doktorską.

#### 1.1. Rozdział w pracy zbiorowej:

Mendyk A.; **Szłęk J.**; Jachowicz R. ME\_expert 2.0: a heuristic decision support system for microemulsions formulation development, str. 39-71 W: Formulation Tools for Pharmaceutical Development, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge 2013, J.E. Aguilar (eds.). ISBN 9781907568992, <http://dx.doi.org/10.1533/9781908818508.39>.

#### 1.2. Publikacje w czasopismach:

**Szłęk J.**; Paclawski A.; Lau R.; Jachowicz R.; Mendyk A. Heuristic modeling of macromolecules release from PLGA microspheres. *Int J Nanomed*, **2013**, 8, 4601–4611.

KBN: 35

IF: 4.195

**Szłęk J.**; Paclawski A.; Lau R.; Jachowicz R.; Kazemi P.; Mendyk A. Empirical search for factors affecting mean particle size of PLGA microspheres containing macromolecular drugs. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **2016**, 134, 137-147.

KBN: 30

IF: 1.862

Zawbaa H.M.; **Szłęk J.**; Grosan C.; Jachowicz R.; Mendyk A. Computational Intelligence Modeling of the Macromolecules Release from PLGA Microspheres—Focus on Feature Selection. *PLoS ONE*, **2016**, 11(6): e0157610. doi: 10.1371/journal.pone.0157610.

KBN: 40

IF: 3.057

Kazemi P.; Khalid M.H.; **Szłęk J.**; Mirtič A.; Reynolds G.K.; Jachowicz R.; Mendyk A. Computational intelligence modeling of granule size distribution for oscillating milling, *Powder Technology*, **2016**, 301, 1252-1258.

KBN: 30

IF: 2.759

### 1.3. Referaty i komunikaty w materiałach konferencyjnych:

**Szłęk J.**, Mendyk A., Polak M., Jachowicz R., ME\_DSS – system wspomagania decyzji do przewidywania obszarów występowania mikroemulsji – od modelowania do implementacji w aplikacji komputerowej, Konferencja PAN Modyfikacje technologiczne w aspekcie zwiększania skuteczności terapeutycznej, 25 kwietnia 2013, Wrocław, Polska. (streszczenie zjazdowe)

**Szłęk J.**, Mendyk A., Polak M., Jachowicz R., Ocena przydatności systemu wspomagania decyzji (ME\_DSS) do przewidywania składu mikroemulsji, XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 18 – 21 września 2013, Białystok. (streszczenie zjazdowe)

## 2. Pozostałe publikacje

### 2.1. Publikacje w czasopismach:

Khalid M.H.; Tuszyński P.K.; **Szłęk J.**; Jachowicz R.; Mendyk A. Transparent computational intelligence models for pharmaceutical tableting process. *Complex Adapt Syst Model*, **2016**, 4(7), 1-11.

KBN: -

IF: -

Krupa A.; Majda D.; Mozgawa W.; **Szłęk J.**; Jachowicz R. Physicochemical Properties of Bosentan and Selected PDE-5 Inhibitors in the Design of Drugs for Rare Diseases. *AAPS PharmSciTech*, **2016**, *Epub ahead of print*, doi: 10.1208/s12249-016-0599-7.

KBN: 25

IF: 1.776

Wiśniowska B.; Mendyk A.; **Szłęk J.**; Kołaczkowski M.; Polak S. Enhanced QSAR models for drug-triggered inhibition of the main cardiac ion currents. *J. Appl. Toxicol.*, **2015**, 35(9), 1030-1039.

KBN: 30

IF: 2.722

Paclawski A.; **Szłęk J.**; Lau R.; Jachowicz R.; Mendyk A. Empirical modeling of fine particle fraction for carrier-based pulmonary delivery formulations. *Int J Nanomed*, **2015**, 10, 801—810.

KBN: 35

IF: 4.320

Mendyk A.; Gures S.; Jachowicz R.; **Szłęk J.**; Polak S.; Wiśniowska B.; Kleinebudde P. From Heuristic to Mathematical Modeling of Drugs Dissolution Profiles: Application of Artificial Neural Networks and Genetic Programming. *Comput. Math. Methods Med.*, **2015**, art. no. 863874.

KBN: 15

IF: 0.887

Krupa A.; **Szłęk J.**; Jany B.; Jachowicz R. Preformulation Studies on Solid Self-Emulsifying Systems in Powder Form Containing Magnesium Aluminometasilicate as Porous Carrier. *AAPS PharmSciTech*, **2015**, 16 (3), 623-635.

KBN: 25

IF: 1.776

Nguyen T.; Giam H.; Wang Y.; Paclawski A.; **Szłęk J.**; Mendyk A.; Shao Y.-H.; Lau R. Surface modification of pollen-shape carriers for dry powder inhalation through surface etching. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2014**, 53 (51), 19943–19950.

KBN: 35

IF: 2.235

Mendyk A.; Paclawski A.; **Szłęk J.**; Jachowicz R. PhEq\_bootstrap: Open-Source Software for the Simulation of f2 Distribution in Cases of Large Variability in Dissolution Profiles. *Dissolut. Technol.*, **2013**, 20(1), 13 – 17.

KBN: 15

IF: 0.712

Mendyk A.; Wiśniowska B.; Fijorek K.; Glinka A.; Polak M.; **Szłęk J.**; Polak S. Empirical Modeling of the Sodium Channel Inhibition Caused by Drugs. *Computing in Cardiology*, **2012**, 39, 293 – 296.

KBN: -

IF: -

Wiśniowska B.; Mendyk A.; Polak M.; **Szłęk J.**; Polak S. RandomForest based assessment of the hERG channel inhibition potential for the early drug cardiotoxicity testing. *Bio-Algorithms and Med-Systems*, **2010**, 6(12), 131–136.

KBN: 6

IF: -

Mendyk A.; Kleinebudde P.; Thommes M.; Yoo A.; **Szłęk J.**; Jachowicz R. Analysis of pellets properties with use of artificial neural networks, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2010**, 41(3-4), 421-429.

KBN: 35

IF: 3.291

Bajda M.; Bucki A.; **Szłęk J.**; Szwaczkiewicz M.; Świerczek M.; Malawska B. Determination of lipophilicity of  $\alpha$ -(4-phenylpiperazine) derivatives of N-benzylamides using chromatographic and computational methods. *Biomedical Chromatography*, **2008**, 22 (4), 428-432.

KBN: 20

IF: 1.592

## 2.2. Pozostałe referaty i komunikaty w materiałach konferencyjnych:

**Szłęk J.**, Jamróz W., Mendyk A., Artificial neural networks for identification of relationships governing formation of nanoemulsions, 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta, Valletta 8-11 March 2010. (streszczenie zjazdowe)

Basista K., Bucki A., Demczuk B., Kopytko M., Pietras K., **Szłęk J.**, Świerczek M., Malawska B. Proleki, farmakoterapia jutra przyjazna pacjentowi, Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów Uczelni Medycznych, Kraków, 6-9 kwietnia, 2006. Abst.: Prz. Lek., 2006, 63(supl. 2), 26.(streszczenie zjazdowe)

Bajda M., Bucki A., **Szłęk J.**, Szwaczkiewicz M., Świerczek M., Malawska B. Badanie lipofilowości modelowej serii analogów kwasu gamma-hydroksymasłowego. Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów Uczelni Medycznych, Kraków, 6-9 kwietnia. Abst.: Prz. Lek. 2006, 63(supl. 2), 23.(streszczenie zjazdowe)

**Szłęk J.**, Mendyk A., Zastosowanie sztucznych sieci neuronowych w predykcji profili uwalniania triamcynolonu z peletek. Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów Uczelni Medycznych, Kraków, 3-4.04.2007. Abstr.: Prz. Lek., 2008 65(supl. 1), 15.(streszczenie zjazdowe)

**Szłęk J.**, Jachowicz R. Wpływ krzemianu magnezowo-glinowego na rozpuszczalność i szybkość rozpuszczania furosemidu z układów proszkowych, Konferencja PAN, Wpływ czynników technologicznych na wchłanianie substancji leczniczej z postaci leku, Warszawa 2009. (streszczenie zjazdowe)

Wiśniowska B., Mendyk A., Polak M., **Szłęk J.**, Polak S., RandomForest based assessment of the hERG channel inhibition potential for the early drug cardiotoxicity testing. MCSB 2010, Kraków 21-22.05.2010. (streszczenie zjazdowe)

**Szlęk J.**, Mendyk A., Jachowicz R., Ocena krytycznych parametrów procesu nanoprecypitacji przy użyciu sztucznych sieci neuronowych, XXI Naukowy Zjazd PTFarm, Gdańsk, 12-15 września 2010. (streszczenie zjazdowe)

Polak S., Wiśniowska B., Polak M., **Szlęk J.**, Glinka A., Mendyk A., Computational toxicology – in silico assessment of the hERG channel inhibition potential for the early drug cardiotoxicity testing, Chemaxon's European UGM Markush Forum, May 16-19, Budapest, Hungary, 2011. (streszczenie zjazdowe)

Mendyk A., Wiśniowska B., Polak M., **Szlęk J.**, Glinka A., Polak S., Artificial neural networks for carditoxicity prediction of drugs - practical considerations 8th ESMTB Conference, June 28 - July 2, Cracow, Poland, 2011. (streszczenie zjazdowe)

Polak S., Wiśniowska B., Polak M., **Szlęk J.**, Glinka A., Fijorek K. Mendyk A., ToxComp 1.2 – an Open Source iv vitro in vivo extrapolation (IVIVE) system for cardiotoxicity prediction with Marvin plugins embedded. ChemAxon UGM Budapest 2012, May 22-23, Budapest. (streszczenie zjazdowe)

**Szlęk J.**, Paclawski A., Lau R., Jachowicz R., Mendyk A., Heuristic modeling of macromolecules release from PLGA microspheres, 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences, Interdisciplinary research for pharmacy, May 24-25, 2013, Gdańsk, Poland. (streszczenie zjazdowe)

**Szlęk J.**, Krupa A., Jachowicz R., Mendyk A., Heuristic modeling of dissolution rate of BCS class II APIs from solid dispersion systems, Konferencja 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon, Portugal, 31st March - 3rd April, 2014. (streszczenie zjazdowe)

**Szlęk J.**, Paclawski A., Lau R., Mendyk A., Jachowicz R., Modelowanie nieliniowe wielkości mikrocząstek kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego zawierających peptydy, Konferencja PAN, Optymalizacja postaci leku: Nowe rozwiązania technologiczne w dążeniu do bezpiecznej farmakoterapii, Kraków, 25-26 Kwiecień 2014. (streszczenie zjazdowe)

Mendyk A., **Szlęk J.**, Session 2 - Still in discovery: in silico prediction of the in vitro characteristics OR what to expect from my molecule before it goes to the lab? 6th Workshop Computational Methods in Pharmaceutical Sciences, Summer School, Kraków, Poland, 2nd - 4th July, 2014. (wystąpienie ustne)

Paławski A., Kazemi P., **Szłęk J.**, Lau R., Jachowicz R., Mendyk A., Modeling of fine particle fraction and optimization of formulation for pulmonary delivery, Particulate Processes in the Pharmaceutical Industry IV, Potsdam, Germany, 14th –18th September, 2014. (streszczenie zjazdowe oraz wystąpienie ustne)

**Szłęk J.**, Mendyk A., Feature selection with empirical models, IPROCUM, ATC3: advanced training course on Intelligent modelling: principles & applications, Kraków, Poland. 21st - 23rd October 2014. (wystąpienie ustne)

**Szłęk J.**, Mendyk A., Hands-on: optimization approaches with R, IPROCUM, ATC3: advanced training course on Intelligent modelling: principles & applications, Kraków, Poland. 21st - 23rd October 2014. (wystąpienie ustne)