

Research Paper

Fabrication of Clotrimazole Microparticles Using Polyethylene Glycol 6000 and Beeswax



Kobra Najafzadeh Mahvizani¹, Marjan Daeihamed¹ , Gita Alkan Saberi¹ , *Zahra Hesari¹

1. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.



Citation Najafzadeh Mahvizani K, Daeihamed M, Alkan Saberi G, Hesari Z. [Fabrication of Clotrimazole Microparticles Using Polyethylene Glycol 6000 and Beeswax (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2023; 31(4):312-327. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1928.1>

<https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1928.1>



Received: 26 Jan 2022

Accepted: 23 Aug 2022

Available Online: 01 Jan 2023

Keywords:

Clotrimazole,
Microparticle, Spray
Drying, Beeswax,
Polyethylene Glycol
6000

ABSTRACT

Background Microparticles are one of drug delivery systems designed for sustained and controlled release of drugs for a long period of time. Clotrimazole is a broad-spectrum antifungal agent, which is generally used for treatment of *Candida albicans* and others fungal infections.

Objective The present study aims to fabricate Clotrimazole microparticles using beeswax (lipophilic coating) and polyethylene glycol (hydrophilic coating).

Methods In this study, Clotrimazole microparticles by polyethylene glycol (PEG 6000) and beeswax were prepared using spray drying technique. Morphology and size of the microparticles were assessed using optical microscopy and scanning electron microscopy. Particle size analyses were performed using Zetasizer technique. The drug release rate was measured using ultraviolet-visible spectroscopy. To study the interactions between microparticles and carriers, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used.

Results Size of the microparticles was below 1000 μm . The microparticles prepared from beeswax and PEG 6000 had quasicrystalline and crystalline morphologies, respectively. The maximum drug release rate in 6 hours was 80.53% in formulation F3 (microparticles prepared by beeswax) and 79.29 in formulation F6 (microparticles prepared by PEG 6000). The FTIR results showed probable interactions between clotrimazole microparticles and beeswax.

Conclusion Both beeswax and PEG 6000 polymers result in similar rate of drug release; however, since beeswax has interactions with clotrimazole, PEG 600 formulation seems to be more appropriate for fabrication of clotrimazole microparticles.

*** Corresponding Author:**

Zahra Hesari

Address: Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Tel: +98 (912) 3532879

E-Mail: z.hesari@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

The appropriate method of drug delivery has a significant effect on the efficiency of the drug and its side effects. Novel drug delivery approaches seek to design effective drug delivery systems with goals such as reducing side effects, increasing bioavailability, and targeted transfer of drugs on the one hand, and overcoming barriers such as the blood-brain barrier, on the other hand [1]. The use of microparticles as drug carriers in different systems has improved the therapeutic performance of drugs due to having advantages such as the possibility of easier preparation, controlled drug release, and targeted drug delivery [2]. Microparticles are drug delivery systems designed for stable and controlled delivery of drugs for a long period of time. Microparticles have a small core consisted of solid or liquid materials that are surrounded by natural or synthetic polymer films or carriers, with different thickness and degree of permeability. These films or carriers act as the regulator of drug release rate. The coating of microparticles can be considered as a factor to mask their unpleasant taste and odor, and increase the stability and even the solubility of the active pharmaceutical ingredient [3-5]. Spray drying method is used for changing liquid contents into dry particles by spraying the liquid into a hot drying chamber through providing a sufficient volume of hot air which can evaporate the liquid droplets and dry the particles scattered in this environment. The content can be a solution, suspension, emulsion, gel or paste, provided that it can be pumped and sprayed [6].

Clotrimazole is a broad-spectrum antifungal drug that is mainly used to treat *Candida albicans* and other fungal infections. Clotrimazole, a synthetic imidazole antifungal, is widely used as a topical treatment for foot infections in athletes and also to treat vulvovaginal and oropharyngeal candidiasis [11]. Clotrimazole is a very lipophilic drug with a partition coefficient higher than 5 and a very low solubility in water (0.49 mg/L), which can reduce the bioavailability of the drug [13]. Therefore, techniques such as preparation of microparticles from the drug, depending on the type of used coating, can help increase the solubility or increase the release rate of the drug from the final pharmaceutical form. In this study, an attempt was made to make clotrimazole microparticles by using two types of hydrophilic (polyethylene glycol) and lipophilic (beeswax) coatings and the spray drying technique, and then assess the effect of coating type on physicochemical behaviors such as particle size and dissolution and release rate of the drug from the particles.

Methods

Fabrication of clotrimazole microparticles using beeswax and polyethylene glycol

To produce clotrimazole microparticles consisting of beeswax or polyethylene glycol (PEG 6000), a modified (in-house) method was used adapted from the method proposed by Fouad et al [14]. It was used at a temperature of 70°C. The dried particles containing carrier and drug were separated from the walls of the chamber and subjected to further analysis (Table 1).

Table 1. Components used in formulations F₁ to F₆, and the drug release rate from each formulation in 6 hours.

Formulation	Clotrimazole (g)	Beeswax (g)	Ethanol (mL)	PEG 6000 (g)	Acetone (mL)	Mean±SD
						Drug release rate in 6 h
F ₁	5	5	10	-	-	41.09±0.01
F ₂	5	10	10	-	-	65.27±3.2
F ₃	5	25	10	-	-	80.52±2.54
F ₄	5	-	-	5	50	46.72±2.87
F ₅	5	-	-	10	50	60.70±7.65
F ₆	5	-	-	25	50	79.29±5.27

Physicochemical evaluation of clotrimazole microparticles

Obtained microparticles were subjected to particle size analysis using optical microscopy and Zetasizer technique. Particle morphology evaluation was carried out using scanning electron microscope (SEM), and investigation of probable interactions between the drug and excipients in the microparticles was done using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Drug release rate from microparticles was also tested.

Results

The light microscope images with 1000x magnification showed that the particles were mostly spherical with irregular surfaces. The formulations F_1 to F_3 (microparticles coated with different proportions of beeswax) had a diameter of about 20 micrometers. On the other hand, formulations F_4 to F_6 (microparticles coated with different proportions of polyethylene glycol) had a diameter of about 100 micrometers (Figure 1). The resulting SEM images showed that the microparticles obtained from both methods had irregular surfaces and non-uniform morphology (Figure 2). Regarding the Zetasizer results, the size of beeswax particles ranged 10-100 micrometers, while the size of polyethylene glycol particles ranged 100-1000 micrometers (Figure 3).

The FTIR results showed that the specifications of infrared absorption peaks of pure Clotrimazole related to C-H aromatic branch (13176 cm^{-1}), C=C aromatic branch (1589 cm^{-1}), C=N branch (11570 cm^{-1}) and C-H aromatic band (1761 cm^{-1}) was repeated in the FTIR spectrum obtained from microparticles with polyethylene glycol, but these peaks were not observed in the microparticles fabricated by beeswax (Figure 4).

After drawing the calibration curve for clotrimazole in phosphate buffer pH=7.4, the drug release rate of all six formulations were evaluated at time intervals of 30, 60, 180 and 360 minutes and a wavelength of 260 nm. The results showed that the cumulative release rate of clotrimazole in formulations F_1 to F_3 increased from 41 to 80%, respectively. This pattern was the same in formulations F_4 to F_6 where the cumulative release rate increased from 46 to 79% (Figure 5 and Table 1).

Discussion

In this study, clotrimazole drug was tuned into microparticles using spray drying method and used on two carriers of beeswax and polyethylene glycol 6000 in different ratios. The results of particle analysis using Zetasizer technique showed that the size of microparticles prepared from beeswax and polyethylene glycol 6000 were below 1000 micrometers in all ratios. The size of microparticles

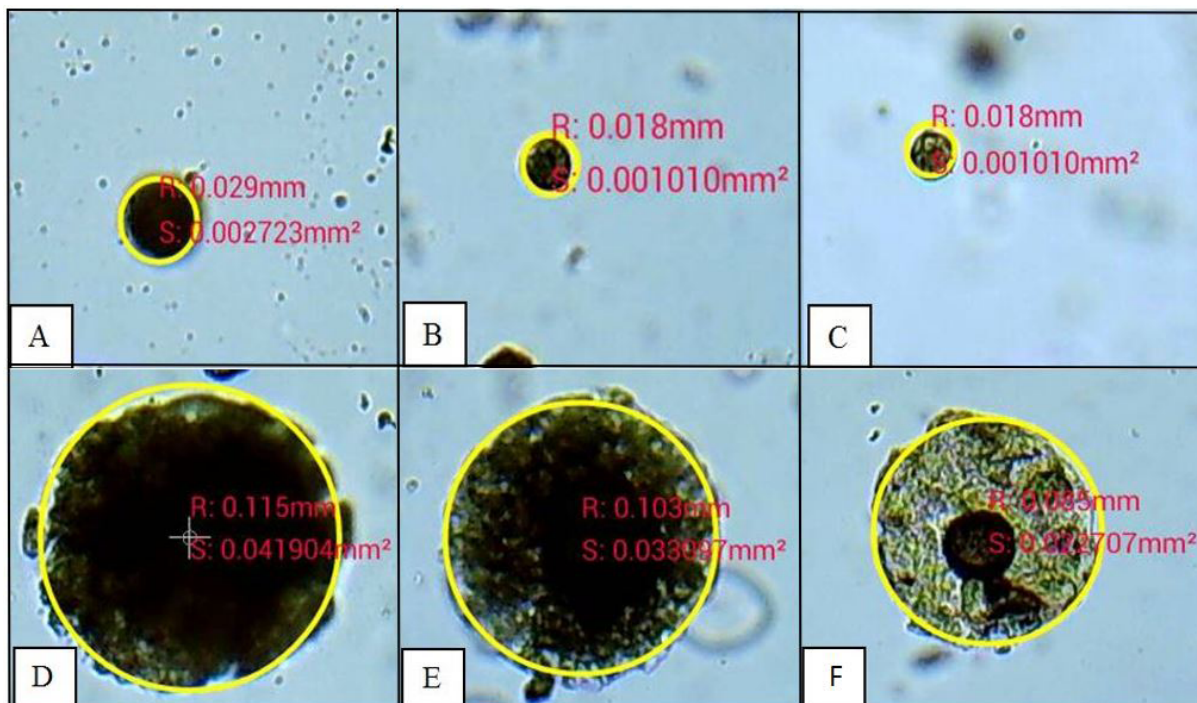
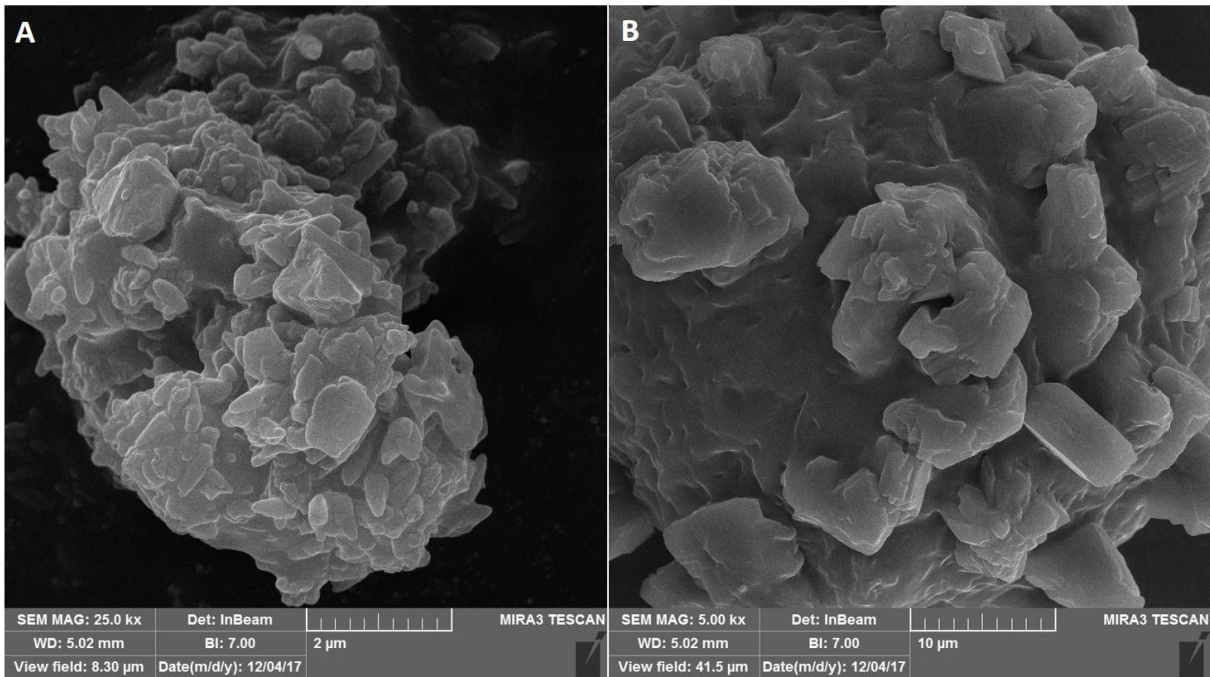


Figure 1. Light microscopic image of microparticles prepared using beeswax (A= F_1 , B= F_2 , C= F_3) and PEG 6000 (D= F_4 , E= F_5 , F= F_6)

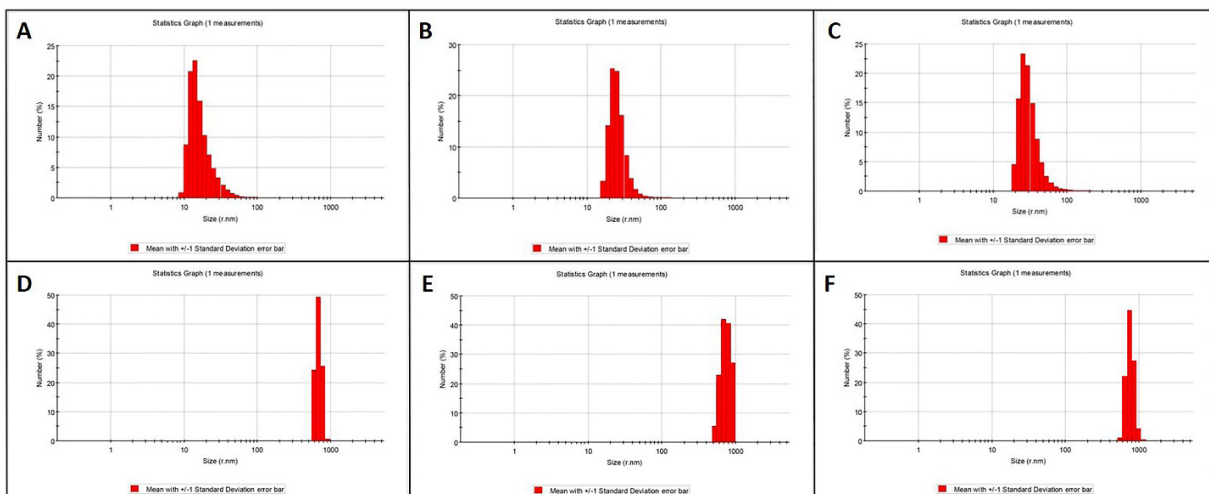


Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Figure 2. Scanning electron microscopic image of microparticles prepared using beeswax F_3 (A) and PEG 6000 F_6 (B)

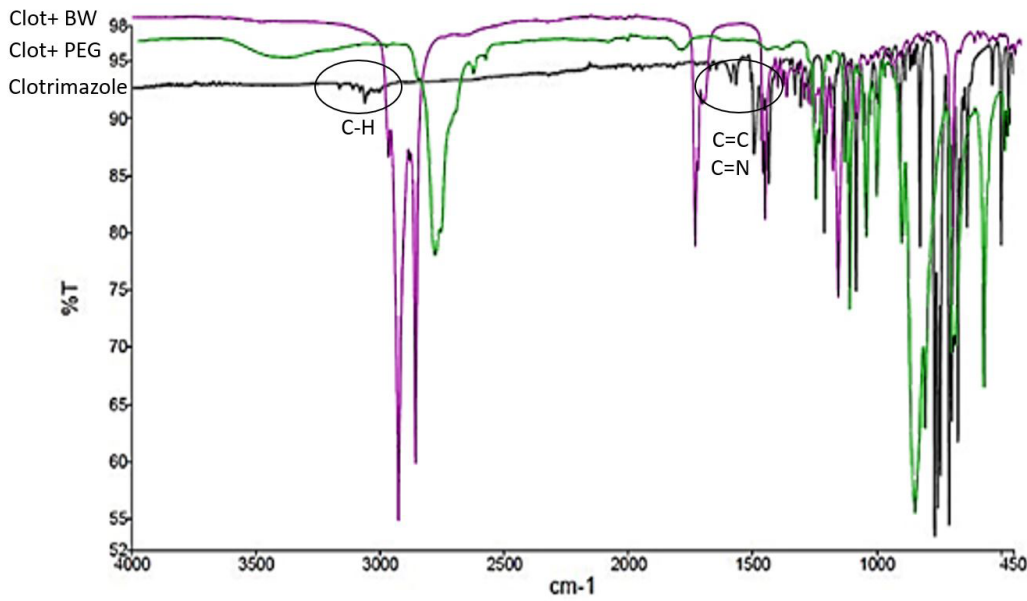
prepared from beeswax with three ratios were in the range of 10-100 micrometers. Examining the three ratios of microparticles prepared from polyethylene glycol 6000 showed that, compared to beeswax, the size of particles was in the range of 100-1000 micrometers, and this range showed a significant difference compared to that of microparticles from beeswax. A similar study in 2012 used polyethylene glycol 6000, mannitol, carbopol 934, stea-

ric acid, and beeswax to prepare solid lipid nanoparticles containing clotrimazole, and it was shown that the size of particles was in the range of 100-1000 nanometers [17]. It is consistent with the results related to the size of microparticles prepared with polyethylene glycol 6000 in our study. In another study that was conducted for the local use of clotrimazole microparticles, it was shown that the size of clotrimazole particles (prepared with stearic acid as solid lipid, and oleic acid as liquid lipid) were in the range of 100-200 nm [16].



Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Figure 3. The size of microparticles prepared using beeswax (A= F_1 , B= F_2 , C= F_3) and PEG 6000 (D= F_4 , E= F_5 , F= F_6)

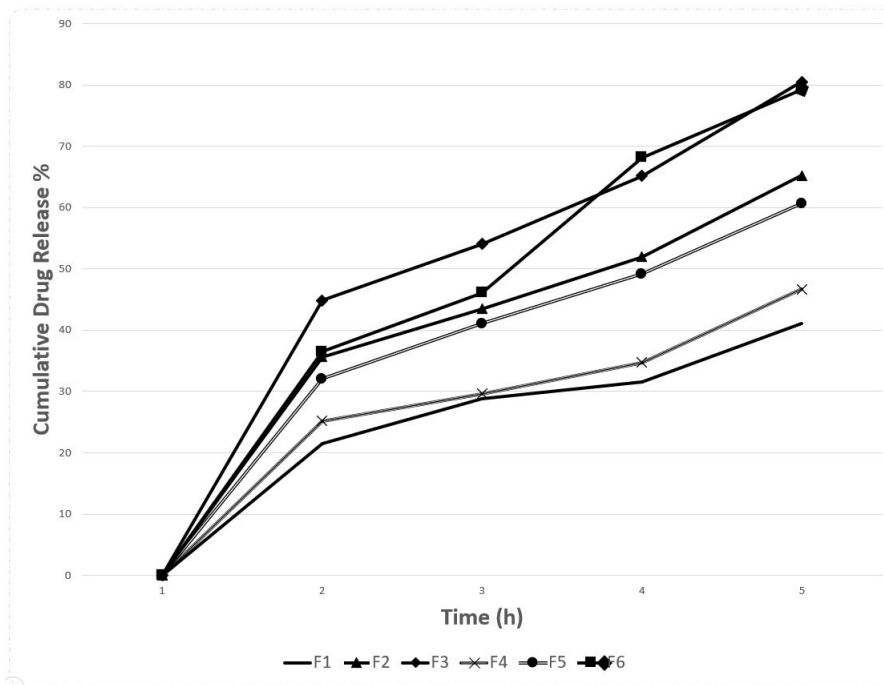


Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Figure 4. Comparing FTIR of clotrimazole pure powder (shown in black) with clotrimazole+beeswax (shown in purple) and clotrimazole + PEG 6000 (shown in green)

The drug release pattern showed that the highest rate of release over time was seen in formulations F₃ and F₆ (80.52% and 79.29%, respectively). There was no statistically significant difference in the drug release rate in 6 hours between these two formulations (P>0.05). It seems that due to the very high lipophilicity of Clotrimazole, the most important step in determining the drug release

rate is the dissolution of the drug in an aqueous medium, in addition to the role of lipophilic or hydrophilic carrier. Therefore, the drug release rate over time between microparticles prepared from beeswax and polyethylene glycol was not significantly different. This justifies the reason for increased drug release rate in formulations that contain a lower portion of the drug. Over time, a certain



Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Figure 5. Cumulative drug release percentages of the formulations F₁ to F₆ in 6 hours

amount of the drug is dissolved in an aqueous medium; in formulations F_1 and F_4 , since the amount of drug was more than that in formulations F_3 and F_6 , a lower portion was dissolved. These results have been observed in other studies on clotrimazole [18]. However, some studies have confirmed the increase of clotrimazole solubility by using solid dispersion technique and compounds such as sugars (mannitol) or water-soluble polymers (Pluronic) [19, 20].

Overall, it can be concluded that both lipophilic and hydrophilic coatings of clotrimazole show a similar pattern of drug release; however, regarding the reaction of the polymer with the drug, clotrimazole microparticles coated by beeswax have interactions with drug, which means that coating by polyethylene glycol 6000 polymer has superiority.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the ethics committee of [Guilan University of Medical Sciences](#) (Code: IR.GUMS.REC.1396.492). All ethical principles were observed in this study.

Funding

This research was done with the financial support of Kobra Najafzadeh Mahvizani.

Authors' contributions

Study concept and design: Zahra Hesari; Acquisition, analysis, or interpretation of data: Kobra Najafzadeh-Mahvizani, Gita Alkan Saberi; Drafting of the manuscript: Zahra Hesari; Statistical analysis: Zahra Hesari, Kobra Najafzadeh-Mahvizani; Funding acquisition: Kobra Najafzadeh-Mahvizani, Zahra Hesari; Administrative, technical, or material support: Marjan Daei hamed, Zahra Hesari; Study supervision: Zahra Hesari.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the School of Pharmacy, [Guilan University of Medical Sciences](#) and the [Journal of Gilan University of Medical Sciences](#) for their cooperation.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت میکروذرات کلوتریمازول با استفاده از پلیمر پلی اتیلن گلایکل و موم زنبور عسل

کبری نجف‌زاده مهویزانی^۱، مرجان دایی حامد^۱، گیتا الکن صابری^۱، زهرا حصاری^۱

۱. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.



Citation Najafzadeh Mahvizani K, Daeihamed M, Alkan Saberi G, Hesari Z. [Fabrication of Clotrimazole Microparticles Using Polyethylene Glycol 6000 and Beeswax (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2023; 31(4):312-327. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1928.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1928.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۶ بهمن ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۱ شهریور ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۱

زمینه: میکرو ذرات یکی از سیستم‌های دارورسانی برای انتقال پایدار دارو در زمان طولانی است. کلوتریمازول یک داروی ضدقارچ پرمصرف است.

هدف: ساخت میکروذرات کلوتریمازول با ۲ حامل پلی‌اتیلن گلایکل و موم زنبور عسل جهت کنترل الگوی رهش دارو است.

روش‌ها: میکروذرات کلوتریمازول با استفاده از ۲ حامل به‌روش خشک کردن توسط اسپری تهیه شدند. مورفولوژی و اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی و تحلیل اندازه ذرات با استفاده از آنالیزور ذرات زتاسایزر انجام شد. بررسی درصد آزادسازی میکروذرات با استفاده از اسپکتروسکوپی UV انجام شد. تحلیل طیف‌سنجی فروسرخ، به‌منظور شناسایی برهم‌کنش‌های احتمالی بین میکروذرات کلوتریمازول با سایر اجزا انجام شد.

یافته‌ها: اندازه میکروذرات با هر ۲ نوع حامل در دامنه زیر هزار میکرومتر بود. مورفولوژی نشان داد میکروذرات ساخته‌شده با استفاده از موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلیکول به‌ترتیب ساختار شبه کریستالی و کریستالی داشتند. بررسی آزادسازی دارو، بیانگر حداکثر رهایش ۸۰/۵۲ درصدی در فرمولاسیون F_۳ میکروذرات تهیه‌شده با موم زنبور عسل و حداکثر رهایش ۷۹/۲۹ درصدی در فرمولاسیون F_۶ میکروذرات تهیه‌شده با پلیمر پلی‌اتیلن گلایکل بود. تحلیل طیف‌سنجی فروسرخ نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش بین کلوتریمازول و موم زنبور عسل بود. **نتیجه‌گیری:** هر ۲ پلیمر از نظر الگوی آزادسازی دارو با یکدیگر مشابهت زیادی داشتند، اما از نظر واکنش پلیمر با دارو نشان داده شد که موم زنبور عسل با دارو واکنش نشان می‌دهد که از این نظر پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول مزیت دارد.

کلیدواژه‌ها:

کلوتریمازول، میکروذره، خشک کردن توسط اسپری، موم زنبور عسل، پلی‌اتیلن گلایکل ۶۰۰۰

* نویسنده مسئول:

زهرا حصاری

نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس.

تلفن: ۳۵۳۲۸۷۹ (۹۱۲) ۰۹۸+

رایانامه: z.hesari@gmail.com

مقدمه

کلوتریمازول یک داروی ضدقارچ وسیع‌الطیف است که به‌طور عمده برای درمان کاندیدا البیکنس و سایر عفونت‌های قارچی استفاده می‌شود. کلوتریمازول، ضدقارچ مصنوعی ازولی، به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان درمان موضعی برای عفونت پا (پای ورزشکاران) و همچنین به‌عنوان درمان کاندیدیا زوولوواژینال و اوروفارنکس استفاده می‌شود [۱۱]. این دارو اثر ضدقارچی خود را با جلوگیری از بیوسنتز ارگوسترول انجام می‌دهد و در نتیجه، مانع رشد قارچ می‌شود [۱۲].

کلوتریمازول دارویی بسیار چربی‌دوست با ضریب توزیع بالاتر از ۵ و محلولیت در آب بسیار پایین (۰/۴۹ میلی‌گرم بر لیتر) است که این امر می‌تواند موجب کاهش فراهمی زیستی دارو شود [۱۳]. از این‌رو، استفاده از تکنیک‌هایی مانند تهیه میکروذره از دارو، برحسب نوع روکش استفاده‌شده می‌تواند به افزایش محلولیت یا افزایش سرعت رهش دارو از شکل دارویی نهایی کمک کند. در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از ۲ نوع روکش هیدروفیل (پلی‌اتیلن گلیکول) و لیپوفیل (موم زنبور عسل) و با استفاده از تکنیک خشک کردن با اسپری، میکروذرات کلوتریمازول ساخته شود و تأثیر نوع روکش بر رفتارهای فیزیکوشیمیایی، مانند اندازه ذره و افزایش احتمالی سرعت انحلال و رهش دارو از ذرات بررسی شود.

روش‌ها

ساخت میکروذرات کلوتریمازول با استفاده از موم زنبور عسل

برای تهیه میکروذرات کلوتریمازول متشکل از موم زنبور عسل از روش اصلاح‌شده^۱ برگرفته‌شده از روش پیشنهادی فؤاد و همکاران استفاده شد [۱۴]. به این شرح که در این روش از ابزار اسپری برای اسپری کردن محلول دارویی در محفظه دارای جریان هوای گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. ذرات خشک‌شده حاوی حامل و دارو از دیواره‌های محفظه جدا شده و مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفتند. به این منظور، با استفاده از موم زنبور عسل میکروذرات کلوتریمازول نسبت‌های (F₁) ۱:۱، (F₂) ۱:۲ و (F₃) ۱:۵ از دارو و موم تهیه شد (جدول شماره ۱).

در ابتدا نسبت ۱:۱ با ۵ گرم کلوتریمازول و ۵ گرم موم زنبور عسل توزین شده و داخل بشر شیشه‌ای قرار داده شدند. سپس در داخل بن‌ماری ذوب‌شده و درجه حرارت دستگاه روی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. متعاقب ذوب مواد ۱۰ میلی‌لیتر اتانول به‌عنوان حلال به مواد مذاب افزوده شد. سپس مجموعه مواد داخل دستگاه اسپری انتقال داده‌شده و در یک محفظه پلاستیکی که از پایین هوای گرم در حال دمیده شدن بود، اسپری شد. پس از ۳۰ دقیقه جریان هوا قطع شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت ذرات از روی صفحه محفظه جمع‌آوری شده و برای ارزیابی‌های بعدی در ظروف پلاستیکی در بسته نگهداری شدند.

روش مناسب دارورسانی اثر درخور توجهی بر بازده اثربخشی دارو و عوارض جانبی آن دارد. علم دارورسانی نوین با اهدافی مانند کاهش عوارض جانبی مصرف، افزایش فراهمی زیستی و انتقال هدفمند داروها از یک‌سو و گذر از سد برخی موانع، مانند سد خونی مغزی از سوی دیگر، به‌دنبال طراحی سامانه‌های دارورسانی کارآمد است [۱]. در این‌میان، استفاده از میکروذرات به‌عنوان حامل‌های دارویی در سامانه‌های مختلف، با برخورداری از مزایایی مانند امکان تهیه آسان‌تر، رهش کنترل‌شده دارو و فراهم آوردن دارورسانی هدفمند، عملکرد درمانی داروها را بهبود بخشیده است [۲].

میکروذرات به‌عنوان ذرات جامد با اندازه‌ای در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰ میکرومتر تعریف شده‌اند. داروها درون میکروذرات حل‌شده، به دام افتاده و محصور یا متصل به یک ماتریکس میکرو هستند. بستگی به روش تهیه، میکروکپسول یا میکروسفرها را می‌توان تهیه کرد [۳].

میکروذرات، یکی از سیستم‌های داروسازی هستند که برای انتقال پایدار و کنترل‌کننده دارو در زمان طولانی طراحی شده‌اند. میکروذرات هسته کوچک از مواد جامد یا مایعات دارند که توسط فیلم‌ها یا حامل‌های پلیمری طبیعی یا مصنوعی با ضخامت و درجه نفوذپذیری مختلف احاطه شده‌اند. این فیلم یا حامل به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سرعت آزادسازی دارو عمل می‌کند. همچنین روکش میکروذرات می‌تواند به‌عنوان عاملی برای پوشاندن طعم و بوی نامطلوب و افزایش پایداری و حتی محلولیت ماده مؤثره دارویی در نظر گرفته شود [۴، ۵].

خشک کردن با اسپری، خشک کردن محتوا از حالت مایع به ذرات خشک است که به‌وسیله اسپری مایع به درون یک محفظه خشک‌کننده گرم با فراهم کردن حجم کافی از هوای گرم باعث تبخیر قطرات مایع و خشک کردن ذرات پراکنده‌شده در این محیط می‌شود. محتوا می‌تواند محلول سوسپانسیون، امولسیون، ژل یا خمیر باشد، به شرط اینکه قابل پمپ و اسپری کردن باشد [۶].

با وجود دمای بسیار بالای محفظه خشک‌کننده، ذرات اسپری‌شده به‌واسطه از دست دادن رطوبت در دمای بسیار پایین‌تر و برای زمان بسیار کوتاهی باقی می‌مانند. از این‌رو، این روش خشک کردن اساساً به‌عنوان «خشک کردن دمای پایین» نیز شناخته می‌شود [۷، ۸].

محصول به‌دست‌آمده از تکنیک فوق‌الحد حاوی ذرات ریزتر و توزیع اندازه ذره‌ای بهتر، ظاهر، بافت، مشخصه ریزش، تراکم‌پذیری، دانسیته توده‌ای، قابلیت پراکندگی و محلولیت بسیار مطلوبی است. امروزه این فناوری کاربردهای وسیعی در عرصه دارویی و غیردارویی پیدا کرده است [۹، ۱۰].

جدول ۱. اجزای استفاده شده در فرمولاسیون های F_1 تا F_6 و درصد رهش دارو از هر فرمول طی ۶ ساعت

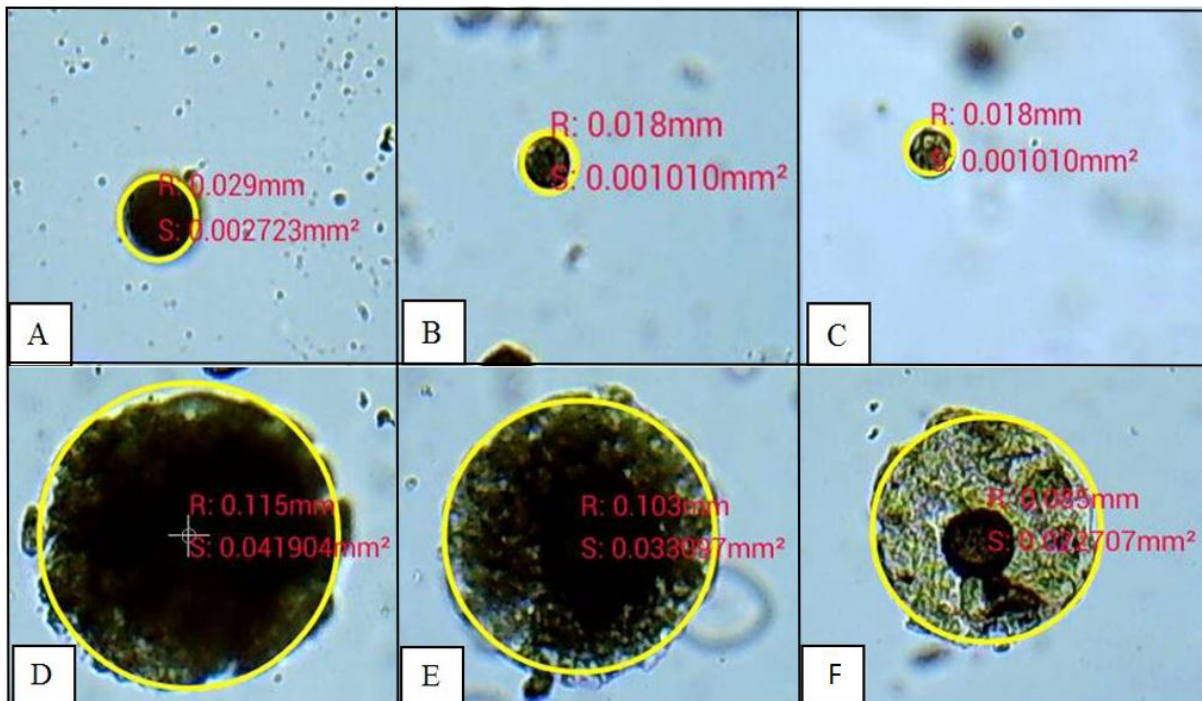
میانگین انحراف معیار	استون (میلی لیتر)	پلی اتیلن گلیکول (گرم)	اتانول (میلی لیتر)	موم زنبور عسل (گرم)	کلوتریمازول (گرم)	فرمولاسیون
۴۱/۰۹±۱/۹۱	-	-	۱۰	۵	۵	F_1
۶۵/۲۷±۳/۲	-	-	۱۰	۱۰	۵	F_2
۸۰/۵۲±۲/۵۴	-	-	۱۰	۲۵	۵	F_3
۴۶/۷۲±۲/۸۷	۵۰	۵	-	-	۵	F_4
۶۰/۷۰±۱۷/۶۵	۵۰	۱۰	-	-	۵	F_5
۷۹/۲۹±۵/۲۷	۵۰	۲۵	-	-	۵	F_6

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

در ابتدا نسبت ۱:۱ با ۲ گرم کلوتریمازول و ۲ گرم پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ توزین شده و داخل بشر شیشه‌ای قرار داده شدند. سپس در داخل بن ماری ذوب شده و ۱۰ میلی لیتر استون به عنوان حلال افزوده شد. مجموعه مواد داخل دستگاه اسپری انتقال داده شده و در یک محفظه پلاستیکی که از پایین هوای گرم در حال دمیده شدن بود، اسپری شد. پس از ۳۰ دقیقه جریان هوا قطع شد و ذرات پس از گذشت ۷۲ ساعت از روی صفحه پلاستیکی جمع آوری و برای ارزیابی های بعدی در ظروف پلاستیکی در بسته نگهداری شدند.

ساخت میکروذرات کلوتریمازول با استفاده از پلیمر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰

برای ساخت میکروذرات کلوتریمازول با استفاده از پلیمر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ از روش تغییر یافته، برگرفته شده از روش اصلاح شده پیشنهادی فؤاد و همکاران در سال ۲۰۱۱ استفاده شد. به این منظور، با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ میکروذرات کلوتریمازول با نسبت های (F_4) ۱:۱، (F_5) ۱:۲ و (F_6) ۱:۵ از دارو و پلی اتیلن گلیکول تهیه شد (جدول شماره ۱).



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۱. تصویر میکروسکوپ نوری از میکروذرات تهیه شده با استفاده از موم زنبور عسل A: فرمولاسیون F_1 ، B: فرمولاسیون F_2 ، C: فرمولاسیون F_3 و میکروذرات تهیه شده از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ D: فرمولاسیون F_4 ، E: فرمولاسیون F_5 ، F: فرمولاسیون F_6

ارزیابی فیزیکی شیمیایی میکروذرات کلوتریمازول

تعیین اندازه میکروذرات

برای بررسی اجمالی اندازه و مورفولوژی میکروذرات کلوتریمازول در فرمولاسیون‌های مختلف از میکروسکوپ نوری^۲ استفاده شد. به طوری که حداقل ۲۵۰ ذره روی لام قرار داده شد و با لنز چشمی مدرج، اندازه ذرات مشخص شد.

بررسی مورفولوژی سطحی میکروذرات با میکروسکوپ الکترونی با روش روبشی^۳

در این روش، ابتدا میکروذرات بر روی یک سطح فلزی تثبیت شده و در حضور گاز آرگون با طلا پوشیده شدند. نمونه‌ها در محفظه میکروسکوپ الکترونی^۴ قرار گرفته و در شرایط خلأ تصاویر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل اندازه ذرات با استفاده از آنالیزور ذرات زتاسایزر

برای اندازه‌گیری دقیق و کمی قطر نانوذرات از دستگاه زتاسایزر^۵ استفاده شد. اندازه‌گیری نانوذرات در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۷۵ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین نمونه‌ها در ۵ مرتبه و هر مرتبه ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

بررسی عدم برهم‌کنش کلوتریمازول با اجزای به‌کاررفته در میکروذرات

برای بررسی تعامل و عدم برهم‌کنش میان اجزای به‌کاررفته در میکروذرات ساخته‌شده با داروی کلوتریمازول از تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد. در این روش از پودر خالص کلوتریمازول، میکروذرات ساخته‌شده با بیژوکس و میکروذرات ساخته‌شده با پلی‌اتیلن گلایکل استفاده شد و طیف مادون قرمز هر ۳ نمونه به‌صورت جداگانه به دست آمد.

بررسی الگوی رهش دارو از میکروذرات ساخته‌شده

جهت انجام آزمون رهش دارو ابتدا ۱ گرم از فرمولاسیون‌های تهیه‌شده (میکرو ذرات کلوتریمازول، موم زنبور عسل و کلوتریمازول و نیز پلی‌اتیلن گلایکل) در ۱ سی‌سی بافر پخش و در کیسه دیالیز پرورده‌شده ریخته شد و داخل بشر حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۷/۴) حاوی ۱ درصد تویین ۸۰ قرار گرفت. آزمایش رهش دارو در دمای 37 ± 2 درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۶۰ تنظیم شد. سپس در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه از ظرف انحلال نمونه با حجم ۵ میلی‌لیتر

خارج شده و با بافر تازه جایگزین شد. نمونه‌های برداشته‌شده برای تجزیه و تحلیل به روش طیف‌سنجی در طول موج بیشینه کلوتریمازول (۲۶۰ نانومتر) در ۳ مرحله ارزیابی شدند.

یافته‌ها

ارزیابی ذرات توسط میکروسکوپ نوری

تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر نشان دادند که ذرات عمدتاً کروی شکل با سطوح نامنظم هستند که فرمولاسیون‌های F_1 تا F_3 ، یعنی میکروذرات پوشش داده‌شده با نسبت‌های مختلف از موم زنبور عسل، قطر حدود ۲۰ میکرومتر داشتند. از طرفی، فرمولاسیون‌های F_4 تا F_6 ، یعنی میکروذرات پوشش داده‌شده با نسبت‌های مختلف از پلی‌اتیلن گلایکل قطر حدود ۱۰۰ میکرومتری داشتند (تصویر شماره ۱).

بررسی مورفولوژی سطحی میکروذرات با میکروسکوپ الکترونی با روش روبشی

به‌منظور بررسی دقیق‌تر مورفولوژی میکروذرات کلوتریمازول از هر یک از فرمولاسیون‌های میکروذرات پوشش داده‌شده با موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلایکل، ۱ نمونه با روش روبشی ارزیابی شد. تصاویر حاصله نشان داد میکروذرات حاصل از هر ۲ روش سطوح نامنظم و مورفولوژی غیر یکنواخت دارند. بدین صورت که میکروذرات ساخته‌شده با استفاده از موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ با ارزیابی‌های ظاهری اولیه به‌ترتیب ساختار شبه کریستالی و کریستالی داشتند (تصویر شماره ۲).

تجزیه و تحلیل اندازه و بار الکتریکی ذرات با استفاده از زتاسایزر

نمودار اندازه میکروذرات حاصل از هر ۶ فرمولاسیون F_1 تا F_6 با استفاده از دستگاه زتاسایزر ابعاد به‌دست‌آمده از میکروسکوپ نوری را در خصوص ذرات پوشش داده‌شده با موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلایکل تأیید کرد. همچنین اختلاف اندازه ذرات حاصل از موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلایکل با نسبت‌های مشابه، در نتایج این ارزیابی نیز قابل مشاهده است، به‌نحوی که طیف اندازه ذرات حاصل از موم زنبور عسل در بازه ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتر بوده، اما طیف اندازه ذرات حاصل از پلی‌اتیلن گلایکل در بازه ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومتر نشان داده شده است (تصویر شماره ۳).

نتایج طیف‌سنجی فرو سرخ^۶

تحلیل طیف‌سنجی فرو سرخ، به‌منظور شناسایی میکروذرات کلوتریمازول و شناسایی برهم‌کنش‌های احتمالی ایجادشده بین میکروذرات کلوتریمازول با موم زنبور عسل و پلیمر پلی‌اتیلن گلایکل ۶۰۰۰ ارزیابی شد. در تصویر شماره ۴

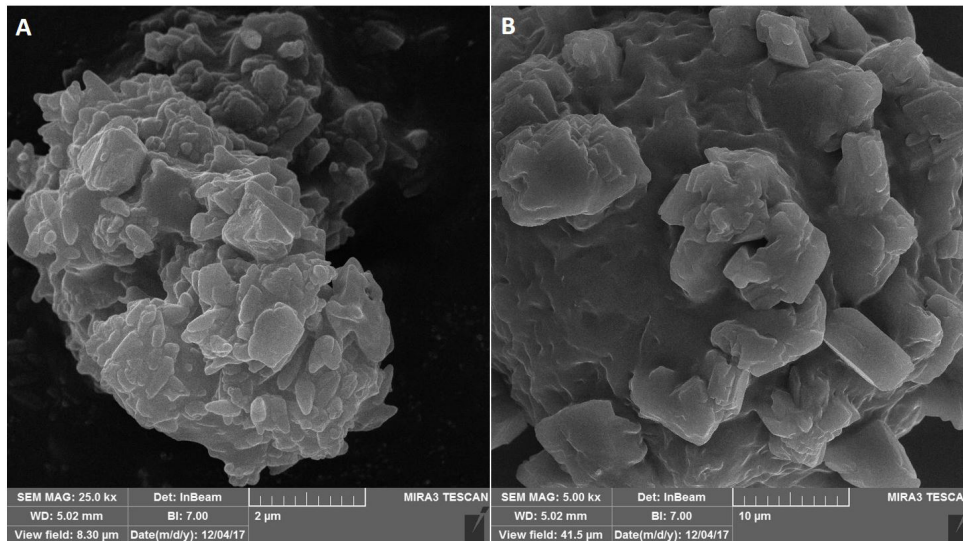
6. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

2. Micro MCX100 LCD, Micros, Austria

3. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)

4. Czechoslovakia, .MIRH3, TE-SCAN Co

5. Zetasizer, Malvern Instruments Limited, UK



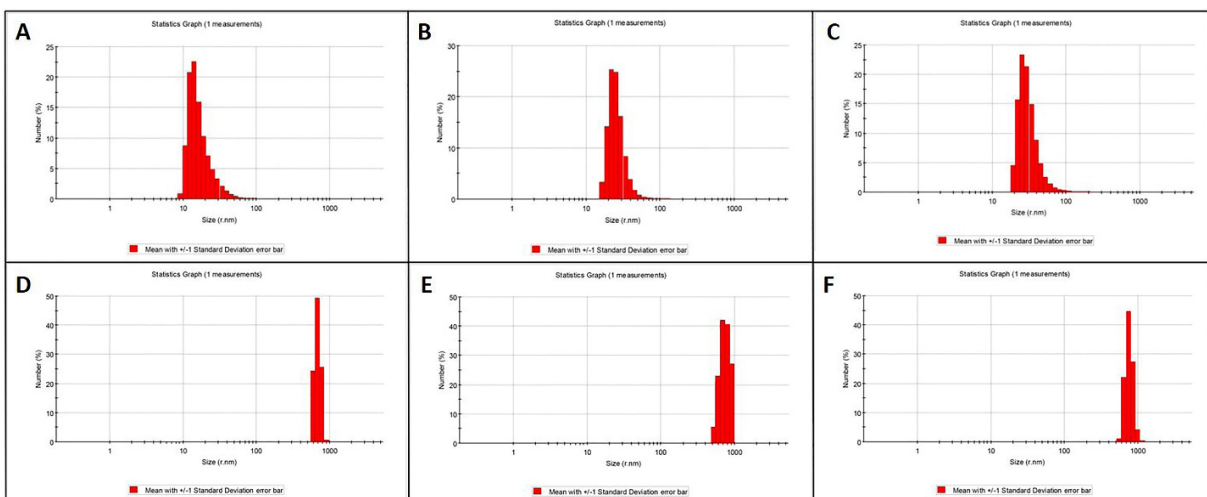
مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از مورفولوژی سطحی A: میکروذرات تهیه شده با استفاده از موم زنبور عسل، F_3 ، B: میکروذرات تهیه شده با استفاده از پلی اتیلن گلايکل ۶۰۰۰ F_6

الگوی رهش دارو از میکروذرات

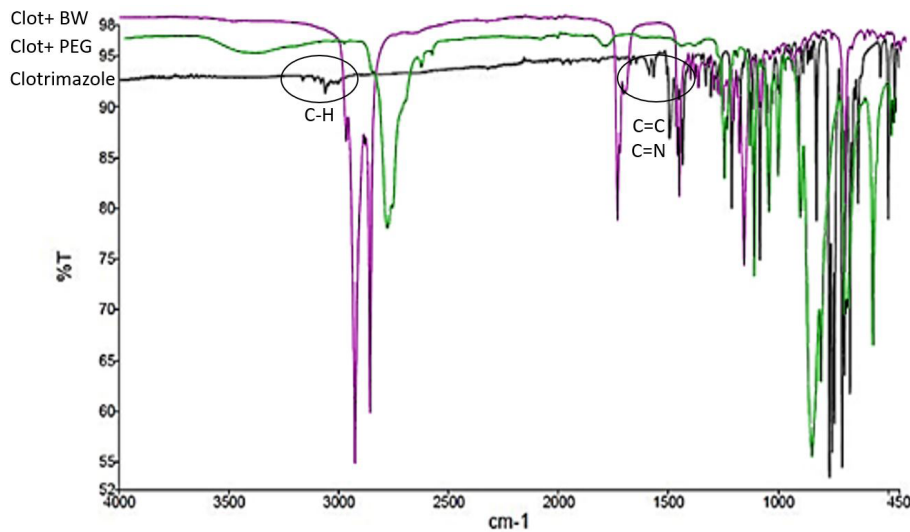
پس از رسم منحنی کالیبراسیون برای کلوتریمازول در محیط بافر فسفات $pH=7/4$ ، الگوی آزادسازی دارو از هر ۶ فرمول ساخته شده در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شدند. نتایج نشان داد درصد رهش تجمعی کلوتریمازول در فرمول های F_1 تا F_3 به ترتیب از ۴۱ تا ۸۰ درصد افزایش یافته و این الگو به صورت مشابه در فرمولاسیون های F_4 تا F_6 با ۴۶ تا ۷۹ درصد تکرار شده است (تصویر شماره ۵) (جدول شماره ۱).

نتایج بررسی های طیفسنجی فروسخ نشان داده شده است. مشاهده می شود که اختصاصات پیک های جذبی فروسخ کلوتریمازول خالص مربوط به شاخه آروماتیکی C-H ($3176cm^{-1}$)، شاخه آروماتیکی C=C ($1589cm^{-1}$)، شاخه C=N ($1570cm^{-1}$) و بندینگ آروماتیکی C-H ($761cm^{-1}$) در تکنیک طیفسنجی مادون قرمز به دست آمده از میکروذره با پلی اتیلن گلايکل تکرار شده است، اما این پیک ها در میکروذرات ساخته شده با موم زنبور عسل مشاهده نمی شوند.



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۳. نمودارهای حاصل از تحلیل کمی اندازه ذرات توسط دستگاه زتاسایزر از میکروذرات تهیه شده با استفاده از موم زنبور عسل و میکروذرات تهیه شده از پلی اتیلن گلايکل ۶۰۰۰ با استفاده از موم زنبور عسل (A: فرمولاسیون F_1)، B: فرمولاسیون F_2)، C: فرمولاسیون F_3) و میکروذرات تهیه شده از پلی اتیلن گلايکل ۶۰۰۰ (D: فرمولاسیون F_4)، E: فرمولاسیون F_5)، F: فرمولاسیون F_6)



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

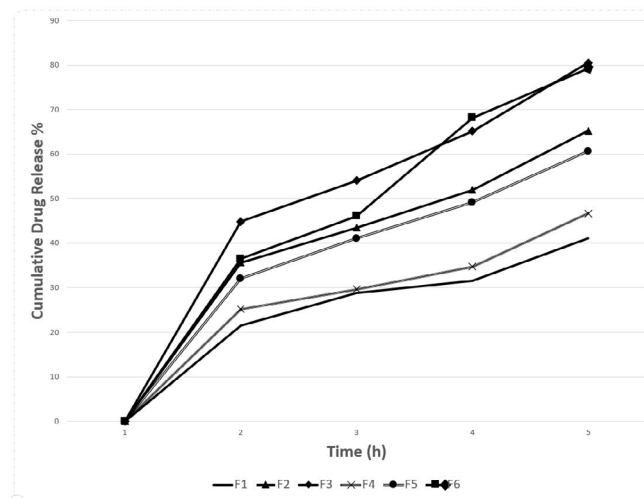
تصویر ۴. مقایسه طیف فروسرخ مربوط به پودر خالص کلوتریمازول (رنگ مشکی) با طیف فروسرخ مربوط به میکرو ذره کلوتریمازول و موم زنبور عسل (رنگ بنفش) و طیف فروسرخ مربوط به میکروذره کلوتریمازول و پلیمر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (رنگ سبز)

همچنین ذرات کلوتریمازول نه به صورت کروی، بلکه به صورت کریستالی و قطعات نامنظم هندسی در میکروذرات ساخته شده با حامل‌های پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ قرار گرفته بودند. نحوه قرارگیری ذرات در روی حامل‌ها از هیچ الگوی خاصی پیروی نکرده و پراکندگی تصادفی را نشان می‌داد. این نتایج با نتایج مطالعه بیلنسوی و همکاران که در سال ۲۰۰۶ به منظور فرموله کردن ژل کلوتریمازول با استفاده از پلیمر حساس به حرارت پلورونیک F127⁷ و پلیمرهای کرپوپول^۸ و هیدروکسی پروپیل متیل سلولز^۹ تهیه شد، مطابقت داشت [۱۵].

بحث و نتیجه گیری

در این بررسی، داروی کلوتریمازول با استفاده از روش خشک کردن با اسپری به میکروذرات تبدیل شد و روی ۲ حامل موم زنبور عسل و پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در نسبت‌های متفاوت قرار گرفت. نتایج مربوط به بررسی مورفولوژی میکروذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد میکروذرات کلوتریمازول ساخته شده با استفاده از موم زنبور عسل، سطحی با قطعات نامنظم هندسی و شبه کریستالی داشتند.

- 7. Pluronic
- 8. Carbopol
- 9. Hydroxy Propyl Methyl Cellulose



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۵. نمودار درصد تجمعی رهش دارو در طول زمان طی ۶ ساعت از فرمولاسیون‌های F₁ تا F₆

گلایکل تفاوت معناداری نداشته‌اند.

همین امر توجیه‌کننده علت افزایش درصد رهش دارو در فرمول‌هایی است که حاوی نسبت کمتری از دارو هستند. به این ترتیب که در طول زمان مقدار مشخصی از دارو در محیط مایی حل می‌شود که در فرمول‌های F_1 و F_4 چون مقدار دارو در فرمولاسیون بیشتر از فرمول‌های F_3 و F_6 است، در نتیجه نسبت کمتری از آن حل می‌شود. نتایج فوق به صورت مشابه در سایر مطالعات داروی کلوتریمازول مشاهده شده‌اند [۱۸]. هرچند برخی مطالعات افزایش محلولیت کلوتریمازول را با استفاده از تکنیک پراکندگی جامد با ترکیباتی مانند قندها (مانیتول) یا پلیمرهای محلول در آب (پلورونیک) تأیید کرده‌اند [۱۹، ۲۰].

بررسی یافته‌های این مطالعه نشان داد هر ۲ روکش لیپوفیل و هیدروفیل از نظر آزادسازی دارو الگوی مشابهی نشان می‌دهند، اما از نظر واکنش پلیمر با دارو نشان داده شد که موم زنبور عسل (با اینکه میکروذرات موم زنبور عسل طیف اندازه ذره‌های ریزتری در مقایسه با پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ داشتند) دارای برهم‌کنش با دارو هستند که از این نظر، پلیمر پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، مزیت بیشتری دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق به شماره IR.GUMS.REC.1396.492 در دانشگاه علوم پزشکی گیلان تصویب شد.

حامی مالی

این پژوهش با حمایت مالی کبری نجف‌زاده مهویزانی انجام شد.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، طراحی مطالعه، تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته و نظارت بر مطالعه: زهرا حصاری؛ کسب، تحلیل و تفسیر داده‌ها: کبری نجف‌زاده مهویزانی و گیتا الکن صابری؛ جذب منابع مالی: کبری نجف‌زاده مهویزانی و زهرا حصاری؛ حمایت اداری، فنی یا موادی: زهرا حصاری و مرجان دایی حامد.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی گیلان و مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان قدردانی می‌کنند.

در مقابل، پراچی و همکاران در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۳ به منظور استفاده موضعی از میکروذرات کلوتریمازول انجام دادند، نشان داده شد میکروذرات کلوتریمازول (تهیه‌شده با استتاریک اسید به‌عنوان لیپید جامد و اولئیک اسید به‌عنوان لیپید مایع) شکل کروی دارد و پراکندگی همگنی را نشان می‌دادند [۱۶].

در سال ۲۰۱۲ در مطالعه مشابه دیگری نیز که با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، مانیتول، کاربوپل ۹۳۴، استتاریک اسید و موم زنبور عسل نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلوتریمازول تهیه شد، نشان داده شد نانوذرات لیپیدی جامد کلوتریمازول سطح صاف و شکل کروی داشته و در دستجات متفاوتی قرار گرفته‌اند [۱۷]. با توجه به اینکه در مطالعه ما ذرات تولیدشده در محدوده میکرومتر بود، این تفاوت دامنه اندازه ذره‌ای می‌تواند عامل احتمالی جهت ایجاد تفاوت مورفولوژی در سطح شود.

نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل ذرات با استفاده از زتاسایزر نشان داد میکروذرات تهیه‌شده با موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در تمام نسبت‌ها در محدوده دامنه زیر ۱۰۰۰ میکرومتری قرار داشتند. توزیع میکروذرات تهیه‌شده با موم زنبور عسل با نسبت‌های ۳ گانه بیانگر توزیع در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتری بودند. بررسی نسبت‌های ۳ گانه میکروذرات تهیه‌شده با پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ نشان داد در مقایسه با موم زنبور عسل تمرکز توزیع ذرات در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومتر بوده و این توزیع تفاوت معناداری را در مقایسه با موم زنبور عسل نشان می‌داد.

در سال ۲۰۱۲ در مطالعه مشابه دیگری نیز که با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، مانیتول، کاربوپل ۹۳۴، استتاریک اسید و موم زنبور عسل نانوذرات جامد لیپیدی حاوی کلوتریمازول تهیه شد، نشان داده شد توزیع ذرات در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر بوده که با نتایج حاصل از توزیع میکروذرات تهیه‌شده با پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در مطالعه حاضر مطابقت دارد [۱۷]. همچنین در مطالعه دیگری که به منظور استفاده موضعی از میکروذرات کلوتریمازول انجام شد، نشان داده شد توزیع ذرات کلوتریمازول (تهیه‌شده با استتاریک اسید به‌عنوان لیپید جامد و اولئیک اسید به‌عنوان لیپید مایع) در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر قرار داشتند [۱۶].

نتایج بررسی الگوی رهش دارو نشان می‌دهد بیشترین درصد آزادسازی در طول زمان در فرمول‌های F_3 و F_6 (به ترتیب ۸۰/۵۲، ۷۹/۲۹ درصد) دیده شد که اختلاف آماری معناداری بین درصد رهش دارو در ۶ ساعت بین این ۲ فرمول وجود نداشت ($P > 0/05$). به نظر می‌رسد به دلیل چربی دوستی بسیار بالای داروی کلوتریمازول، مهم‌ترین مرحله در تعیین سرعت آزادسازی و رهش دارو همان مرحله انحلال دارو در محیط مایی است و نقش حامل لیپوفیل یا هیدروفیل درباره این دارو در اولویت‌های بعدی قرار می‌گیرد. از این رو، درصد رهش دارو در طول زمان در هر ۲ دسته از فرمولاسیون‌های موم زنبور عسل و پلی‌اتیلن

References

- [1] Sung YK, Kim SW. Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*. 2020; 24:12. [DOI:10.1186/s40824-020-00190-7] [PMID] [PMCID]
- [2] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 385(1-2):113-42. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018] [PMID]
- [3] Ravi Kumar MN. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne des Sciences Pharmaceutiques*. 2000; 3(2):234-58. [PMID]
- [4] Herring JM, McMichael MA, Smith SA. Microparticles in health and disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2013; 27(5):1020-33. [DOI:10.1111/jvim.12128] [PMID]
- [5] Birnbaum DT, Brannon-Peppas L. Microparticle drug delivery systems, In: Brown DM, editor. *Drug delivery systems in cancer therapy*. Totowa: Humana Press; 2004. [Link]
- [6] Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 127:300-18. [DOI:10.1016/j.ejps.2018.10.026] [PMID]
- [7] Samborska K, Boostani S, Geranpour M, Hosseini H, Dima C, Khoshnoudi-Nia S, et al. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. *Trends in Food Science & Technology*. 2021; 108:297-325. [DOI:10.1016/j.tifs.2021.01.008]
- [8] Poozesh S, Bilgili E. Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 562:271-92. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.03.047] [PMID]
- [9] Koester LS, Mayorga P, Bassani VL. Carbamazepine/ β CD/HPMC solid dispersions. I. Influence of the spray-drying process and β CD/HPMC on the drug dissolution profile. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003; 29(2):139-44. [PMID]
- [10] Bordón MG, Paredes AJ, Camacho NM, Penci MC, González A, Palma SD, et al. Formulation, spray-drying and physicochemical characterization of functional powders loaded with chia seed oil and prepared by complex coacervation. *Powder Technology*. 2021; 391:479-93. [DOI:10.1016/j.powtec.2021.06.035]
- [11] Mendling W, Atef El Shazly M, Zhang L. Clotrimazole for vulvo-vaginal Candidosis: More than 45 years of clinical experience. *Pharmaceutics*. 2020; 13(10):274. [DOI:10.3390/ph13100274] [PMID] [PMCID]
- [12] Potaś J, Szymańska E, Wróblewska M, Kurowska I, Maciejczyk M, Basa A, et al. Multilayer films based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes as novel platforms for Buccal Administration of Clotrimazole. *Pharmaceutics*. 2021; 13(10):1588. [DOI:10.3390/pharmaceutics13101588] [PMID] [PMCID]
- [13] Balata G, Mahdi M, Bakera RA. Improvement of solubility and dissolution properties of clotrimazole by solid dispersions and inclusion complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 73(5):517-26. [PMID] [PMCID]
- [14] Fouad EA, El-Badry M, Mahrous GM, Alanazi FK, Neau SH, Alsarra IA. The use of spray-drying to enhance celecoxib solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011; 37(12):1463-72. [PMID]
- [15] Bilensoy E, Rouf MA, Vural I, Sen M, Hincal AA. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*. 2006; 7(2):E38. [PMID]
- [16] Shekhawat PB. Preparation and evaluation of clotrimazole nanostructured lipid carrier for topical delivery. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013; 4(1):407-16. [Link]
- [17] Madhushri M, Thakur RS, Jadhav KK, Patel RN. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles containing clotrimazole. *American Journal of Pharmatech Research*. 2012; 2(3). [Link]
- [18] Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004; 278(1):71-7. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2004.02.032] [PMID]
- [19] Madgulkar A, Bandivadekar M, Shid T, Rao S. Sugars as solid dispersion carrier to improve solubility and dissolution of the BCS class II drug: Clotrimazole. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016; 42(1):28-38. [DOI:10.3109/03639045.2015.1024683] [PMID]
- [20] Karolewicz B, Gajda M, Owczarek A, Pluta J, Górniak A. Physicochemical characterization and dissolution studies of solid dispersions of clotrimazole with pluronic F127. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13(8):1225-32. [DOI:10.4314/tjpr.v13i8.5]

This Page Intentionally Left Blank