

Lea Mrak

**Pektinske mikrosfere kao nosači lipidno-
alginatnih nanočestica s deksametazonom za
nazalnu primjenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Novi terapijski sustavi Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, iznimnom strpljenju, uloženom trudu i susretljivosti tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., Marini Juretić, mag. pharm., i Sabini Keser, mag. pharm. na prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade diplomskog rada te zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj ljubavi, potpori i razumijevanju za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada i tijekom cjelokupnog studiranja.

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama što su mi studentske dane učinili zanimljivim i nezaboravnim.

SADRŽAJ

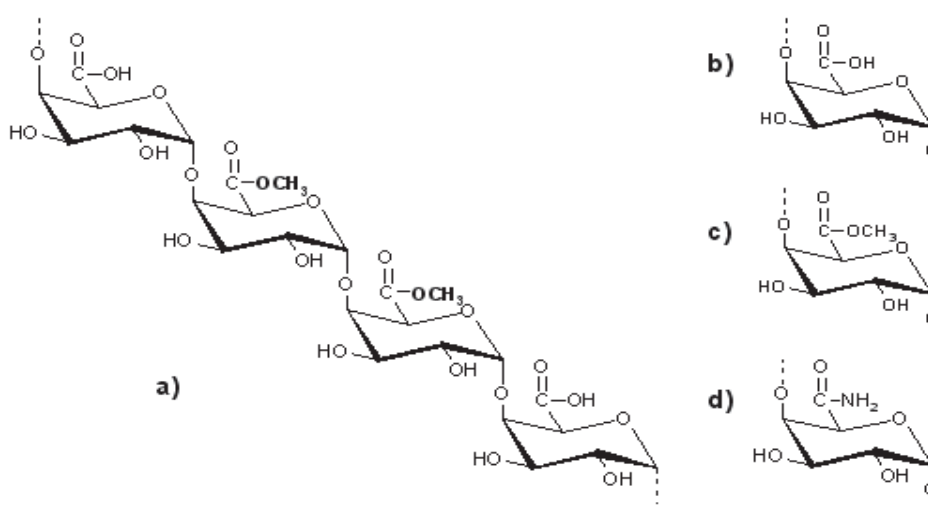
1. UVOD	1
1.1. SVOJSTVA PEKTINA	1
1.2. TERAPIJSKI SUSTAVI TEMELJENI NA PEKTINU	5
1.2.1. CILJANA DOSTAVA LIJEKA U KOLON	5
1.2.2 NAZALNA PRIMJENA LIJEKA	11
1.3 PRIMJENA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM U IZRADI TERAPIJSKIH SUSTAVA TEMELJENIH NA PEKTINU	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJALI	17
3.2 METODE	18
3.2.1. IZRADA LIPIDNO-ALGINATNIH NANOČESTICA S DEKSAMETAZONOM	18
3.2.2. ODREĐIVANJE VELIČINE I ZETA-POTENCIJALA NANOČESTICA ..	18
3.2.3. PRIPRAVA MIKROSFERA	19
3.2.4. ODREĐIVANJE VELIČINE I ZETA-POTENCIJALA MIKROSFERA	20
3.2.5. ISPITIVANJE BUBRENJA MIKROSFERA	20
3.2.6. ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA <i>IN VITRO</i>	21
3.2.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA DEKSAMETAZONA	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA	24
4.2. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA PEKTINSKIH MIKROSFERA	26
4.3. SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA	28
4.4. <i>IN VITRO</i> OSLOBAĐANJE DEKSAMETAZONA	30
5. ZAKLJUČAK	33
6. LITERATURA	34
7. SAŽETAK/ SUMMARY	42
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

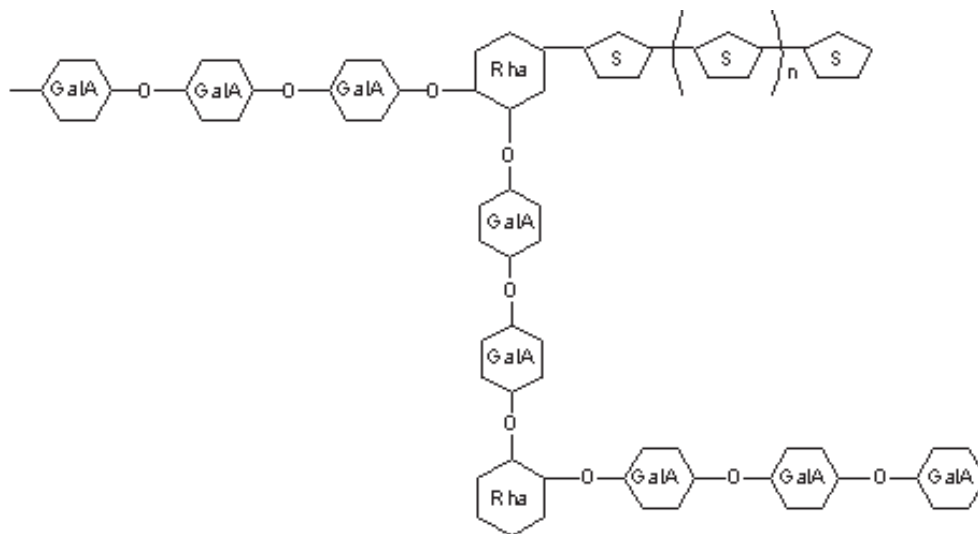
1.1. SVOJSTVA PEKTINA

Pektin je neprobavljivi heteropolisaharid. On je strukturni polisaharid, odnosno gradi stanični zid biljaka i daje čvrstoću biljnom tkivu (Souto-Maior i sur., 2010). Udio pektina u pojedinim vrstama biljaka se razlikuje. Molekularna struktura pektina varira ovisno o izvoru i uvjetima prilikom ekstrakcije i pročišćavanja. Zbog biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti (Nagar i sur., 1992) te svojstva geliranja, koristi se prehrambenoj industriji i farmaceutskoj industriji kao gelirajuće sredstvo, sredstvo za zgrušavanje te koloidni stabilizator (Eswaramma i sur., 2017).

Pektin se sastoji od molekula D-galakturonske kiseline koje su u linearnom lancu vezane α (1, 4) glikozidnom vezom (Slika 1.), a može sadržavati i ramnozu vezanu α (1, 2) glikozidnom vezom te druge šećere poput galaktoze i arabinoze odnosno neutralne šećere koji čine bočne lance (Slika 2.). Karboksilne skupine galakturonske kiseline mogu biti esterificirane i amidirane (Slika 1.; Sriamornsak, 2002), a sekundarne alkoholne skupine mogu biti acetilirane. Pektini imaju linearnu anionsku okosnicu s regijama koje nemaju bočne lance poznate kao "glatke regije" i regijama s neionskim bočnim lancima poznatim kao "dlakave regije" (Rinaudo i sur., 2008).



Slika 1. Fragment strukture pektina (a); galakturonska kiselina s karboksilnom skupinom (b); ester (c); amid (d) (prilagođeno prema Sriamornsak, 2002)



Slika 2. Ramnoza vezana na lanac galakturonske kiseline; S- neutralni šećeri
(prilagođeno prema Sriamornsak, 2002)

Pektin je građen od polisaharidnih domena (dolje navedenih) i njihovo povezivanje nije još u potpunosti razjašnjeno (Munarini i sur., 2012). Smatra se da su domene kovalentno povezane, i u većoj ili manjoj mjeri ionski povezane s drugim pektinskim nitima unutar stanične stjenke biljaka (Chan i sur., 2017).

- Poligalakturonan – građen od molekula D-galakturonske kiseline koje su metilirane na C6 atomu, a mogu biti i acetilirane na kisikovom atomu.
- Ramnogalakturonan I – građen od L-ramnoze i D-galakturonske kiseline kao podmonomernih jedinica vezanih na sljedeći način: (1,2)- α -L-Rha-(1,4)- α -D-GalA, sadrži veliku količinu šećera na neutralnoj strani lanca
- Ramnogalakturonan II – mnogo je kompleksnije strukture i vrlo je važan u staničnom zidu (Noreen i sur., 2017).

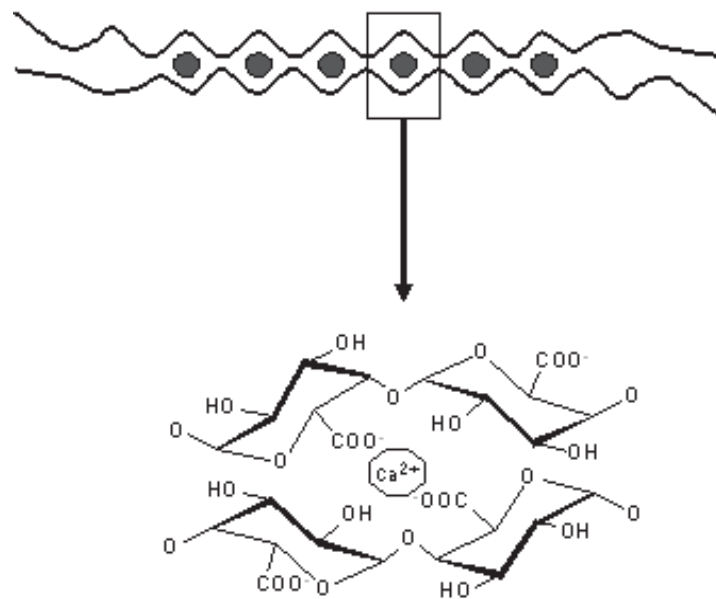
Prema sadržaju metoksiliranih skupina razlikuju se visoko i nisko esterificirani pektini. Visokoesterificirani odnosno visokometoksilirani pektini imaju stupanj esterifikacije >50%, a niskometoksilirani do 50% (Watts i Smith, 2009). Fiziološka svojstva, funkcionalnost i primjena pektina ovisi o stupnju metoksilacije. Prirodni pektini podrijetlom iz jabuke i kore citrusa su 20-60% esterificirani (Verma i Sachin, 2008). Visokometoksilirani pektini stvaraju

gelove u prisutnosti veće količine šećera i pri nižim pH vrijednostima. Nastali gelovi su termalno reverzibilni i topljivi u toploj vodi. Za geliranje niskometoksiliranih pektina potrebne su manje količine šećera i ioni kalcija ili drugi dvovalentni ioni (Sriamornsak, 2002; Noreen i sur., 2017).

Pektini i soli pektina (pektinske kiseline) i monovalentnih kationa su topljivi u vodi, a soli pektina i dvovalentnih i trovalentnih kationa su slabo topljive. Soli pektina i monovalentnih kationa vrlo su ionizirane u otopini i naboj je distribuiran po čitavoj molekuli. Odbijanja između karboksilnih skupina sprječavaju agregaciju lanaca te je svaka karboksilna skupina vrlo hidratizirana. Otopine soli pektina i monovalentnih kationa su upravo zbog toga stabilne viskoznosti. Pri nižem pH ionizacija karboksilnih skupina je smanjena, a time i hidratacija lanaca pa može doći do formiranja gela. Topljivost, viskoznost i geliranje otopine pektina ovise o molekulskoj masi pektina, koncentraciji, pH vrijednosti, stupnju esterifikacije i prisutnosti iona suprotnog naboja. Faktori koji pozitivno utječu na čvrstoću gela povećat će tendenciju geliranja, smanjiti topljivost i povećati viskoznost. Otopljeni pektini se spontano razgrađuju deesterifikacijom i depolimerizacijom ovisno o uvjetima u okolini (Noreen i sur., 2017). Niži pH i povećanje temperature pospješuju pucanje glikozidnih veza, a niži pH pogoduje i deesterifikaciji. Visokometoksilirani pektin je stabilan pri neutralnom pH samo pri sobnoj temperaturi pa rastom temperature ili pH dolazi do promjene u viskoznosti i sposobnosti geliranja. Niskometoksilirani pektin je nešto stabilniji pri tim uvjetima. U alkalnim uvjetima, čak i pri sobnoj temperaturi, dolazi do deesterifikacije i degradacije (Sriamornsak, 2002).

Viskoesterificirani pektini formiraju gelove u prisutnosti šećera i pri kiselim uvjetima. Oni ne sadrže dovoljno karboksilnih skupina pa se ne geliraju ili talože s kalcijevim ionima, ali u određenim uvjetima mogu se taložiti s aluminijem i bakrom. Kod geliranja vrlo su bitne vodikove veze i hidrofobne interakcije. Geliranje se javlja zbog vodikovih veza na karboksilnim skupinama koje su slobodne i hidroksilnih skupina susjednih molekula. U neutralnom i slabo kiselom karboksilne skupine su u ioniziranom obliku odnosno negativno su nabijene te s hidroksilnim skupinama privlače molekule vode. Odbojne sile tih skupina (negativni naboj) sprječavaju stvaranje pektinske mreže. Povećanjem kiselosti smanjuje se ionizacija karboksilnih skupina, što pozitivno utječe na geliranje. Šećer smanjuje hidrataciju pektina jer se natječe za molekule vode i samim time pridonosi geliranju. Geliranje nisko esterificiranih pektina zahtjeva ione Ca^{2+} . Kod njih, zbog većeg broja slobodnih karboksilnih

skupina veća je i vjerojatnost za povezivanjem s ionima kalcija. Tome, također, pridonosi više nabijenih skupina pa su molekule niskog stupnja esterifikacije ravnije od molekula visokog stupnja esterifikacije. Ovdje prihvaćeni model geliranja je „egg-box“ model (Slika 3.) (Sriamornsak, 2002; Munarin i sur., 2012). Mehanizam se temelji na stvaranju spojnih zona koje nastaju povezivanjem galakturonana. Za njihovo povezivanje bitni su kisikovi atomi hidroksilne skupine, kisikovi atomi prstena i premošćujući atomi kisika iz šećera koji daju slobodne elektronske parove te je za geliranje potreban odgovarajući broj karboksilnih skupina da bi se uspostavile snažne elektrostatske veze. Ovdje prisutnost metoksiliranih skupina smanjuje mogućnost geliranja. Amidacija pektina pospješuje geliranje nisko metoksiliranih pektina odnosno potrebne su manje količine kalcija za geliranje i to zato što amidne grupe pospješuju stvaranje vodikovih veza. Prisustvo šećera nije ključno za geliranje, ali može utjecati na čvrstoću gela te posljedično smanjiti količinu kalcija potrebnu za geliranje. Visoke koncentracije šećera uzrokuju dehidrataciju lanaca pektina, odnosno potiču geliranje (Sriamornsak, 2002).



Slika 3. *Vežanje kalcija na poligalakturonsku jedinicu: "egg box" dimer i "egg-box" šupljina (prilagođeno prema Sriamornsak, 2002)*

Pektin je polimer koji je biokompatibilan i mukoadhezivan te biorazgradljiv i netoksičan. U potpunosti se razgrađuje pomoću bakterija u kolonu i ne može se razgraditi želučanim enzimima niti enzimima crijeva te je stabilan u kiselom okolišu (Bigucci i sur., 2008; Bigucci i sur., 2009; Eswaramma i sur., 2017). Njegova izrazita hidrofilnost i sposobnost formiranja gela čine ga idealnim polimerom za biomedicinsku primjenu i razvoj terapijskih sustava, primjerice za ciljanu dostavu lijeka u kolon. Nedostaci pektina kao polimera izbora u izradi terapijskih sustava modificiranog oslobađanja su visoka topljivost, izraženo bubrenje te brza hidratacija i erozija. Ti nedostaci mogu se prebroditi kemijskim modifikacijama odnosno variranjem svojstava pektina, kao što su molekulska masa i stupanj esterifikacije (Watts i Smith, 2009).

Pektin se smatra sigurnim za korištenje te se koristi kao prehrambeni aditiv diljem svijeta. Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) svrstala ga je u kategoriju GRAS (engl. *generally recognized as safe*). U Europi je registriran kao aditiv pod nazivom E440. Niskometoksilirani pektin koji gelira na nosnoj sluznici se ne apsorbira već mukocilijarnim čišćenjem uklanja do orofarinksa odakle gutanjem dospijeva u probavni sustav te je stoga siguran za primjenu (Watts i Smith, 2009).

1.2. TERAPIJSKI SUSTAVI TEMELJENI NA PEKTINU

Povoljna biofarmaceutska svojstva pektina čine ga polimerom izbora u izradi terapijskih sustava s ciljanom i kontroliranom dostavom lijeka. *In situ* geliranje i/ili mukoadhezivnost omogućuju nazalnu primjenu lijeka. Topljivost pektina u bazičnim uvjetima i otpornost na proteaze i amilaze čine ga prikladnim za dostavu lijeka u debelo crijevo. Također, sposobnost geliranja u kiselim uvjetima omogućuje dulje vrijeme zadržavanja lijeka primjerice u oku ili u želucu (Munarin i sur., 2012).

1.2.1. CILJANA DOSTAVA LIJEKA U KOLON

Oralno primijenjeni lijek izložen je različitim uvjetima pri prolasku kroz probavni sustav uključujući široki raspon pH vrijednosti i prisutnost različitih probavnih enzima. Stoga, sustavi za dostavu lijekova u kolon moraju osigurati da lijek bude zaštićen od kemijske i enzimske razgradnje dok putuje kroz gornje dijelove probavnog sustava te mora omogućiti

oslobađanje lijeka dolaskom u kolon (Liu i sur., 2003). Dostava lijeka u kolon nudi zanimljive mogućnosti: osim što omogućuje sistemsku apsorpciju lijekova, može poslužiti i za liječenje lokalnih bolesti poput sindroma iritabilnog crijeva, upalnih bolesti crijeva i raka debelog crijeva. Kolon kao mjesto za dostavu lijeka ima vrlo zanimljiva svojstva kao što je neutralni pH, dugo vrijeme transporta, smanjena aktivnost probavnih enzima i prisutnost velikih količina enzima koji sudjeluju u razgradnji polisaharida (glukozidaza, galaktozidaza, amilaza, pektinaza, dekstranaza...) koje luče različite bakterije prisutne u kolonu. Upravo zbog toga se ciljana dostava lijekova u kolon temelji na terapijskim sustavima građenim od polisaharida (Bigucci i sur., 2009).

Polisaharidi zadržavaju svoj integritet i sprječavaju oslobađanje lijeka tijekom prolaza kroz probavni sustav do kolona. U dodiru s probavnom tekućinom kolona i djelovanjem enzima mikroorganizama, lijek se oslobađa iz polisaharidnog nosača (Vaidya i sur., 2015). Različiti polisaharidi čiji integritet ovisi o prisustvu enzima i pH (pektin, kitozan, inulin) ispitani su kao nosači lijeka za ciljnu dostavu u kolon (Chourasia i Jain, 2004). Pektin, zbog dobre topljivosti u vodi, ne može zaštititi lijek od njegovog oslobađanja u gornjem dijelu probavnog sustava. Primjerice, s ciljem dostave lijeka u kolon, razvijene su mikrosfere pektina s fizički uklopljenim lijekom, ali kod takvog sustava lijek se oslobađa već u gornjim dijelovima probavnog sustava. Stvaranjem konjugata između lijeka i pektina može se spriječiti oslobađanje lijeka u želucu i tankom crijevu. Naime, kovalentnim vezanjem pektina i lijeka sprječava se oslobađanje lijeka u kiselom okolišu. Do oslobađanja dolazi tek kada takav sustav dođe u kolon, uslijed kidanja glikozidnih veza djelovanjem enzima mikroorganizama prisutnih u kolonu (Vaidya i sur., 2015).

Hidrogel predstavlja hidrofilnu, trodimenzionalnu, fizički ili kemijski umreženu strukturu polimera koja može vezati veliku količinu vode. Hidrogelovi kao terapijski sustavi su u pravilu biokompatibilni te posjeduju mekanu i poroznu trodimenzionalnu strukturu (S. Eswaramma i sur., 2017). Hidrogelovi osjetljivi na pH pokazali su se vrlo zanimljivima za ciljanu dostavu lijekova u probavnom sustavu. Bubrenje i oslobađanje lijeka iz takvih hidrogelova povećavaju se s prolaskom kroz probavni sustav, odnosno s povećanjem pH (Bigucci i sur., 2008). Jedan od primjera je hidrogel pripremljen iz pektina i poli(2-dimetilamino)etil metakrilata te fosfatnog umreživača bis(2-metakriloiloksi) etilfosfata koji pokazuje dobra svojstva bubrenja u alkalnom mediju (Liu i sur., 2011). Uklapanjem antitumorskog lijeka 5-fluorouracila u takav sustav postignuta je ciljana dostava lijeka u

kolon (Eswaramma i sur., 2017), što je od velike važnosti za 5-fluorouracil s obzirom na njegovo kratko vrijeme polueliminacije, malu bioraspoloživost i toksičnost (Li i sur., 2013; Chaturvedi i sur., 2011).

S ciljem razvoja terapijskih sustava temeljenih na pektinu s modificiranim oslobađanjem uklopljenog lijeka, razvijane su različite strategije smanjenja njegove topljivosti u probavnim tekućinama. Pripravljani su polielektrolitni kompleksi pektina i sintetskih ili prirodnih polikationa, temeljeni na ionskim interakcijama suprotno nabijenih polielektrolita u vodenom mediju (Bigucci i sur., 2009, Sriamornsak, 2008). Primjerice, polielektrolitni kompleksi pektina i kitozana prijavljeni su u različitim molarnim omjerima te su sušeni raspršivanjem s ciljem pripreme mikrosfera s vankomicinom. Pripravljene mikrosfere naknadno su tabletirane. Ciljanu dostavu lijeka u crijevo omogućilo je pH ovisno bubrenje kompleksa. Vrlo je bitan molarni omjer pektina i kitozana jer utječe na mukoadhezivnost i bubrenje. Takvi kompleksi mogu poboljšati dostavu vankomicina i drugih lijekova u alkalnom pH uz enzimsku razgradnju (Bigucci i sur., 2008). Neki primjeri hidrogelova pektina kao terapijskih sustava prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri terapijskih sustava temeljenih na pektinu

Vrsta terapijskog sustava	Uklopljena djelatna tvar	Ostale sastavnice terapijskog sustava	Put primjene	Cilj uklapanja lijeka	Glavni rezultat	Referenca
TEHNOLOGIJA IZRADE: SUŠENJE RASPRŠIVANJEM						
Hidrogel/ mikrosfere	Vankomicin	Kitozan	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka u debelo crijevo za liječenje infekcija gram pozitivnim bakterijama i pseudomembranskog kolitisa	Mikrosfere s vankomicinom pripravljene su sušenjem raspršivanjem hidrogela kitozana i pektina s vankomicinom. Ciljana dostava lijeka u kolon ovisi o: (i) bubrenju koje je kontrolirano interakcijom pektina i kitozana ovisnoj o njihovom omjeru i pH, (ii) mukoadhezivnosti i (iii) prisutnosti enzima koji sudjeluju u razgradnji pektina.	Bigucci i sur., 2009
Polielektrolitni kompleks	Vankomicin	Kitozan	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka u debelo crijevo	Polielektrolitni kompleksi mogu osigurati ciljanu dostavu lijeka u kolon ovisno o: bubrenju koje je kontrolirano pH vrijednošću medija, mukoadhezivnosti i prisutnosti enzima koji sudjeluju u razgradnji polimera.	Bigucci i sur., 2008
Mikrosfere	Ondansetron	-	Nazalna primjena	Povećanje biorasploživosti lijeka i dulje zadržavanje na mjestu primjene	Dobivena veličina mikrosfera povoljna je za nazalnu primjenu i ovisi o koncentraciji polimera te brzini protoka medija pri sušenju raspršivanjem. Koncentracija pektina utječe na bubrenje i mukoadhezivnost. Pretražnom elektronskom mikroskopijom utvrđena je glatka sferična površina mikrosfera. <i>In vivo</i> istraživanjima utvrđena je bolja biorasploživost nazalno primijenjenog lijeka u odnosu na oralno primijenjen lijek. Sušenje raspršivanjem prikladna je tehnika za pripremu mukoadhezivnih pektinskih mikrosfera za nazalnu primjenu ondansetrona.	Mahajan i sur., 2012
Nanočestice	Gentamicin	-	Dermalna primjena	Razvoj funkcionalne obloge za rane	Prašasti produkt pripremljen sušenjem raspršivanjem alginatno-pektinskih nanočestica s gentamicinom ima dobra svojstva apsorpcije eksudata rane te se gelira na mjestu primjene, osiguravajući poboljšanu antibakterijsku učinkovitost.	De Cicco i sur., 2014

Mikrosfere	Piroksikam	-	Okularna primjena	Procjena pektinskih mikrosfera kao sustava za okularnu primjenu piroksikama	Sušenjem raspršivanjem uspješno su pripravljene pektinske mikrosfere s piroksikamom. Uočeno je produljeno zadržavanje piroksikama u konjunktivalnoj vrećici. <i>In vivo</i> ispitivanjima utvrđena je bolja bioraspoloživost lijeka iz pektinskih mikrosfera u odnosu na komercijalne kapi za oči.	Giunchedi i sur., 1999
Mikrosfere	Diloksanid furoat	Cink acetat	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka u kolon	Mikrosfere su uspješno pripremljene sušenjem raspršivanjem. Mikrosfere zadržavaju integritet u želucu i tankom crijevu zbog umreživanja s cink acetatom, a u kolonu se selektivno razgrađuju djelovanjem mikroflora. Diloksanid furoat se pretvara u aktivan oblik lijeka hidrolitičkom razgradnjom u kolonu pomoću prisutnih enzima. Pektin služi kao izvor nutrijenata i vode za probavnu mikrofloru i time povećava pretvorbu prolijeka u aktivan oblik.	Tiwari i sur., 2016

DRUGE TEHNIKE IZRADE

Polielektrolitni kompleks	Klorpromazin hidroklorid	Kitozan	Nazalna primjena	Povećanje bioraspoloživosti lijeka	Liofilizacijom polielektrolitnog kompleksa pripremljeni su mukoadhezivni nazalni umetci s različitim profilima oslobađanja lijeka. Molarni omjer kitozana i pektina pri pripremi kompleksa utječe na oslobađanje i permeaciju lijeka.	Luppi i sur., 2010
Hidrogel	5-Fluorouracil	Poli(2-dimetil-amino)etil metakrilat i fosfatni umreživač bis(2-metakriloiloksi) etilfosfat	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka u kolon	Stvoren je hidrogel od pektina i navedenog polimera te fosfatnog umreživača zbog kojeg formirana polimerna mreža ima bolja svojstva bubrenja u alkalnom mediju nego u kiselom. Lijek je uklopljen u takav sustav te je ispitivano <i>in vitro</i> oslobađanje lijeka u odgovarajućim uvjetima te su ispitana strukturna, toplinska i morfološka svojstva. Rezultati bubrenja pokazuju da hidrogelovi izrazito reagiraju na pH i temperaturu. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da ovakvi sustavi mogu biti korisni za ciljanu dostavu lijeka u kolon.	Eswaramma i sur., 2017.

Hidrogel	Mesalmin, progesteron	Kitozan	Oralna primjena	Primjena pektinsko-kitozanskih termoreverzibilnih hidrogelova kao sustava za dostavu lijekova	Hidrogelovi kitozana i pektina osigurali su produljeno oslobađanje mesalamina i progesterona zahvaljujući umreženoj strukturi gela kao i interakcijama polimera i uklopljenog lijeka.	Neufeld i sur., 2017
Nanočestice	Kalcitonin	-	Oralna primjena	Poboljšanje intestinalne apsorpcije kalcitonina	Pripravljene su pektinsko-liposomske nanočestice koje zbog svoje mukoadhezivnosti omogućuju produljeni kontakt sa sluznicom probavnog sustava što rezultira boljom apsorpcijom kalcitonina.	Thirawong i sur., 2008
Nanokonjugati	Cisplatin	-	Intravenska primjena	Produljeno zadržavanje lijeka u sistemskoj cirkulaciji	Nanokonjugati lijeka i pektina osiguravaju dulje zadržavanje lijeka u cirkulaciji. Utvrđen je potencijal konjugata za osiguravanje boljeg antitumorskog učinka i boljeg sigurnosnog profila od samog cisplatina uslijed smanjene akumulacije u bubreziima odnosno smanjene nefrotoksičnosti lijeka.	Verma i Sachin, 2008
Mikrogranule	Doksorubicin	-	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka kod karcinoma rektuma	Mikrogranule sadrže konjugate tioliranog pektina i doksorubicina povezanih disulfidnim vezama. U mikrookolini karcinoma moguća je razgradnja disulfidnih veza i oslobađanje lijeka. Provedena su <i>in vitro</i> antitumorska ispitivanja tioliranih konjugata na različitim staničnim linijama raka. Konjugati su pokazali izvrsnu antitumorsku aktivnost na mišjim stanicama karcinoma kolona (CT26).	Cheewatana-kornkool i sur., 2017a Cheewatana-kornkool i sur., 2017b
Mikrosfere	Metronidazol	-	Oralna primjena	Ciljana dostava lijeka u debelo crijevo i liječenje infekcije amebama	Mikrosfere građene od pektina na kojeg je glikozidnim vezama vezan metronidazol, zadržavaju svoj integritet u želucu i tankome crijevu. Metronidazol se oslobađa u kolonu uslijed cijepanja glikozidnih veza.	Vaidya i sur., 2012

1.2.2 NAZALNA PRIMJENA LIJEKA

Nazalna primjena lijeka uobičajena je u liječenju oboljenja nosne sluznice poput nazalne kongestije, nazalnih infekcija i alergija. Ipak, nosna sluznica predstavlja i mjesto sistemske primjene lijekova (Munarin i sur., 2012). Dobru sistemsku raspoloživost nazalno primijenjenog lijeka osiguravaju velika površina, niska enzimaska aktivnost te dobra permeabilnost i prokrvljenost nosne sluznice (Illum, 2012). Također, jedna od prednosti nazalne primjene lijekova je zaobilaznje prvog prolaza kroz jetru. Nazalnom primjenom moguće je postići i izravnu dostavu lijeka u mozak i to preko olfaktornog neuroepitela koji je jedini dio središnjeg živčanog sustava koji je direktno izložen okolišu (Illum, 2004).

Ograničenje nazalne primjene lijekova je mukocilijarno čišćenje zahvaljujući kojem se primijenjeni lijek brzo uklanja s mjesta apsorpcije. Konvencionalni farmaceutski oblici za nazalnu primjenu (otopine i suspenzije u obliku kapi ili sprejeva), brzo se uklanjaju iz nosne šupljine upravo zbog mukocilijarnog čišćenja, a viskozne otopine teško je primijeniti kao kapi i sprejeve (Luppi i sur., 2010; Munarin i sur., 2012).

Mukoadhezivni polimeri mogu poslužiti kao nosači djelatne tvari uz osiguravanje kontroliranog oslobađanja. Niskometoksilirani pektin predstavlja polimer izbora u izradi terapijskih sustava za nazalnu primjenu, jer otopina niskometoksiliranog pektina ima sposobnost geliranja u kontaktu s nosnom sluznicom bez dodatka egzogenog Ca^{2+} (Illum, 2012). Također, niskometoksilirani pektin je vrlo mukoadhezivan zahvaljujući nastajanju vodikovih veza između karboksilnih skupina pektina i mucina (Pornsak Sriamornsak i sur., 2010; Illum, 2000).

U novije vrijeme razvijena je tehnologija PecSys™ temeljena na pektinu, na kojoj se temelji odobreni inovativni pripravak fentanila za nazalnu primjenu (PecFent). Pripravak je u osnovi otopina fentanila i pektina koja se primjenjuje nazalno u obliku spreja. Navedena otopina gelira u kontaktu s nosnom sluznicom uslijed umrežavanja pektina dvovalentnim kalcijem pri fiziološkoj koncentraciji. Inovativni pripravak fentanila pokazao se učinkovitim i sigurnim za primjenu u osoba oboljelih od karcinoma osiguravajući brz analgetski učinak u stanjima probijajuće boli. Nazalnom primjenom fentanila izbjegava se metabolizam prvim prolaskom kroz jetru te se osigurava brža i bolja apsorpcija (Ueberall i sur., 2016). Uz već opisane prednosti, nazalna primjena fentanila posebno je prikladna za bolesnike s oralnim mukozititisom i kserostomijom koji su učestali kod osoba oboljelih od karcinoma, što može

učiniti oralnu primjenu lijeka teškom i neugodnom (Andrew Davies i sur., 2011). Prikladna je i za bolesnike s mučninom, povraćanjem i smanjenom probavnom funkcijom.

Razvijani su i polielektrolitni kompleksi pektina i kitozana s ciljem razvoja terapijskih sustava za nazalnu primjenu antipsihotičkih lijekova poput klorpromazin hidroklorida (Luppi i sur., 2010). Nazalni sprejevi koji sadrže pektin i nikotin mogu poslužiti pri liječenju ovisnosti o nikotinu (Munarin i sur., 2012). U tu svrhu predložena su dva različita terapijska sustava: (i) terapijski sustav s pulsnom dostavom nikotina koja osigurava brzu apsorpciju i (ii) terapijski sustav s kontroliranim/produljenim oslobađanjem nikotina za osiguravanje produljenog učinka. Polielektrolitni kompleksi pektina i nikotina osiguravaju produljeno oslobađanje nikotina. Usto, sustavi pripremljeni uz suvišak nikotina, mogu osigurati i naglo početno oslobađanje nikotina, potrebno za brzo postizanje učinka (Illum, 1999).

1.3 PRIMJENA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM U IZRADI TERAPIJSKIH SUSTAVA TEMELJENIH NA PEKTINU

Sušenje raspršivanjem je proces koji se koristi za brzo i efikasno prevođenje tekućina poput otopina, emulzija i suspenzija u suhi praškasti produkt (Li i sur., 2010). Sušenje raspršivanjem nalazi primjenu u područjima poput farmaceutske, kemijske, biokemijske i prehrambene industrije, kao tehnologija koja omogućava pripremu suhog produkta optimiranih svojstava čestica i dulje stabilnosti, lakšeg rukovanja i skladištenja. Postupak sušenja raspršivanjem je jednostavni proces koji uključuje raspršivanje tekućeg uzorka na sapnici u sitne kapljice koje se suše u komori za sušenje uslijed kontakta sa zagrijanim plinom (najčešće zrakom) te odvajanje praškastog produkta iz plina za sušenje. Navedena tehnika prikladna je i za sušenje termolabilnih tvari (Conte i sur., 1994). Naime, isparavanje otapala hladi česticu koja nastaje stoga čestice nikada ne dosegnu temperaturu medija za sušenje na ulazu u kolonu nego im je najviša temperatura jednaka temperaturi medija za sušenje na izlasku iz kolone (Singh i Van den Mooter, 2016; Cal i Sollohub, 2010). Sušenjem raspršivanjem nastaju mikročestice čija morfologija ovisi o otopljenom i/ili suspendiranom materijalu koji se suši, svojstvima otopine/emulzije/suspenzije te procesnim parametrima kao što su ulazna temperatura medija za sušenje, brzina dotoka uzorka i brzina protoka medija za sušenje. Ukupni prinos sušenja raspršivanjem (iskorištenje procesa) obično iznosi oko 50% do 70% (Li i sur., 2010).

Sušenje raspršivanjem se u farmaceutskoj tehnologiji koristi za pripremu mikrosfera za kontroliranu dostavu lijekova. Dobivene mikročestice sušenjem raspršivanjem razlikuju se ovisno o tome je li lijek dispergirani ili otopljen u otopini polimera koja će se sušiti raspršivanjem. Proizvodnja biorazgradljivih mikročestica sušenjem raspršivanjem je vrlo zanimljiva alternativa konvencionalnoj tehnologiji mikrokapsuliranja (Arpagaus i Schafroth, 2009). Rezultati postupka procjenjuju se temeljem prinosa, morfologije i veličine čestica te rezultirajućeg profila oslobađanja lijeka.

U literaturi se navode primjeri mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem temeljenih na pektinu. Jedan od primjera je razvoj pektinskih mikrosfera za nazalnu primjenu ondansetrona (Mahajan i sur., 2012). U tom istraživanju ispitan je utjecaj procesnih i formulacijskih parametara poput koncentracije lijeka i polimera u raspršivanom uzorku te brzine protoka uzorka na veličinu čestica i učinkovitost uklapanja lijeka. Utvrđen je utjecaj koncentracije polimera i brzina protoka raspršivanog sustava na veličinu čestica i učinkovitost uklapanja lijeka. Dobivena veličina mikrosfera povoljna je za nazalnu primjenu. S porastom koncentracije pektina u raspršivanom sustavu rasla je i sposobnost bubrenja mikrosfera te mukoadhezivnost. Provedena su *in vivo* ispitivanja na zečevima kojima je utvrđena bolja bioraspoloživost nazalno primijenjenog lijeka u odnosu na oralno primijenjeni lijek.

Sušenje raspršivanjem pokazalo se kao učinkovita tehnika pripreme pektinskih mikrosfera za okularnu primjenu piroksikama. Razvijene mikrosfere osigurale su veliku bioraspoloživost lijeka pružajući određene prednosti pred drugim oftalmičkim sustavima. Primjerice, lakše se primjenjuju u odnosu na umetke jer se ne moraju uklanjati s mjesta primjene, a isto tako su i stabilniji od liposoma (Giunchedi i sur., 1999). Pripremljene su i mikrosfere od različitih bioadhezivnih polimera (među kojima je i pektin) za okularnu primjenu sulfacetamida za liječenje keratitisa (Sensoy i sur., 2009). Sušenjem raspršivanjem pripravljene su i mikročestice s kurkuminom građene od pektina i polivinilpirolidona prikladne za pulmonalnu primjenu. Utvrđen je povećan antitumorski potencijal uklopljenog kurkumina (Gaikwad, 2017).

Drugi primjeri su mikrosfere s diloksanid furoatom za dostavu lijeka u probavni sustav (Tiwari i sur., 2016) te već prije spomenute mikrosfere s vankomicinom (Bigucci i sur., 2009). Sušenjem raspršivanjem konjugata pektina i aminotiofenola pripravljene su

mikročestice s uklopljenim metronidazolom za ciljanu dostavu lijeka u kolon (Perera i sur., 2010).

Čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN) razvijaju se kao nosači lipofilnih lijekova s ciljem povećanja njihove bioraspoloživosti i osiguranja modificiranog oslobađanja (Müller i sur., 2000). U novije vrijeme ispituje se i mogućnost sušenja raspršivanjem suspenzija SLN. Kako bi se izbjegla njihova aglomeracija u procesu sušenja raspršivanjem, Wanga i suradnici (2016) obložili su SLN dvostrukim slojem polimera kazeina i pektina kemijski umreženih odgovarajućim umreživačem. Umreživanjem je postignuta veća stabilnost i bolje uređena struktura SLN-a. Postignuto je i bolje uklapanje kurkumina. Dokazano je da je takav sustav stabilan u probavnom sustavu i ima poboljšano antioksidativno djelovanje. Sustav pokazuje potencijal za oralnu primjenu lipofilnih lijekova (Wanga i sur., 2016).

Pripravljene su i nanogelovi kompleksiranjem pektina i lipoproteina male gustoće kako nosači kurkumina za oralni put primjene. Takvi nanogelovi sušenjem raspršivanjem prevedeni su u praškasti produkt. Razvijeni sustav rezultirao je pH ovisnim oslobađanjem lijeka u probavnom sustavu (Zhou i sur., 2016). Također, sušenjem raspršivanjem alginatno-pektinskih nanočestica s gentamicinom pripravljena je funkcionalna obloga za rane. Pripravljene praškaste proizvode u kontaktu s eksudatom rane bubri i stvaraju gel na mjestu primjene. U prvoj fazi dolazi do naglog oslobađanja lijeka (engl. *burst effect*) što pogoduje sprječavanju širenja infekcije. Potom slijedi produljeno oslobađanje lijeka koje ovisi o veličini četica i brzini geliranja praška. Produljeno oslobađanje rezultat je nastanka gela na mjestu primjene koji smanjuje brzinu difuzije lijeka. Utvrđeno je bolji i dulji antibakterijski učinak razvijenog terapijskog sustava u odnosu na sami lijek (De Cicco i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pektin je biorazgradljiv, biokompatibilan i netoksičan polisaharid koji nalazi veliku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Nguyen i sur. 2011; Eswaramma i sur., 2017). Svojstva poput mogućnosti *in situ* geliranja te mukoadhezivnost čine ga zanimljivim polimerom za biomedicinsku primjenu i razvoj terapijskih sustava.

Nazalni put primjene lijeka pokazao se zanimljivim za lijekove koji podliježu opsežnoj razgradnji u probavnom sustavu ili prvim prolaskom kroz jetru (Mahajan i sur., 2012). Osim prednosti koje pruža ovakav put primjene poput dobre prokrvljenosti, velike površine i dobre permeabilnosti (Illum 2012), postoje i ograničenja poput mukocilijarnog čišćenja. Stoga, da bi se povećalo vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene, razvijaju se sustavi koji se temelje na mukoadhezivnim polimerima. Mukoadhezivni sustavi poput mikrosfera štite lijek od enzimske razgradnje i povećavaju vrijeme kontakta s nazalnom sluznicom (Shah i sur., 2010).

Sušenje raspršivanjem je jednostavan, brz i reproducibilan proces prevođenja tekućih sustava (otopina, emulzija i suspenzija) u suhi praškasti produkt. Sušenje raspršivanjem ima značajnu ulogu u razvoju mikročestica kao terapijskih sustava za nazalnu primjenu. Razlog tome je činjenica da se variranjem procesnih i formulacijskih parametara može kontrolirati veličina čestica i postići željeni profil oslobađanja lijeka (Nižić, 2017).

Deksametazon je sintetski kortikosteroid s glukokortikoidnim djelovanjem i blagim mineralokortikoidnim djelovanjem. Djeluje protuupalno i imunosupresivno te ima analgetičke i antialergijske učinke. Deksametazon ima vrlo široke terapijske indikacije (www.halmed.hr). Liječenje kroničnog rinosinitisa s nazalnim polipima temelji se na primjeni kortikosteroida. Oralna primjena kortikosteroida vezana je uz brojne nuspojave poput supresije osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, hiperglikemije, osteoporoze, hipertenzije, nesanice, katarakte, glaukoma i drugih. Stoga postoji veliki interes za razvoj sustava za nazalnu primjenu koji će osigurati dostavu lijeka u područje iza nosne valvule (područje gdje se pojavljuju polipi) i smanjiti nuspojave lijeka (Jurišić Dukovski, 2017).

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti suhi praškasti terapijski sustav za nazalnu primjenu deksametazona koji bi trebao omogućiti produljeno zadržavanje na mjestu primjene te produljeno oslobađanje lijeka, s ciljem osiguravanja lokalnog učinka uz nižu primijenjenu

dozu lijeka. U tu svrhu metodom sušenja raspršivanjem pripravljene su pektinske mikrosfere kao nosači lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom. Pripravljene nanočestice i mikrosfere karakterizirane su s obzirom na veličinu, površinski naboj i sadržaj uklopljenog lijeka. Mikrosfere kao suhi praškasti produkt, karakterizirane su s obzirom na svojstva bubrenja i profil oslobađanja uklopljenog lijeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U ovom diplomskom radu za izradu nanočestica korišteni su:

- deksametazon (Sanofi Aventis, Francuska),
- lecitin S100 (Lipoid GmbH, Njemačka),
- dimetildioktadecilamonij bromid (engl. *dimethyldioctadecylammonium bromide*, DDAB; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka),
- natrijev alginat (Pronova LV G; NovaMatrix, Norveška),
- 96% etanol (Kemig, Hrvatska).

Za izradu mikrosfera korišten je niskometoksilirani amidirani pektin CF 025 (stupanj esterifikacije 23-28%; stupanj amidacije 22-25%; Herbstreith & Fox, Njemačka).

Vodena otopina NaCl koncentracije 10 mM (Keming, Hrvatska), korištena je za razrjeđivanje suspenzije nanočestica pri mjerenju zeta-potencijala.

Umjetni nazalni fluid (engl. *Simulated Nasal Fluid*, SNF), pripremljen otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 40 mM i $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u koncentraciji od 5,3 mM, u pročišćenoj vodi, korišten je kao medij pri ispitivanju bubrenja mikrosfera i oslobađanja deksametazona iz mikrosfera.

3.2 METODE

3.2.1. IZRADA LIPIDNO-ALGINATNIH NANOČESTICA S DEKSAMETAZONOM

Lipidno-alginatne nanočestice s uklopljenim deksametazonom pripravljene su metodom opisanom u literaturi (Jurišić Dukovski i sur., 2017). U 96% etanolu otopljen je lecitin S100 i kationski lipid DDAB. Koncentracija lecitina S100 u otopini iznosila je 25 mg/ml, a koncentracija DDAB iznosila je 2,5 mg/ml (maseni omjer lecitina prema DDAB bio je 10:1). U toj otopini otopljen je i deksametazon u koncentraciji od 5 mg/ml (maseni omjer lecitina i deksametazona je bio 5:1).

Pripremljena je otopina natrijevog alginata koncentracije 10 mg/ml u pročišćenoj vodi. Alikvot od 0,5 ml otopine natrijevog alginata razrijeđen je pročišćenom vodom do volumena od 23 ml.

Nanočestice su pripravljene polaganim injektiranjem 2 ml etanolne otopine lipidnih sastavnica i deksametazona u razrijeđenu vodenu otopinu natrijevog alginata (23 ml) uz miješanje na magnetskom mješaču (900 okr./min). Pripravljena suspenzija nanočestica filtrirana je kroz filter veličine pora 0,45 μm (Millipore®, Švicarska) s ciljem odvajanja neuklopljenog deksametazona. Filtrirana suspenzija nanočestica korištena je u svim daljnjim ispitivanjima. Postupak određivanja sadržaja deksametazona uklopljenog u nanočestice opisan je u odjeljku 3.2.7.

3.2.2. ODREĐIVANJE VELIČINE I ZETA-POTENCIJALA NANOČESTICA

Veličina i zeta-potencijal nanočestica određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija). Prije mjerenja veličine čestica, suspenzija nanočestica (1 ml) razrijeđena je u volumnom omjeru 1:4 pročišćenom vodom filtriranom kroz filter (0,2 μm). Za potrebe određivanja zeta-potencijala, suspenzija nanočestica razrijeđena je u istom volumnom omjeru 10 mM otopinom NaCl. Pri mjerenjima je korišten monokromatski koherentni 10 Mw He-Ne laser ($\lambda=633$ nm). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25°C.

Pri određivanju veličine čestica, kut detekcije raspršene svjetlosti iznosio je 90°. Iz funkcije intenziteta raspršene svjetlosti ovisno o vremenu doznaje se veličina i stupanj disperznosti čestica. Mjerenje zeta-potencijala određuje se indirektnim mjerenjem elektroforetske pokretljivosti suspendiranih čestica, s obzirom da se frekvencija intenziteta raspršene svjetlosti mijenja ovisno o brzini gibanja čestica.

3.2.3. PRIPRAVA MIKROSFERA

Pektin je otopljen u pročišćenoj vodi u koncentraciji od 40 mg/ml miješanjem na magnetskom mješaču tijekom 24 h. Za pripremu pektinskih mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom, otopina pektina dodana je suspenziji nanočestica u količini potrebnoj da koncentracija pektina u konačnom sustavu bude 5 mg/ml. Suspenzija nanočestica u otopini pektina sušena je raspršivanjem na uređaju Büchi 190 Mini Spray Dryer (Flawil, Švicarska). Promjer korištene sapnice iznosio je 0,7 mm. Sušenje raspršivanjem vođeno je pri sljedećim uvjetima: protok komprimiranog zraka 700 NI/h, brzina protoka uzorka od 0,25 l /h, temperatura ulaznog zraka 135 °C, temperatura izlaznog zraka 85 °C.

Kao kontrolni uzorak pripravljene su konvencionalne pektinske mikrosfere s uklopljenim deksametazonom. Deksametazon je otopljen u smjesi pročišćene vode i etanola. Otopina pektina (40 mg/ml) dodana je otopini deksametazona u količini potrebnoj da koncentracija pektina u sjedinjenom sustavu bude 5 mg/ml. Sadržaj deksametazona i etanola u tako pripremljenom sustavu bio je jednak njihovom sadržaju u suspenziji nanočestica u otopini pektina. Pripravljene uzorak sušen je raspršivanjem pri jednakim uvjetima kao i suspenzija nanočestica u otopini pektina. Postupak određivanja sadržaja deksametazona uklopljenog u mikrosfere opisan je u odjeljku 3.2.7.

Iskorištenje procesa izračunato je kao omjer mase produkta dobivenog sušenjem raspršivanjem i mase suhe tvari u raspršivanom uzorku te je izraženo u postotku.

3.2.4. ODREĐIVANJE VELIČINE I ZETA-POTENCIJALA MIKROSFERA

Za određivanje srednjeg promjera i raspodjele veličine mikrosfera korišten je mikroskop Olympus BH2 spregnut s kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan) uz računalnu obradu slike pomoću programa Optomax V (Cambridge, Velika Britanija). Produkt je u tankom sloju nanesen na predmetno stakalce. Za svaki uzorak izmjereno je više od 1000 čestica.

Zeta-potencijal mikrosfera određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS) na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija). Neposredno prije mjerenja, mala količina mikrosfera dispergirana je u 10 mM otopini NaCl. Mjerenja su provedena pri 25°C.

3.2.5. ISPITIVANJE BUBRENJA MIKROSFERA

Svojstva bubrenja mikrosfera ispitana su volumetrijskom metodom korištenjem Franzove difuzijske ćelije. Franzova difuzijska ćelija sastoji se od donorskog i receptorskog odjeljka, odijeljenih polupropusnom membranom (Slika 4.). U donorski odjeljak, na samu membranu (Sartolon polimid, 0,45 µm, Sartorius stedim biotech, Njemačka), nanesen je uzorak mikrosfera (10 mg). Receptorski odjeljak napunjen je SNF-om ili pročišćenom vodom. Sustav je termostatiran pri temperaturi od 37°C. Bubrenje mikrosfera rezultiralo je snižavanjem razine receptorskog medija u postraničnoj cjevčici za uzorkovanje. U određenim vremenskim intervalima (svake 3 minute), nadomješten je receptorski medij do početne razine. Bubrenje mikrosfera izraženo je volumenom SNF-a ili pročišćene vode dodane kroz postraničnu cijev po miligramu mikrosfera tijekom 15-minutnog procesa bubrenja.



*Slika 4. Franzova difuzijska ćelija
(prilagođeno prema www.particlesciences.com)*

3.2.6. ISPITIVANJE OSLOBADANJA LIJEKA *IN VITRO*

Oslobađanje lijeka iz mikrosfera ispitano je korištenjem Franzove difuzijske ćelije (Slika 5.). Kao receptorski medij korišten je SNF termostatiran pri temperaturi od 37 °C. Mikrosfere (u količini koja sadržava 0,15 mg deksametazona) stavljene su u donorski odjeljak, odnosno nanese su na polupropusnu membranu (Sartolon poliamid, 0,45 μm, Sartorius stedim biotech, Njemačka). S ciljem sprječavanja isparavanja medija, otvor donorskog odjeljka prekriven je parafilmom. Receptorski medij miješan je pomoću magnetskog mješača (600 okr./min). Oslobađanje lijeka praćeno je u periodu od pet sati. Alikvoti receptorskog medija (0,5 ml) uzimani su u određenim vremenskim intervalima kroz postraničnu cjevčicu za uzorkovanje (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min.). Uzeti receptorski medij svaki put je nadomješten svježim SNF-om. Nakon petosatnog oslobađanja, kvantitativno su sakupljene izbubrene mikrosfere iz donorskog odjeljka. Postupak određivanja sadržaja deksametazona u uzorcima receptorskog medija kao i sadržaja preostalog lijeka u izbubrenim mikrosferama opisan je u odjeljku 3.2.7.

Ispitan je i profil difuzije deksametazona iz otopine kroz membranu korištenu u ispitivanju oslobađanja lijeka iz mikrosfera. Pripremljena je otopina deksametazona u pročišćenju vodi, koncentracije od 60 $\mu\text{g/ml}$. Pripremljena otopina (1 ml) nanosena je na membranu, u donorski odjeljak Franzove difuzijske ćelije. Receptorski medij (SNF) termostetiran je pri temperaturi od 37 °C. Ispitivanje difuzije provedeno je na jednaki način kao i ispitivanje oslobađanja lijeka iz mikrosfera. Postupak određivanja sadržaja deksametazona u uzorcima receptorskog medija kao i sadržaj lijeka u početnoj otopini opisan je u odjeljku 3.2.7.



Slika 5. Ispitivanje oslobađanja deksametazona iz mikročestica na Franzovoj difuzijskoj ćeliji

3.2.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA DEKSAMETAZONA

Kvantitativno određivanje deksametazona provedeno je metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC), kako je prethodno opisano u literaturi (Jurišić Dukovski i sur., 2017). Mjerenje je provedeno korištenjem kolone Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1×100 mm, 1,7 μm) na uređajima Agilent Infinity 1290 (Agilent, SAD) i Waters ACQUITY UPLC H Class (Waters, SAD).

Kvantitativno određivanje deksametazona u uzorcima receptorskog medija prikupljenim tijekom ispitivanja oslobađanja deksametazona *in vitro* provedeno je na uređaju Waters ACQUITY UPLC H Class, izokratnom UPLC metodom (5 mM acetatni pufer (pH 4,5)/acetonitril 68/32 % (V/V), 55°C, brzina protoka 0,7 ml/min, valna duljina 254 nm, volumen injektiranog uzorka 10 μl).

Kvantitativno određivanje deksametazona u lipidno-alginatnim nanočesticama i pektinskim mikrosferama s uklopljenim nanočesticama s deksametazonom provedeno je na uređaju Agilent Infinity 1290, gradijentnom UPLC metodom (5 mM acetatni pufer (pH 4.5)/acetonitril: 50/50 % (V/V) u 0 min, 25/75 % u 0,2 min, 0/100 % u 1,0 min; 55°C, brzina protoka 0,7 ml/min, valna duljina 254 nm, volumen injektiranog uzorka 10 μl). Uzorci su precizno odvagani u odmjernim tikvicama volumena 25 mL, u koje je dodano 2 ml tetrahidrofurana (THF) i 10 ml smjese otapala metanol/ultrapročišćena voda, 60/40 % (V/V). Nakon 20-minutnog soniciranja tikvice su dopunjene do oznake smjesom otapala metanol/ultrapročišćena voda, 60/40 % (V/V). Isti protokol pripreve uzorka korišten je i pri UPLC analizi sadržaja deksametazona u izdubrenim mikrosferama prikupljenim iz donorskog odjeljka na kraju postupka ispitivanja oslobađanja *in vitro*. Prije analize, svi uzorci su filtrirani kroz membranski filter (regenerirana celuloza, 0,2 μm, Whatman, Njemačka).

Sadržaj lijeka (C) u suspenziji nanočestica (nakon odvajanja neuklopljenog lijeka filtracijom) određen je prema jednadžbi:

$$C (\mu\text{g/ml}) = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{volumen suspenzije nanočestica}].$$

Sadržaj lijeka u mikrosferama (engl. *drug loading*, DL (%)) određen je prema jednadžbi:

$$\text{DL} (\%) = [\text{masa uklopljenog lijeka}] / [\text{masa mikrosfera}] \times 100.$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA

U ovom radu pripravljene su lipidno-alginatne nanočestice s uklopljenim deksametazonom injektiranjem etanolne otopine lecitina, DDAB i deksametazona u vodenu otopinu alginata.

Nanočestice nastaju ionotropnim geliranjem temeljem elektrostatske interakcije suprotno nabijenih sastavnica odnosno, u ovom slučaju, između alginata i lipidne smjese. Postoji veliki interes za istraživanjem hibridnih polimerno-lipidnih nanočestica kao terapijskih sustava zahvaljujući njihovim brojnim prednostima kao što su hidrofilnost površine i mukoadhezivna svojstva koja proizlaze iz prisustva polimera na njihovoj površini, te sposobnost uklapanja i kontroliranog oslobađanja slabo topljivih lijekova uklopljenih u lipidni matriks (Zhang i sur., 2008; Hadinoto i sur., 2013).

Alginat je anionski polimer prirodnog porijekla. Vrlo se često koristi u pripravi biomedicinskih proizvoda i terapijskih sustava zahvaljujući pogodnim svojstvima kao što su biokompatibilnost, niska toksičnost, mogućnost geliranja te vrlo povoljna cijena (Lee i Mooney, 2012). U odnosu na pozitivno nabijene lipidne nanočestice (pripravljene iz lecitina i kationskog lipida), odgovarajuće lipidno-alginatne nanočestice su većeg srednjeg promjera, a također su i negativnog površinskog naboja što dokazuje prisustvo alginata na njihovoj površini (Jurišić Dukovski i sur., 2017).

Lipidne sastavnice su lecitin S100 i kationski lipid DDAB. Lecitin je prirodna smjesa fosfolipida. Lecitin S100 se uglavnom sastoji od fosfatidilkolina koji je prirodni sastojak bioloških membrana. On je netoksičan, biokompatibilan, ima mogućnost uklapanja lipofilnih lijekova te osigurava produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka (Bhatta i sur., 2012). Deksametazon je lipofilan lijek te se uklapa u lipidni matriks pripremljenih nanočestica. DDAB je kationski surfaktant. Sastoji se od dva duga hidrofobna lanca odnosno ima lipofilna svojstva. On osigurava pozitivan naboj lipidne smjese i elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim alginatom.

Sastav otopina korištenih pri izradi nanočestica s deksametazonom prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav otopina korištenih za pripremu lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom

Etanolna otopina (2 ml)			Vodena otopina (23 ml)
Lecitin (mg)	DDAB (mg)	Deksametazon (mg)	Alginat (mg)
50	5	10	5

Jurišić Dukovski i suradnici (2017) pripremili su nanočestice takvog sastava, odnosno s masenim omjerom lecitina i DDAB 10:1, lecitina i deksametazona 5:1 te koncentracijom alginata u konačnom sustavu od $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Tako pripravljene nanočestice uspoređene su s nanočesticama različitog masenog omjera lecitina i DDAB (50:0,7, 50:1, 50:3). Nanočestice s masenim omjerom lecitina i DDAB od 10:1 imale su najpovoljnija svojstva u usporedbi s drugim nanočesticama. Uočeno je da s porastom sadržaja DDAB raste i pozitivan naboj lipidne smjese te intenzitet elektrostatske interakcije lipidne smjese s negativno nabijenim alginatom. Posljedično nastaju nanočestice većeg promjera i negativnijeg površinskog naboja. Nanočestice s masenim omjerom lecitina i DDAB od 10:1 bile su karakterizirane najmanjim indeksom polidisperznosti te najnegativnijim zeta-potencijalom koji osigurava fizičku stabilnost suspenzije nanočestica.

Veličina lipidno-alginatnih čestica s deksametazonom pripremljenih u ovom radu iznosila je $261,4 \pm 5,7 \text{ nm}$ dok je zeta-potencijal bio $-32,5 \pm 0,6 \text{ mV}$. Nanočesticama je određen indeks polidisperznosti koji je iznosio 0,296 što znači da su čestice relativno ujednačene veličine. Sadržaj deksametazona u suspenziji nanočestica iznosio je $241,2 \pm 6,1 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Dobiveni rezultati u skladu s prethodno ostvarenim rezultatima (Jurišić Dukovski i sur., 2017) te ukazuju na ponovljivost i reproducibilnost pripreme lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom.

4.2. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA PEKTINSKIH MIKROSFERA

Brzo mukocilijarno čišćenje smanjuje vrijeme zadržavanja lijeka na sluznici nosa, osobito tekućih pripravaka poput otopina i suspenzija. Terapijski sustavi koji se temelje na mukoadhezivnim polimerima mogu produljiti kontakt lijeka sa sluznicom nosa (Saraporn i sur., 2006). Davno je još dokazano da bioadhezivni polimeri mogu usporiti mukocilijarno čišćenje, primjerice u *ex vivo* ispitivanjima na nepcu žabe (Lin i sur., 1993) te *in vivo* ispitivanjima u štakora (Zhou i sur., 1996). Sušenjem raspršivanjem moguće je pripremiti bioadhezivne mikrosfere koje imaju sposobnost bubrenja u kontaktu sa sluznicom, odnosno formiranja gela na mjestu primjene. Takve bioadhezivne mikrosfere osiguravaju produljeni kontakt lijeka sa sluznicom (Illum i sur. 1987), poboljšanu apsorpciju i kontrolirano oslobađanje lijeka iz sustava, što može pridonijeti smanjenju učestalosti primjene lijeka (Hafner i sur., 2007).

Sušenje raspršivanjem je jednostavan, brz i reproducibilan proces prevođenja tekućih sustava (otopina, emulzija i suspenzija) u suhi praškasti produkt (Mahajan i sur., 2012). Svojstva mikročestica dobivenih procesom sušenja raspršivanjem ovise o procesnim parametrima kao što su ulazna temperatura medija za sušenje, brzina dotoka uzorka, brzina protoka medija za sušenje i veličina otvora sapnice. Također, ovise i o formulacijskim parametrima kao što su koncentracija polimera, koncentracija lijeka, viskoznost raspršivanog uzorka te tip raspršivanog uzorka primjerice otopina, emulzija, suspenzija. Optimizacijom navedenih parametara moguće je postići željena svojstva produkta (Call i Sollohub, 2010).

Pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM) pripremljene su sušenjem raspršivanjem suspenzije nanočestica u otopini pektina. Uvjeti pri kojima je provedeno sušenje raspršivanjem već su prije spomenuti. Sušenjem raspršivanjem pripravljene su i konvencionalne pektinske mikrosfere s uklopljenim deksametazonom (DM) kao kontrolni uzorak. Veličina, zeta-potencijal DNM i DM mikrosfera te sadržaj deksametazona prikazani su u Tablici 3. DNM mikrosfere bile su karakterizirane većim srednjim promjerom u odnosu na DM mikrosfere (redom $2,76 \pm 0,1 \mu\text{m}$ vs $2,17 \pm 0,01 \mu\text{m}$). Nije uočena značajnija razlika u površinskom naboju DNM i DM mikrosfera ($-36,2 \pm 1,1 \text{ mV}$ vs $-36,8 \pm 1,3 \text{ mV}$). Negativni zeta-potencijal upućuje na prisutnost pektina na površini pripremljenih mikrosfera. Dobivene mikrosfere prikladne su za nazalnu primjenu.

Sadržaj deksametazona u DNM mikrosferama je iznosio $3,3\pm 0,3$ % odnosno za kontrolni uzorak $3,8\pm 0,9$ %. Primjerice Bigucci i suradnici (2009) uspjeli su uklopiti vankomicin u pektinsko-kitozanske mikrosfere u značajno većoj količini te su uočili da maseni omjeri pektina i kitozana te polimera i lijeka ne utječu značajno na uklapanje lijeka. Mahajan i suradnici (2012) pripravili su mikrosfere s ondansetronom karakterizirane sadržajem lijeka u rasponu od 23 do 29 %, te su zaključili da se uspješnost uklapanja lijeka smanjuje s povećanjem omjera lijeka i polimera.

Tablica 3. *Veličina, zeta-potencijal i sadržaj deksametazona pektinskih mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama (DNM) i konvencionalnih pektinskih mikrosfera (DM)*

	DNM	DM
Veličina (μm)	$2,76\pm 0,1$	$2,17\pm 0,01$
Zeta-potencijal (mV)	$-36,2\pm 1,1$	$-36,8\pm 1,3$
Sadržaj deksametazona (%)	$3,3\pm 0,3$	$3,8\pm 0,9$

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se oko 45 % što se smatra poprilično visokim s obzirom na korištenu metodu. Giunchedi i suradnici (1999) pripremili su pektinske mikrosfere s piroksikamom sa sličnim iskorištenjem (41-46%), a Mahajan i suradnici (2012) su pripravili pektinske mikrosfere uz niže vrijednosti iskorištenja. Dobivene vrijednosti mogu biti povezane s (i) gubitkom malenih i lakših čestica kroz ispuh uređaja, (ii) malom količinom materijala korištenih u procesu te (iii) gubitkom materijala zbog adhezije raspršenih kapljica i suhog produkta na stjenke komore za sušenje odnosno ciklona. Korištenjem drugih polimera za pripremu mikrosfera sušenjem raspršivanjem, primjerice kitozana, zabilježene vrijednosti iskorištenja kreću se od od 30-50 % (Giunchedi i sur., 2002). Saraporn i suradnici (2006) pripravili su mikrosfere od različitih mukoadhezivnih polimera uz iskorištenje između 24 i 74% i zaključili da se s povećanjem omjera lijeka i polimera blago smanjuje iskorištenje te da viskoznost raspršivane otopine također utječe na iskorištenje.

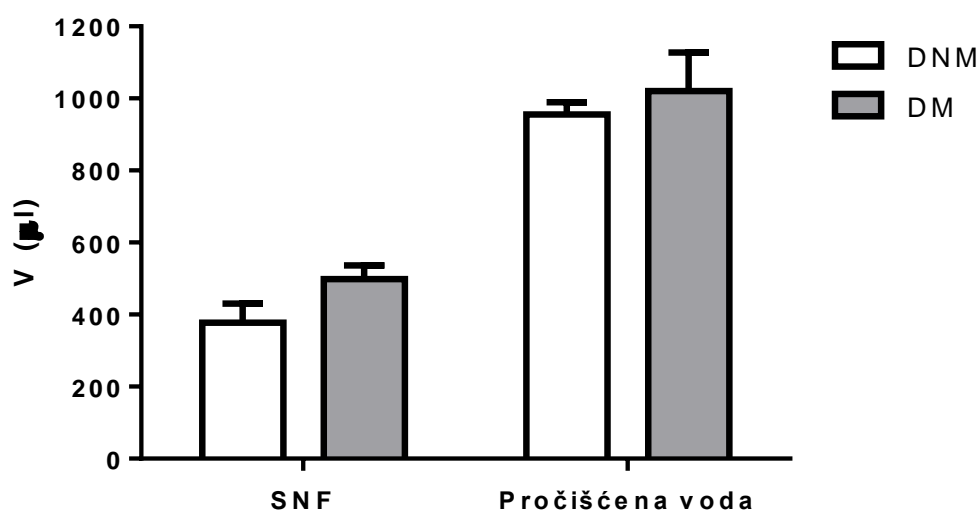
4.3. SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA

Kontrolirano bubrenje i formiranje hidrogela važne su karakteristike nazalne primjene suhih prašaka. Hidratacija polimera odnosno bubrenje ima utjecaj na mukoadhezivnost. Za optimalnu mukoadhezivnost potreban je odgovarajući stupanj hidratacije. Prevelika apsorpcija vode uzrokuje prekomjerno bubrenje čime se oslabljuju mukoadhezivne veze (Chaturvedi i sur., 2011) odnosno smanjuje adhezija primijenjenog sustava. Također, važno je i da brzina bubrenja i hidratacije nije prevelika kako bi se produljilo vrijeme prijanjanja (Ugwoke i sur., 2001). Primjenom mukoadhezivnih mikrosfera smanjuje se mukocilijarno čišćenje uslijed nastajanja gela *in situ* i adhezije na sluznicu (Ugwoke i sur., 2000). Također, bubrenje mikrosfera apsorpcijom vode na mjestu primjene uzrokuje otvaranje čvrstih veza između stanica, što može rezultirati većom bioraspoloživostu nekih lijekova (Pereswetoff-Morath, 1998).

Svojstva bubrenja ispitana su na Franzovoj difuzijskoj ćeliji, gdje su kao receptorski medij korišteni SNF i pročišćena voda. Rezultati su izraženi kao volumen SNF-a ili pročišćene vode dodane kroz postraničnu cijev po miligramu mikrosfera tijekom 15-minutnog procesa bubrenja. Volumen pročišćene vode i SNF-a apsorbiran u 15-minutnom procesu bubrenja mikrosfera s uklopljenim nanočesticama s deksametazonom (DNM) iznosi redom $95,5 \pm 3,4 \mu\text{l mg}^{-1}$ i $37,8 \pm 5,3 \mu\text{l mg}^{-1}$ (Slika 6.). Volumen pročišćene vode i SNF-a apsorbiran u 15-minutnom procesu bubrenja konvencionalnih mikrosfera s deksametazonom (DM) iznosi redom $102,0 \pm 10,7 \mu\text{l mg}^{-1}$ i $49,8 \pm 3,9 \mu\text{l mg}^{-1}$ za SNF (Slika 6.). Iz rezultata uočavamo da mikrosfere apsorbiraju veći volumen pročišćene vode u usporedbi sa SNF-om. Umjereno bubrenje pektinskih mikrosfera u SNF-u javlja se zbog umrežavanja pektina u prisustvu dvovalentnih kationa. Naime, pektin se umrežava ionima kalcija koji su prisutni u SNF-u koji prolazi kroz membranu između donorskog i receptorskog medija u procesu bubrenja mikrosfera. Već je poznat obrnuto proporcionalni odnos između stupnja umreženosti polimera i stupnja bubrenja (Pereswetoff-Morath, 1998). Tiwari i suradnici (2016) pripremili su pektinske mikrosfere umrežene cinkovim acetatom s uklopljenim diloksanid furoatom te su ispitali svojstva bubrenja takvih mikrosfera. Uočeno je da umrežene mikrosfere imaju manju sposobnost bubrenja u usporedbi s pektinskim mikrosferama koje nisu umrežene. Umjereno bubrenje može smanjiti mogućnost oštećenja nazalne sluznice ili osjećaja neugodnosti u nosnoj šupljini uslijed pretjeranog

bubrenja/porasta volumena primijenjenog terapijskog sustava u pojedinim pacijenata (Gavini i sur., 2008).

Mahajan i suradnici (2012) ispitivali su svojstva bubrenja pektinskih mikrosfera s ondansetronom koristeći fosfatni pufer (pH 6,6) u kojem nije moguće umrežavanje pektina s dvovalentnim ionima kalcija. Pokazano je da su svojstva bubrenja pektinskih mikrosfera ovisila o sadržaju pektina u pripremljenim mikrosferama.



Slika 6. Svojstva bubrenja pektinskih mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM) i konvencionalnih pektinskih mikrosfera s deksametazonom (DM)

Usporedbom mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama i konvencionalnih mikrosfera uočava se da konvencionalne mikrosfere imaju nešto bolja svojstva bubrenja (Slika 6). Ova razlika u apsorpciji tekućine može se pripisati različitom sadržaju pektina u uspoređenim sustavima dobivenim sušenjem raspršivanjem.

4.4. *IN VITRO* OSLOBADANJE DEKSAMETAZONA

In vitro oslobađanje deksametazona je ispitano korištenjem Franzove difuzijske ćelije uz SNF kao receptorski medij. Receptorski i donorski odjeljak odvojeni su poliamidnom membranom. SNF omogućuje geliranje odnosno umjereno bubrenje mikrosfera uslijed umrežavanja pektina ionima kalcija prisutnim u SNF-u. Fiziološka koncentracija kalcija kod zdravih ljudi je vrlo precizno kontrolirana zbog njene važne uloge u fiziološkim procesima. Utvrđena koncentracija Ca^{2+} kod zdravih dobrovoljaca je 5 ± 1 mM (Vanthanouvong i Roomans, 2004), a u ovom radu korišteni SNF ima koncentraciju Ca^{2+} od 5,3 mM. Nije u potpunosti poznato mogu li različite bolesti utjecati na koncentraciju kalcija u nosnom fluidu. No, smatra se da promjena koncentracije kalcija u nosnom fluidu, iako može utjecati na konzistenciju pektinskog gela, neće uzrokovati značajnije promjene kod *in vivo* primjene *in situ* gelirajućih formulacija (Watts i Smith, 2009).

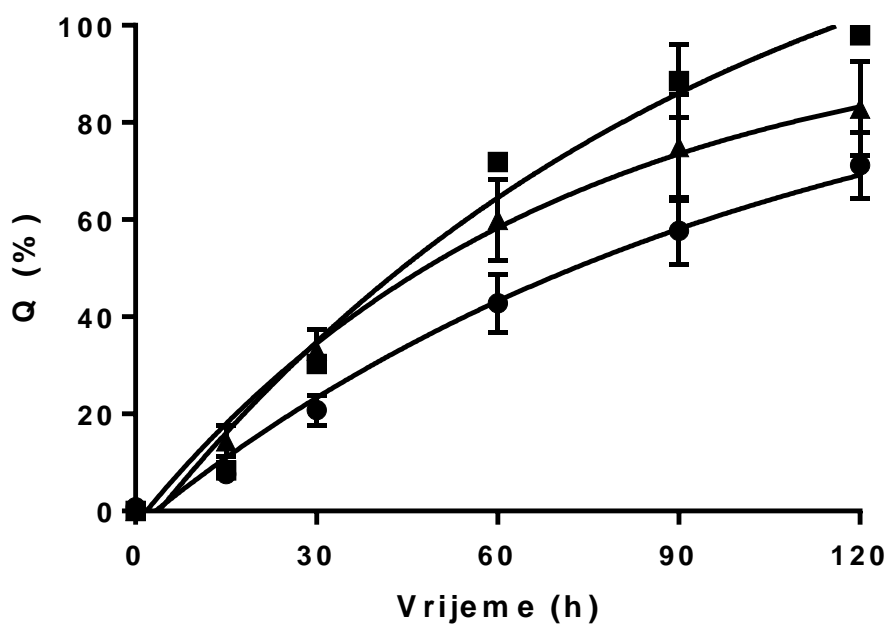
Prilikom ispitivanja oslobađanja lijek difundira iz gela kroz membranu u receptorski medij. Eksperimentalni uvjeti omogućuju polaganu hidrataciju mikrosfera oponašajući uvijete prisutne u nosnoj šupljini. Također, ispitano je i profil difuzije deksametazona iz otopine kroz membranu, s ciljem procjene utjecaja otpora kojeg membrana pruža difuziji deksametazona, na brzinu oslobađanja lijeka.

Watts i Smith (2009) prikazuju profil oslobađanja fentanila iz PecSys formulacije temeljene na pektinu. U dodiru s ionima kalcija otopina pektina i fentanila gelira što rezultira promjenom u profilu oslobađanja lijeka u usporedbi s vodenom otopinom lijeka u odsustvu pektina. Variranje formulacijskih parametara poput koncentracije i stupnja deesterifikacije pektina rezultiralo je različitim profilima oslobađanja fentanila *in vitro*.

U literaturi se navodi da 1% otopina pektina značajno mijenja profil *in vitro* oslobađanja lijeka (feksofenidina), odnosno usporava oslobađanje lijeka (Illum, 2001). Charlton i suradnici (2007) ispitivali su potencijal primjene bioadhezivnih polimera poput pektina i kitozana u pripravi nazalnih terapijskih sustava s ciljem postizanja produljenog zadržavanja na olfaktornom neuroepitelu. Ispitivanjem *in vitro* oslobađanja korištenjem Franzove difuzijske ćelije, uočeno je sporije oslobađanje lijeka u prisustvu polimera. Zaključeno je da značajniji učinak u smislu usporavanja oslobađanja lijeka imaju ionske interakcije između lijeka i polimera nego difuzijska barijera koju stvaraju polimeri.

Profil *in vitro* oslobađanja deksametazona iz pektinskih mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama (DNM) te pektinskih konvencionalnih mikrosfera (DM) prikazan je na Slici 7. DNM mikrosfere pokazuju produljeno oslobađanje deksametazona bez naglog oslobađanja lijeka (engl. *burst effect*), u usporedbi s DM mikrosferama i otopinom deksametazona. Možemo zaključiti da uklapanje deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice značajnije pridonosi produljenom oslobađanju lijeka u usporedbi s uklapanjem lijeka u pektinski matriks te pokazuje potencijal za produljeni učinak lijeka *in vivo*.

Slični zaključci izvedeni su i pri ispitivanju oslobađanja deksametazona iz nanočestica u pektinskom *in situ* gelirajućem sustavu u usporedbi sa suspenzijom nanočestica s lijekom i otopinom lijeka (Jurišić Dukovski i sur., 2017). Naime, uklapanjem deksametazona u nanočestice značajno je smanjena brzina oslobađanja lijeka u usporedbi s otopinom lijeka. Nije uočena značajnija razlika u oslobađanju lijeka iz nananočestica uklopljenih u pektinski gel i iz suspenzije nanočestica s uklopljenim lijekom. Stoga je oslobađanje lijeka iz nanočestica prepoznato kao najsporiji korak koji definira cjelokupni profil oslobađanja lijeka iz takvog *in situ* gelirajućeg sustava.



Slika 7. Profil in vitro oslobađanja deksametazona iz pektinskih mikrosfera s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM; ●); Profil in vitro oslobađanja deksametazona iz pektinskih mikrosfera s deksametazonom (DM; kontrolni uzorak)(▲); Profil difuzije deksametazona iz otopine kroz membranu (■); Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3).

5. ZAKLJUČAK

- Lipidno-alginatne nanočestice s uklopljenim deksametazonom uspješno su pripravljene i karakterizirane veličinom čestica od $261,4 \pm 5,7$ nm, zeta-potencijalom od $-32,5 \pm 0,6$ mV, indeksom polidisperznosti 0,296, a sadržaj deksametazona u suspenziji nanočestica iznosio je $241,2 \pm 6,1$ $\mu\text{g ml}^{-1}$.
- Pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM) i konvencionalne pektinske mikrosfere s deksametazonom (DM) uspješno su pripravljene tehnikom sušenja raspršivanjem uz relativno visoko iskorištenje procesa.
- DNM mikrosfere većeg su srednjeg promjera u odnosu na DM mikrosfere (redom $2,76 \pm 0,1$ μm vs $2,17 \pm 0,01$ μm). Nije uočena značajnija razlika u površinskom naboju DNM i DM mikrosfera ($-36,2 \pm 1,1$ mV vs $-36,8 \pm 1,3$ mV). Negativni zeta-potencijal upućuje na prisutnost pektina na površini pripremljenih mikrosfera.
- Sadržaj deksametazona u DNM i DM mikrosferama iznosio je redom $3,3 \pm 0,3$ % i $3,8 \pm 0,9$ %.
- DNM mikrosfere pokazale su bolja svojstva bubrenja u pročišćenoj vodi nego u SNF-u zbog umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} . Razlika u bubrenju između DNM i DM mikrosfera može se pripisati različitom sadržaju pektina u uspoređenim sustavima dobivenim sušenjem raspršivanjem.
- DNM mikrosfere karakterizirane su produljenim oslobađanjem deksametazona.
- Uklapanje deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice značajnije pridonosi produljenom oslobađanju lijeka u usporedbi s uklapanjem lijeka u pektinski matriks.

6. LITERATURA

- Arpagaus C, Schafroth N. Laboratory Scale Spray Drying of Biodegradable Polymers. *RDD Europe*, Lisbon, 2009, 269-274.
- Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K, Shukla PK. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432, 105-112.
- Bigucci F, Luppi B, Cerchiarc T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, Zecchi V. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35, 435-441.
- Bigucci F, Luppi B, Monaco L, Cerchiara and T, Zecchi V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61, 41-46.
- Cal K, Sollohub K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 575-586.
- Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a Rheology Modifier: Origin, Structure, Commercial Production and Rheology. *Carbohydr Polym*, 2017, 161, 118-139.
- Charlton ST, Davis SS, Illum L. Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: *In vitro* characterisation studies. *J Controll Release*, 2007, 118, 225-234.
- Chaturvedi K, Kulkarni AR, Aminabhavi TM. Blend microspheres of poly (3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate phthalate for colon delivery of 5-fluorouracil. *In Eng Chem Res*, 2011, 50, 10414-10423.
- Cheewatanakornkool K, Niratisai S, Manchun S, Dass CR, Sriamornsak P. Thiolated pectin–doxorubicin conjugates: Synthesis, characterization and anticancer activity studies. *Carbohydr Polym*, 2017a, 174, 493-506.
- Cheewatanakornkool K, Niratisai S, Manchun S, Dass CR, Sriamornsak P. Characterization and *in vitro* release studies of oral microbeads containing thiolated

- pectin-doxorubicin conjugates for colorectal cancer treatment. *Asian J. Pharm*, 2017b, 12, 509-520.
- Chourasia MK, Jain SK. Design and development of multiparticulate system for targeted drug delivery to colon. *Drug Deliv*, 2004, 11, 201-207.
- Conte U, Conti B, Giunchedi P, Maggi L. Spray dried polylactide microsphere preparation: influence of the technological parameters. *Drug Dev Ind Pharm*, 1994, 20, 235-258.
- Davies A, Sitte T, Elsner F, Reale C, Espinosa J, Brooks D, Fallon M. Consistency of Efficacy, Patient Acceptability, and Nasal Tolerability of Fentanyl Pectin Nasal Spray Compared with Immediate-Release Morphine Sulfate in Breakthrough Cancer Pain. *J Pain Symptom Manage*, 2011, 41, 358-366.
- Davis GA, Rudy AC, Archer SM, Wermeling DP, McNamara PJ. Bioavailability and pharmacokinetics of intranasal hydromorphone in patients experiencing vasomotor rhinitis. *Clin Drug Investig*, 2004a, 24, 633-9.
- Davis GA, Rudy AC, Archer SM, Wermeling DP, McNamara PJ. Effect of fluticasone propionate nasal spray on bioavailability of intranasal hydromorphone hydrochloride in patients with allergic rhinitis. *Pharmacotherapy*, 2004b, 24, 26-32.
- De Cicco F, Porta A, Sansone F, Aquino RP, P Del Gaudio P. Nanospray technology for an in situ gelling nanoparticulate powder as a wound dressing. *Int J Pharm*, 2014, 473, 30-37.
- Eswaramma S, Sivangani Reddy N, Krishna Rao KSV. Phosphate Crosslinked Pectin based Dual Responsive Hydrogel Networks and Nanocomposites: Development, Swelling Dynamics and Drug Release Characteristics. *Int J Biol Macromol*, 2017, 106, 1162-1172.
- Gaikwad D, Shewale R, Patil V, Mali D, Gaikwad U, Jadhav N. Enhancement in in vitro anti-angiogenesis activity and cytotoxicity in lung cancer cell by pectin-PVP based curcumin particulates. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104, 656-664.

- Gavini E, Rasso G, Muzzarelli C, Massimo C, Giunchedi P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 245-252.
- Giunchedi P, Conte U, Chetoni P, Saettone MF. Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation invitro and in vivo in albino rabbits. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9, 1-7.
- Giunchedi P, Juliano C, Gavini E, Cossu M, Sorrenti M. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 53, 233-239.
- Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett*, 1973, 32, 195-198.
- Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85, 427-443.
- Hafner A, Filipović-Grčić J, Voinovich D, Jalšenjak I. Development and In Vitro Characterization of Chitosan-based Microspheres for Nasal Delivery of Promethazine. *Drug Dev Ind Pharm*, 2007, 33, 427-436.
- Illum L, Jorgensen H, Bisgaard H, Krogsgaard O, Rossing N. Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. *Int J Pharm*, 1987, 39, 189-199.
- Illum L, Watts PJ, Cheng Y-H. 2001. US Patent 0051613 A1.
- Illum L. 1999. US Patent 5,935,604.
- Illum L. 1998. EP 0 975 367 B1.
- Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56, 3-17.
- Illum L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. *J Control Release*, 2012, 161, 254-263.

- In Vitro Release Testing Methods for Semisolid Formulations, <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/in-vitro-release-testing-methods.html>, pristupljeno: 15.2 2018.
- Jurišić Dukovski B, Plantić I, Čunčić I, Krtalić I, Juretić M, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded *in situ* gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *Int J Pharm*, 2017, 533, 480-487.
- Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 2012, 37, 106-126.
- Li H-P, Li H, Wang Z-D, Zhang J-J, Deng M-F, Chen S-L. Preparation and In Vitro Release of Ramose Chitosan-Based-5-Fluorouracil Microspheres. *J Korean Chem Soc*, 2013, 57, 88-93.
- Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme TF. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J Control Release*, 2010, 147, 304-310.
- Lin SY, Amidon GL, Weiner ND, Goldberg AH. Viscoelasticity of anionic polymers and their mucociliary transport on the frog palate. *Pharm Res*, 1993, 10, 411-417.
- Liu LS, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drugdelivery via oral route. *Biomaterials*, 2003, 24, 3333-3343.
- Liu Z, Wang L, Bao C, Li X, Cao L, Dai K, Zhu L. Cross-linked PEG via degradable phosphate esterbond: Synthesis, water-swelling, and application as drug carrier. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 2389-2395.
- Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, Corace G, Cerchiarc T, Zecchi V. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75, 381-387.
- Mahajan HS, Tatiya BV, Nerkar PP. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. *Powd Tech*, 2012, 221, 168-176.

- Martinac A, Filipovic-Grcic J, Perissutti B, Voinovich D, Pavelic Z. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: swelling study and evaluation of in vitro drug release properties. *J Microencapsul*, 2005, 22, 549-561.
- Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 161-177.
- Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51, 681-689.
- Naggar VF, El-Khawas M, Ismail FA, Boraie NA. Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs. *STP Pharma Sci*, 1992, 2, 227-234.
- Neufeld L, Bianco-Peled H. Pectin-chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101, 852-861.
- Nguyen S, Alund SJ, Hiorth M, Kjøniksen A-L, Smistad G. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 88, 664-673.
- Nižić L. Utjecaj brzine dotoka uzorka i protoka medija za sušenje na svojstva alginatnih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, diplomski rad, 2017.
- Perera G, Barthelmes J, Bernkop-Schnurch A. Novel pectin-4-aminothiophenole conjugate microparticles for colon-specific drug delivery. *J Control Release*, 2010, 145, 240-246.
- Pereswetoff-Morath L. Microspheres as nasal drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 185-194.
- Pothukuchi S, Li Y, Wong C. Development of a novel polymer-metal nanocomposite obtained through the route of in situ reduction for integral capacitor application. *J Appl Polym Sci*, 2004, 93, 1531-1538.
- Rinaudo M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int*, 2008, 57, 397-430.

- Rodriguez M, Vila-Jato JL, Torres D. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. *J Controll Release*, 1998, 55, 67-77.
- Saraparn H, Vimolmas L, Narueporn S, Garnpimol CR. Spray dried mucoadhesive microspheres: preparation and transport through nasal cell monolayer. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7, E1-E10.
- Sažetak opisa svojstava lijeka - Deksametazon Sandoz 4 mg/ml otopina za injekciju, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno: 17.2.2018.
- Sensoy D, Cevher E, Sarıcı A, Yılmaz M, Ozdamar A, Bergis N. Bioadhesive sulfacetamide sodium microspheres: Evaluation of their effectiveness in the treatment of bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit model. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 72, 487-495.
- Shah V, Sharma M, Parmar V, Upadhyay U. Formulation of sildenafil citrate loaded nasal microspheres: An in vitro, ex vivo characterization. *Inter J Drug Del*, 2010, 2, 213-220.
- Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100, 27-50.
- Souto-Maior JFA, Reis AV, Pedreiro LN, Cavalcanti OA. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polym Int*, 2010, 59, 127-135.
- Sriamornsak P, Thirawong N, Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Thongborisute J, Takeuchi H. Atomic force microscopy imaging of novel self-assembling pectin-liposome nanocomplexes. *Carbohydr Polym*, 2008, 71, 324-329.
- Sriamornsak P, Wattanakorn N, Takeuchi H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydr Polym*, 2010, 79, 54-59.
- Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn Univ Int J*, 2003, 3, 206-228.

- Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes. *J Control Release*, 2008, 125, 236-245.
- Tiwari V, Verma S, Verma SK, Dangi JS. Enhancement of site specific delivery of diloxanide furoate as an antiamebic drug. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 86, 50-57.
- Ueberall MA, Lorenzl S, Lux EA, Voltz R, Perelman M. Efficacy, safety, and tolerability of fentanyl pectin nasal spray in patients with breakthrough cancer pain. *J Pain Res*, 2016, 9, 572-585.
- Ugwoke MI, Agu RU, Vanbilloen H, Baetens J, Augustijns P, Verbeke N, Mortelmans L, Verbruggen A, Kinget R, Bormans G. Scintigraphic evaluation in rabbits of nasal drug delivery systems based on carbopol 971p and carboxymethylcellulose. *J Control Release*, 2000, 68, 207-214.
- Ugwoke MI, Verbeke N, Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53, 3-22.
- Vaidya A, Jain S, Agrawal RK, Jain SK. Pectin-metronidazole prodrug bearing microspheres for colon targeting. *J Saudi Chem Soci*, 2015, 19, 257-264.
- Vanthanouvong V, Roomans GM. Methods for determining the composition of nasal fluid by X-ray microanalysis. *Microsc Res Tech*, 2004, 63, 122-128.
- Verma AK, Sachin K. Novel Hydrophilic Drug Polymer Nano-Conjugates of Cisplatin Showing Long Blood Retention Profile - Its Release Kinetics, Cellular Uptake and Bio-Distribution. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5, 120-126.
- Wanga T, Mab X, Leib Y, Luoa Y. Solid lipid nanoparticles coated with cross-linked polymeric doublelayer for oral delivery of curcumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 148, 1-11.
- Watts PJ, Smith A. PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6, 543-552.

Zhang L, Chan JM, Gu FX, Rhee J-W, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, Alexis F, Langer R, Farokhzad OC. Self-Assembled Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano*, 2008, 2, 1696-1702.

Zhou M, Wang T, Hu Q, Luo Y. Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll*, 2016, 57, 20-29.

Zhou M, Donovan MD. Intranasal mucociliary clearance of putative bioadhesive polymer gels. *Int J Pharm*, 1996, 135, 115-125.

7. SAŽETAK

Pektin je biorazgradljiv, biokompatibilan i netoksičan polisaharid. Zbog svojstava bioadhezivnosti i geliranja niskometoksilirani pektin je polimer izbora za izradu terapijskih sustava za nazalnu primjenu. Nazalnom primjenom kortikosteroida u liječenju nazalnih polipa mogu se izbjeći njihove dobro poznate nuspojave. Nažalost, brzo mukocilijarno čišćenje u nosnoj šupljini smanjuje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu učinka. Primjenom *in situ* gelirajućih sustava moguće je postići produljeno zadržavanje i produljeno oslobađanje lijeka, čime bi se osigurao lokalni učinak uz primjenu niže doze kortikosteroida.

Cilj ovog rada bio je razviti pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom koje će omogućiti produljeno vrijeme zadržavanja lijeka na nazalnoj sluznici te produljeno oslobađanje. Pripremljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom uz maseni omjer lecitina i DDAB 10:1, lecitina i deksametazona 5:1 te koncentraciju alginata u konačnom sustavu od $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pripremljene su nanočestice karakterizirane veličinom od $261,4 \pm 5,7 \text{ nm}$, zeta-potencijalom od $-32,5 \pm 0,6 \text{ mV}$ i sadržajem deksametazona u suspenziji nanočestica od $241,2 \pm 6,1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM) i konvencionalne pektinske mikrosfere s deksametazonom (DM) uspješno su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem uz relativno visoko iskorištenje procesa. DNM mikrosfere većeg su srednjeg promjera u odnosu na DM mikrosfere (redom $2,76 \pm 0,1 \mu\text{m}$ vs $2,17 \pm 0,01 \mu\text{m}$). Nije uočena značajnija razlika u površinskom naboju DNM i DM mikrosfera ($-36,2 \pm 1,1 \text{ mV}$ vs $-36,8 \pm 1,3 \text{ mV}$). Negativni zeta-potencijal upućuje na prisutnost pektina na površini pripremljenih mikrosfera. Sadržaj deksametazona u DNM i DM mikrosferama iznosio je redom $3,3 \pm 0,3 \%$ i $3,8 \pm 0,9 \%$. DNM mikrosfere pokazale su bolja svojstva bubrenja u pročišćenoj vodi nego u SNF-u zbog umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} . Razlika u bubrenju između DNM i DM mikrosfera može se pripisati različitom sadržaju pektina u uspoređenim sustavima dobivenim sušenjem raspršivanjem. DNM mikrosfere osigurale su produljeno oslobađanje deksametazona bez naglog oslobađanja lijeka. Uklapanje deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice rezultiralo je značajnijim produljenjem oslobađanja u usporedbi s uklapanjem lijeka u konvencionalni pektinski matriks, što pokazuje potencijal za produljeno oslobađanje lijeka *in vivo*.

SUMMARY

Pectin is a biodegradable, biocompatible and non-toxic polysaccharide. Due to its bioadhesiveness and gel-forming characteristics, low methoxyl pectin is a polymer of choice in the development of nasal drug delivery systems. Well known side effects of corticosteroids for treatment of nasal polyps can be avoided by nasal drug administration. Unfortunately, rapid mucociliary clearance in the nasal cavity reduces the residence time of drug at the site of action. By using *in situ* gelling systems it is possible to achieve prolonged residence time at the nasal mucosa and prolonged drug release, thereby providing a local effect with the administration of a lower dose of corticosteroids.

The aim of this work was to develop dexamethasone loaded lipid/alginate nanoparticles incorporated in pectin-based microspheres that could provide prolonged residence time at the nasal mucosa and prolonged release of the drug. Dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles were prepared with weight ratios of lecithin to DDAB of 1:10, lecithin to dexamethasone of 5:1 and the concentration of alginate in the final system of 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Prepared nanoparticles were characterized by the size of 261.4 ± 5.7 nm, zeta-potential of -32.5 ± 0.6 mV and drug content in nanoparticles suspension of 241.2 ± 6.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Dexamethasone-loaded lipid/alginate nanoparticles incorporated in pectin based microspheres (DNM) and conventional dexamethasone-loaded pectin microspheres (DM) were successfully prepared by spray drying with relatively high process yield. DNM were characterized by larger mean diameter in comparison to DM (2.76 ± 0.1 μm vs 2.17 ± 0.01 μm , respectively). There was no significant difference in zeta-potential of DNM and DM microspheres (-36.2 ± 1.1 mV vs -36.8 ± 1.3 mV). Negative zeta-potential indicated the presence of pectin on the surface of the prepared microspheres. Drug loading in DNM and DM microspheres was $3.3 \pm 0.3\%$ and $3.8 \pm 0.9\%$, respectively. DNM microspheres absorbed significantly higher volumes of distilled water compared to SNF due to the cross-linking of pectin with divalent calcium ions. The swelling difference between DNM and DM microspheres corresponded to the different pectin content in the compared spray-dried systems. DNM microspheres showed prolonged dexamethasone release without burst release effect. The entrapment of dexamethasone into lipid-alginate nanoparticles prolonged its release more significantly than the incorporation into conventional pectin matrix, thus providing the potential for prolonged release of the drug *in vivo*.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Pektinske mikrosfere kao nosači lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom za nazalnu primjenu

Lea Mrak

SAŽETAK

Pektin je biorazgradljiv, biokompatibilan i netoksičan polisaharid. Zbog svojstava bioadhezivnosti i geliranja niskometoksilirani pektin je polimer izbora za izradu terapijskih sustava za nazalnu primjenu. Nazalnom primjenom kortikosteroida u liječenju nazalnih polipa mogu se izbjeći njihove dobro poznate nuspojave. Nažalost, brzo mukocilijarno čišćenje u nosnoj šupljini smanjuje vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu učinka. Primjenom *in situ* gelirajućih sustava moguće je postići produljeno zadržavanje i produljeno oslobađanje lijeka, čime bi se osigurao lokalni učinak uz primjenu niže doze kortikosteroida.

Cilj ovog rada bio je razviti pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom koje će omogućiti produljeno vrijeme zadržavanja lijeka na nazalnoj sluznici te produljeno oslobađanje. Pripremljene su lipidno-alginatne nanočestice s deksametazonom uz maseni omjer lecitina i DDAB 10:1, lecitina i deksametazona 5:1 te koncentraciju alginata u konačnom sustavu od $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pripremljene su nanočestice karakterizirane veličinom od $261,4 \pm 5,7 \text{ nm}$, zeta-potencijalom od $-32,5 \pm 0,6 \text{ mV}$ i sadržajem deksametazona u suspenziji nanočestica od $241,2 \pm 6,1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom (DNM) i konvencionalne pektinske mikrosfere s deksametazonom (DM) uspješno su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem uz relativno visoko iskorištenje procesa. DNM mikrosfere većeg su srednjeg promjera u odnosu na DM mikrosfere (redom $2,76 \pm 0,1 \mu\text{m}$ vs $2,17 \pm 0,01 \mu\text{m}$). Nije uočena značajnija razlika u površinskom naboju DNM i DM mikrosfera ($-36,2 \pm 1,1 \text{ mV}$ vs $-36,8 \pm 1,3 \text{ mV}$). Negativni zeta-potencijal upućuje na prisutnost pektina na površini pripremljenih mikrosfera. Sadržaj deksametazona u DNM i DM mikrosferama iznosio je redom $3,3 \pm 0,3\%$ i $3,8 \pm 0,9\%$. DNM mikrosfere pokazale su bolja svojstva bubrenja u pročišćenju vodi nego u SNF-u zbog umrežavanja pektina ionima Ca^{2+} . Razlika u bubrenju između DNM i DM mikrosfera može se pripisati različitim sadržajima pektina u uspoređenim sustavima dobivenim sušenjem raspršivanjem. DNM mikrosfere pokazuju produljeno oslobađanje deksametazona bez naglog oslobađanja lijeka. Uklapanje deksametazona u lipidno-alginatne nanočestice rezultiralo je značajnijim produljenjem oslobađanja u usporedbi s uklapanjem lijeka u konvencionalni pektinski matriks, što pokazuje potencijal za produljeno oslobađanje lijeka *in vivo*.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranica, 7 grafičkih prikaza, 3 tablica i 74 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pektin, Nazalna primjena, Mikrosfere, Deksometazon, Produljeno oslobađanje

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivan Pepić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Pectin microspheres as carriers for dexamethasone-loaded lipid-alginate nanoparticles for nasal delivery

Lea Mrak

SUMMARY

Pectin is a biodegradable, biocompatible and non-toxic polysaccharide. Due to its bioadhesiveness and gel-forming characteristics, low methoxyl pectin is a polymer of choice in the development of nasal drug delivery systems. Well known side effects of corticosteroids for treatment of nasal polyps can be avoided by nasal drug administration. Unfortunately, rapid mucociliary clearance in the nasal cavity reduces the residence time of drug at the site of action. By using *in situ* gelling systems it is possible to achieve prolonged residence time at the nasal mucosa and prolonged drug release, thereby providing a local effect with the administration of a lower dose of corticosteroids.

The aim of this work was to develop dexamethasone loaded lipid-alginate nanoparticles incorporated in pectin-based microspheres that could provide prolonged residence time at the nasal mucosa and prolonged release of the drug. Dexamethasone-loaded lipid-alginate nanoparticles were prepared with weight ratios of lecithin to DDAB of 1:10, lecithin to dexamethasone of 5:1 and the concentration of alginate in the final system of 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Prepared nanoparticles were characterized by the size of 261.4 \pm 5.7 nm, zeta-potential of -32.5 \pm 0.6 mV and drug content in nanoparticles suspension of 241.2 \pm 6.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Dexamethasone-loaded lipid-alginate nanoparticles incorporated in pectin based microspheres (DNM) and conventional dexamethasone-loaded pectin microspheres (DM) were successfully prepared by spray drying with relatively high process yield. DNM were characterized by larger mean diameter in comparison to DM (2.76 \pm 0.1 μm vs 2.17 \pm 0.01 μm , respectively). There was no significant difference in zeta-potential of DNM and DM microspheres (-36.2 \pm 1.1 mV vs -36.8 \pm 1.3 mV). Negative zeta-potential indicates the presence of pectin on the surface of the prepared microspheres. Drug loading in DNM and DM microspheres was 3.3 \pm 0.3% and 3.8 \pm 0.9%, respectively. DNM microspheres absorbed significantly higher volumes of distilled water compared to SNF due to the cross-linking of pectin with divalent calcium ions. The swelling difference between DNM and DM microspheres corresponded to the different pectin content in the compared spray-dried systems. DNM microspheres showed prolonged dexamethasone release without burst release effect. The entrapment of dexamethasone into lipid-alginate nanoparticles prolonged its release more significantly than the incorporation into conventional pectin matrix, thus providing the potential for prolonged release of the drug *in vivo*.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 7 figures, 3 tables and 74 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pectin, Nasal delivery, Microspheres, Dexamethasone, Prolonged release

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March, 2018.