Predformulacijska ispitivanja u razvoju kitozanskih mikročestica pripravljenih metodom sušenja raspršivanjem

Nodilo, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:744673

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Josip Nodilo

Predformulacijska ispitivanja u razvoju kitozanskih mikročestica pripravljenih metodom sušenja raspršivanjem

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Aniti Hafner na savjetima, iznimnom strpljenju i trudu, bez čijeg bi iznimnog oka za detalje i širokog znanja ovaj rad bilo puno teže napisati i čitati.

Zahvaljujem asistentici Sabini Keser na pomoći i potpori tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada, kao i pomoći pri interpretaciji podataka. Puno hvala i djelatnicima Plive Ani Jurić Simčić i Robertu Šurini na prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovoga rada, te što su se potrudili da mi rad u Plivi ostane u ugodnom sjećanju. Zahvale upućujem i Matiji Gretiću na provedbi pretražne elektronske mikroskopije.

Puno hvala svim mojim učiteljicama, učiteljima, profesorima, profesoricama i svom pomoćnom školskom osoblju što su mi prenijeli mnoga znanja tokom ovih 17 godina školovanja.

Hvala i svim prijateljicama i prijateljima, onima s faksa, ali i onima iz drugih škola koji su sve satove, predavanja, seminare i vježbe napravili mnogo zabavnijima nego što se na prvu činilo da će biti.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima i sestrama što su mi sve omogućili, uvijek bili poticaj, oslonac te puni ljubavi i razumijevanja.

*Lauri veliko hvala što je bez-uvijetno uvijek tu kraj mene, *bez koje bi moji studentski dani potrajali koju godinu dulje.*

Sadržaj

1.UVOD 1
1.1.KITOZAN 1
1.1.1.KEMIJSKA I BIOLOŠKA SVOJSTVA KITOZANA 1
1.1.2. STUPANJ DEACETILACIJE KITOZANA 5
1.1.3. MOLEKULSKA MASA KITOZANA 5
1.1.4. DERIVATI KITOZANA 6
1.1.5. KITOZAN KAO POLIMER IZBORA U PRIPRAVI INOVATIVNIH TERAPIJSKIH SUSTAVA 7
1.1.6. TERAPIJSKI SUSTAVI KITOZANA I POLIVINILNOG ALKOHOLA 8
1.2. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM 9
1.3. KITOZANSKI TERAPIJSKI SUSTAVI PRIPRAVLJENI SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 16
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1. MATERIJALI 18
3.2. METODE 18
3.2.1. PRIPREMA MIKROČESTICA 18
3.2.2. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM 19
3.2.3. ODREĐIVANJE VELIČINE MIKROČESTICA 19
3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA 19
3.2.5. KARAKTERIZACIJA ČVRSTOG STANJA MODULIRANOM DIFERENCIJALNOM PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM 20
3.2.6.KARAKTERIZACIJA POLIMERA DINAMIČKOM SORPCIJOM VLAGE 21
3.2.7. ODREĐIVANJE MORFOLOGIJE ČESTICA 22
4. REZULTATI I RASPRAVA 24
4.1. PRIPRAVA POLIMERNIH MIKROČESTICA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM 24
4.2. ISKORIŠTENJE SUŠENJA RASPRŠIVANJEM 25
4.3. VELIČINA POLIMERNIH MIKROČESTICA 26
4.4. SADRŽAJ VLAGE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA 28
4.5. DINAMIČKA SORPCIJA VLAGE NA ISHODNE POLIMERE 32
4.6. TERMIČKA SVOJSTVA ISHODNIH POLIMERA I POLIMERNIH MIKROČESTICA 34
4.7. MORFOLOGIJA POLIMERNIH MIKROČESTICA 38
5. ZAKLJUČCI 40
6. LITERATURA 41
7. SAŽETAK/SUMMARY 50
Temeljna dokumentacijska kartica
Basic documentation card

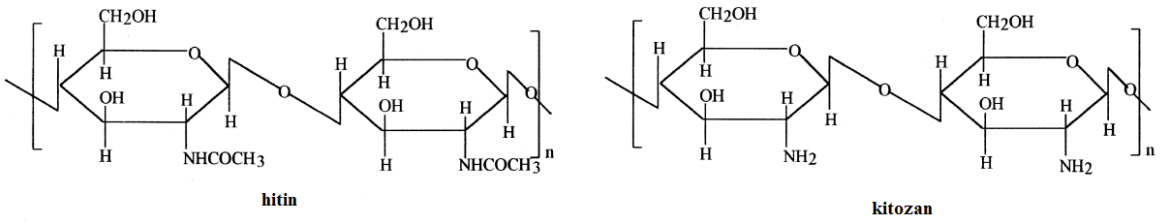
1.UVOD

1.1.KITOZAN

Povijest upotrebe kitozana započinje u 19. stoljeću, kad je C. Rouget 1859. godine prvi puta govorio o deacetiliranom hitinu (Dodane i Vilivalam, 1998), ali njegovo ime potiče iz 1894. od strane Hoppe-Seyler (Muzzarelli, 1977). U povijesti se prvo predlagalo korištenje kitozana za keliranje kationa, precipitaciju aniona prijelaznih metala, u svrhu pročišćavanja vode (Müzzarelli, 1971) i kod kromatografija (Muzzarelli, Raith i Tubertini, 1970), za što se i danas koristi. U prehrambenoj industriji kitozan se koristi za zgušnjavanje, ali i za produljenje roka trajanja namirnica (No i sur., 2007) te je u Japanu dozvoljeno njegovo korištenje u hrani od 1987. godine (No i sur., 2007). Njegova najraznolikija primjena je ipak u raznim novim terapijskim sustavima, za koje su ideje krenule sredinom 20. stoljeća.

1.1.1.KEMIJSKA I BIOLOŠKA SVOJSTVA KITOZANA

Kitozan je hidrofilan, biokompatibilan i biorazgradljiv polimer (He i sur., 1998). Po kemijskom sastavu je polisaharid, građen od nasumično raspoređenih β-(1→4) D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina, a dobiva se djelomičnom deacetilacijom hitina u lužnatim uvjetima. Hitin je drugi najzastupljeniji prirodni polimer, te ga se može naći u oklopima člankonožaca i staničnim stijenkama nekih rodova gljiva (Rinaudo, 2006). Razlike u njihovoj strukturi mogu se vidjeti na slici 1.



Slika 1. *Strukture hitina i kitozana (prilagođeno prema Ravi Kumar, 2000)*

Iz sirovine (najčešće su to oklopi račića i rakova) se u lužnatim uvjetima i pri visokoj temperaturi (u 40% otopini NaOH 1-3 sata pri 120°C), uz deacetilaciju hitina, odmah uklanjaju i svi proteini i $CaCO_3$ koji čine oko 80% suhe tvari oklopa račića (Ravi Kumar, 2000). Takvom hidrolizom doduše ne uklanjaju se u potpunosti karotenoidi, pa je kruti kitozan većinom blijedo žute boje. Granica kada hitin počinjemo nazivati kitozanom je kada

je polimer otprilike 50% deacetiliran i postane topljiv u kiselom vodenom mediju (Rinaudo, 2006). Do takvog stupnja deacetilacije dolazi se relativno brzo, dovoljno je svega pola sata tretiranja hitina lužinom pri povišenoj temperaturi (Muzzarelli, 1977).

Deacetilacija hitina nije jedini način dobivanja kitozana; Davis i Bartnicki-Garcia, (1984) prvi su opisali sintezu kitozana direktno iz N-acetilglukozamina istodobnim djelovanjem enzima hitin-sintaze i hitin-deacetilaze, prisutnima u ekstraktu gljiva *Mucor rouxiia*, čiji su stanični zidovi većim dijelom građeni od kitozana. Tsigos i suradnici (2000) nadalje navode prednosti kontrolirane deacetilacije hitina hitin-deacetilazama različitog podrijetla jer je na taj način moguće dobiti kitozane točno određenih ciljanih svojstava, što nije moguće postići deacetilacijom lužinom.

Kitozan se iz otopine jednostavno precipitira razrjeđivanjem otopine velikom količinom vode ili neutralizacijom (Müzzarelli, 1971).

Kitozan je jedinstven u farmaceutici kao polimer koji je pri pH<6,5 pozitivno nabijen i usprkos tome niske toksičnosti, što njemu i njegovim derivatima daje iznimnu važnost (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

Biološka svojstva kitozana kao što su mukoadhezivnost, sposobnost *in situ* geliranja, pospješivanja permeacije kroz različite sluznice i inhibiranja efluksnih pumpi većinom proizlaze iz pozitivnog naboja kitozana (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012). Primjerice, mukoadhezivnost se može pojasniti ionskom interakcijom između kitozana i negativno nabijenog mucina koji oblaže sluznice (He i sur., 1998), dok se antimikrobno djelovanje objašnjava disrupcijom stanične membrane uslijed ionske interakcije (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

Još jedno vrlo bitno svojstvo kitozana je i sposobnost otvaranja međustaničnih čvrstih veza, koje se zasniva na. (i) keliranju Ca^{2+} iona koji učvršćuju međustanične čvrste veze, (ii) defosforilaciji klaudina 4 (proteina koji čini čvrste veze) čime se uklanjaju s membrane, te (iii) smanjenju stvaranja klaudina 4 od strane stanice (Wang i sur., 2017).

Prednost kitozana nad hitinom, koji ima slična svojstva keliranja, je u tome što ga je jednostavnije otopiti. Dok je hitin topljiv samo u nekolicini organskih otapala te u vodenim otapalima samo uz dodatak mineralnih kiselina i polarnih suotapala, kitozan je topljiv već u blago kiselim vodenim otopinama kao što je na primjer 0,5% octena kiselina (Ravi Kumar, 2000) dok je netopljiv u neutralnim i bazičnim vodenim otopinama (Yadav i Chauhan, 2017; Müzzarelli, 1971). Također, budući da kitozan ima, u odnosu na acetilirane amino skupine

hitina, relativno reaktivne amino skupine, puno je lakše sintetizirati derivate kitozana nego hitina, što omogućuje velike promjene u svojstvima ovog polimera.

Mukoadhezivnost i reverzibilno otvaranje međustaničnih čvrstih veza (Yeh i sur., 2011) čine ga funkcionalnim ekscipijensom za oralnu primjenu lijekova (Lin i sur., 2007), ali i za primjenu lijekova putem različitih sluznica, s obzirom da kitozan može osigurati dulje zadržavanje na mjestu primjene i veću bioraspoloživost topikalno primijenjenog lijeka (Rossi i sur., 2012).

Mukoadhezivnost, hemostatsko (Malette i sur., 1983), antibakterijsko (Tsai i Su, 1999) i antifugalno (Rodriguez, i sur., 2003; Roller i Covill, 1999) djelovanje kitozana čine ga polimerom izbora u pripravi mnogih terapijskih sustava i medicinskih proizvoda, posebice suvremenih obloga za rane. Kitozan ne samo da sprječava krvarenje i infiltraciju mikroorganizama, već i pomaže bržem cijeljenju uz manje ožiljke (Paul i Sharma, 2004). Biološka aktivnost kitozana uz mehanizme pregledno je prikazana u Tablici 1.

Tablica 1. *Biološka aktivnost kitozana (prilagođeno prema Yadav i Chauhan, 2017)*

Biološka aktivnost	**Mehanizam djelovanja**
Hemostatsko djelovanje	Apliciran na rane, kitozan apsorbira plazmu, te se zahvaljujući svom pozitivnom naboju veže na negativno nabijenu sluznicu i oštećena tkiva, koagulira eritrocite, potiče adheziju, agregaciju i aktivaciju trombocita, te potiče obnovu glatkih mišića.
Baktericidno djelovanje	Postoje tri teorije antimikrobnog djelovanja kitozana: • interakcija kitozana i negativno nabijene stanične membrane mikroba rezultira povećanjem permeabilnosti membrane • kitozan se veže za bakterijsku DNA, te tako inhibira transkripciju i posljedično uzrokuje smrt stanice • kitozan keliranjem metalnih iona smanjuje djelovanje metaloproteina (Goy i sur., 2009)
Antivirusno djelovanje	Ovisi o mediju (precipitacijom kitozana slabi njegovo djelovanje), koncentraciji (s povećanjem koncentracije kitozana jača i djelovanje), stupnju polimerizacije (kitozani većeg stupanja polimerizacije imaju jače djelovanje) i naboju (negativno nabijeni derivati ne pokazuju antivirusna svojstva) (Chirkov, 2002).

Biološka aktivnost	**Mehanizam djelovanja** (nastavak)
Antitumorsko djelovanje	Kitozan smanjuje integritet stanične i mitohondrijske membrane tumorskih stanica (Qi i sur., 2005). Oblikovan u nanočestice, njegov potencijal smanjenja rasta tumorskog tkiva je to veći što su čestice manje (Qi i Xu, 2006).
Protuupalno djelovanje	Imunosni odgovor na biopolimer vodi agregaciji monocita na mjestu upale. Ti monociti diferenciraju u makrofage i luče razne protuupalne citokine, kao na primjer interleukin 10 koji djeluje kao faktor cijeljenja. Imunosni odgovor smanjuje se s povećanjem stupnja deacetilacije kitozana (Tomihata i Ikada, 1997).
Ubrzava formaciju kosti	Povećava kapacitet formiranja kosti povećavajući mehaničku stabilnost na mjestu prijeloma kosti. Brzina zarastanja je dodatno povećana u kombinaciji s trombocitnim faktorom rasta BB koji ubrzava prirodno cijeljenje kosti i inducira diferencijaciju nediferenciranih stanica u aktivne osteoblaste.
Imunosni adjuvans	Povećava permeaciju antigena preko sluznice te se imunosni sustav brže i jače senzibilizira (Illum i sur., 2001).
Hipolipemično djelovanje	Ionskom interakcijom kitozan precipitira masne i žučne kiseline i tako smanjuje njihovu apsorpciju (Martinac i Filipović-Grčić, 2002).
Reverzibilno otvaranje međustaničnih čvrstih veza	*In vitro* ispitivanjima utvrđeno je da kitozan otvara međustanične čvrste veze monosloja Caco-2 stanica poticanjem uklanjanja klaudin 4 proteina sa membrane i njegove razgradnje. Nakon uklanjanja kitozana, utvrđen je porast sinteze klaudina 4 u stanici i obnavljanje međustaničnih čvrstih veza. Autori također navode da to sigurno nije jedini mehanizam (Yeh i sur., 2011). Reverzibilno otvaranje međustaničnih čvrstih veza mnogo je slabije u prisustvu mucina uslijed interakcije kitozana s mucinom i slabijeg dopiranja do epitela (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

1.1.2. STUPANJ DEACETILACIJE KITOZANA

Sva najbitnija svojstva kitozana temelje se na njegovom pozitivnom naboju. Ukupni pozitivni naboj kitozana ovisi o stupnju deacetilacije, odnosno udjelu slobodnih (deacetiliranih) amino skupina koje se, pri odgovarajućem pH, mogu protonirati (pKa kitozana iznosi 6,5). Stupanj deacetilacije također je svojstvo koje ga odjeljuje od hitina; uzima se da je kitozan polimer sa stupnjem deacetilacije od 50 % i više, dok je hitin polimer sa stupnjem deacetilacije manjim od 50 % (Rinaudo, 2006).

S porastom stupnja deacetilacije i pozitivnog naboja kitozana raste i intenzitet interakcije s negativno nabijenim biološkim strukturama/molekulama, iz čega proizlazi veća mukoadhezivnost, izraženije antimikrobno djelovanje, uspješnije uklapanje negativno nabijenih djelatnih tvari i posebice bioloških lijekova (proteina, peptida, RNA ili DNA), kao i njihovo sporije oslobađanje (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Xu i Du, 2003; Rege i Block, 1999).

O stupnju deacetilacije ovisi i brzina razgradnje terapijskih sustava. Primjerice, utvrđeno je da se kitozanski filmovi primijenjeni supkutano u štakora sporije razgrađuju što su više deacetilirani (Tomihata i Ikada 1997). Isti autori navode i zapažanje da kitozani većeg stupnja deacetilacije uzrokuju manji upalni odgovor od kitozana manjeg stupnja deacetilacije uslijed niskog zeta potencijala.

U okviru utjecaja kitozana na cijeljenje rana, zapaženo je da kitozani s velikim stupnjem deacetilacije jako stimuliraju fibroblaste na proliferaciju, dok je brzina dijeljenja ljudskih keratinocita bila ovisna o koncentraciji kitozana (Howling i sur., 2001)

Problem u utvrđivanju razlike u djelovanju različito acetiliranih kitozana predstavlja činjenica da se u dosta slučajeva za otapanje kitozana u vodi koristi 0,5% octena kiselina, koja tijekom priprave terapijskog sustava može dodatno acetilirati kitozan (Corrigan, i sur., 2006).

1.1.3. MOLEKULSKA MASA KITOZANA

Tipično, komercijalno dostupni kitozani imaju molekulsku masu 50-2000 kDa (Rege i sur., 2003). Takav raspon molekulskih masa posljedica je korištenja različitih izvora hitina, kao što su oklopi škampa, rakova i miceliji gljiva (Ravi Kumar, 2000), različitih tehnika deacetilacije i alkalija, te različitog trajanja kisele hidrolize kojom se kidaju glikozidne veze.

Mnoga svojstva kitozana, osim o stupnju deacetilacije, ovise i o njegovoj molekulskoj masi. Primjerice, kitozani veće molekulske mase i/ili terapijski sustavi pripravljeni s kitozanom veće molekulske mase su mukoadhezivniji (Honary i sur., 2009), osiguravaju sporije oslobađanje uklopljenog lijeka (Learoyd i sur., 2009; Xu i Du, 2003) te su učinkovitiji u pospješivanju transmukozne permeacije uklopljenog lijeka (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012). Antimikrobna aktivnost kitozana ovisi o vrsti mikroorganizma, pa tako primjerice kod bakterije *Staphylococcus aureus* raste s povećanjem molekulske mase, a smanjuje se kod bakterije *Escherichia coli* (Zheng i Zhu, 2003).

1.1.4. DERIVATI KITOZANA

Derivati kitozana sintetiziraju se s ciljem poboljšanja topljivosti kitozana, mukoadhezivnih svojstava, otpornosti prema proteolitičkim enzimima, te samoorganiziranja u koloidne strukture (Zhang i sur., 2008). Najčešći postupci modificiranja svojstava kitozana su stvaranje soli, uvođenje funkcionalnih skupina ili lipofilnih entiteta te umrežavanje lanaca kitozana (Estevinho i sur., 2013).

Nemodificirani kitozan precipitira pri pH > 6,5, tako da njegov pozitivan utjecaj na apsorpciju lijekova prestaje unutar dvanaesnika i tankog crijeva, gdje se pH penje na 7,0. (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012). Taj problem se može riješiti modifikacijom kitozana. Primjerice, trimetilirani kitozan, konjugati kitozana i tiobutilamidina te konjugati kitozana i tioetilamidina ne precipitiraju unutar raspona pH vrijednosti u probavnom sustavu (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

Kemijska modifikacija kao što je trostruka metilacija amino skupine (što pojačava kationska svojstva kitozana) i dodatna PEG-ilacija rezultiraju 3-4 puta jačom mukoadhezivnošću (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012), bez značajnog povećanja citotoksičnosti (Amidi i sur., 2006), dok se tioliranjem kitozana dobiva polimer iznimne mukoadhezivnosti i pojačane kohezije, uslijed formiranja disulfidnih veza između tioliranog kitozana i mucina (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012). Zbog toga je istraživan njihov potencijal u pripravi inovativnih terapijskih sustava za oralnu primjenu peptidnih lijekova (Bernkop-Schnürch i sur., 2004).

Kemijske modifikacije kao što je N-supstitucija kitozanskih primarnih amino skupina s alkalnim lancima urodile su formulacijama kontroliranog oslobađanja i poboljšane bioraspoloživosti uklopljenog lijeka pri neutralnom i alkalnom pH (Chopra i sur., 2006).

Nešto neobičnija modifikacija kitozana je lauril-kitozan, pripravljen reakcijom između laurinske masne kiseline i kitozana. Navedeni derivat kitozana izvrsna je zamjena za magnezijev stearat, sredstvo za kliženje u proizvodnji čvrstih dozirnih oblika. Naime, lauril-kitozan ne utječe negativno na čvrstoću farmaceutskog oblika i brzinu raspadanja tableta nakon primjene, kao što je slučaj pri većim koncentracijama magnezijevog stearata (Bani-Jaber i sur., 2015).

Kitozan modificiran linolenskom kiselinom u otopinama tvori samoorganizirajuće nanočestice prihvatljive čvrstoće, koje su sposobne uklopiti proteine (Liu i sur., 2005). Slične čestice, pripravljene od tridehidroksikolne kiseline i glikol-kitozana, pokazale su dobro uklapanje doksorubicina i nižu toksičnost od otopine doksorubicina pri primjeni u štakora (Hyung Park i sur., 2006).

1.1.5. KITOZAN KAO POLIMER IZBORA U PRIPRAVI INOVATIVNIH TERAPIJSKIH SUSTAVA

Zahvaljujući iznimnim svojstvima kitozana kao što su biokompatibilnost, biorazgradljivost, mukoadhezivnost i netoksičnost, u zadnjih 20 godina velik broj istraživanja fokusiran je na razvoj kitozanskih terapijskih sustava, dizajniranih za oralnu primjenu te topikalnu primjenu putem različitih sluznica kao što su nazalna, bukalna, okularna i vaginalna (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

Kitozan je prikladan za razvoj različitih terapijskih sustava kao što su mikročestice, nanočestice, gelovi i spužve. Prednost mikročestica kao terapijskog sustava je mogućnost duljeg zadržavanja na sluznici u odnosu na otopinu djelatne tvari (Illum i sur., 2001). Naime, kitozanske mikročestice bubre u kontaktu sa vodenim medijem stvarajući gel koji osigurava dulje zadržavanje lijeka na mjestu apsorpcije. Oslobađanje lijeka kontrolirano je difuzijom kroz izbubreni sloj polimera. Dodatno usporavanje bubrenja/oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa moguće je postići umrežavanjem kitozana polianionima kao što je alginat, pektin ili hijaluronska kiselina, ali i multivalentnim anorganskim polimerima kao što je tripolifosfat (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012).

Uvelike se razvijaju i kitozanske nanočestice, primjerice ionotropnim geliranjem tripolifosfatom (Sawtarie i sur., 2017) ili negativno nabijenim lipidima (Hafner i sur., 2009). Intenzivno se istražuju i nanočestice formirane ionskom interakcijom između kitozana i negativno nabijenih bioloških molekula poput DNA ili siRNA (Ballarín-González i sur.,

2013). Navedenim pristupom povećava se internalizacija bioloških molekula u stanice, i pospješuje njihov učinak. Jedinstvena svojstva kitozana i njegovih derivata omogućuju razvoj pametnih terapijskih sustava s ciljanom dostavom vrlo potentnih i toksičnih lijekova na samo mjesto djelovanja. Primjerice, razvijan je pH-ovisni hidrogel derivata kitozana (N-karboksi-etil-kitozan/dibenzaldehid-PEG) s uklopljenim doksiciklinom koji je namijenjen liječenju metastaza u tkivu jetre. Navedeni hidrogel razgrađuje se pri nižem pH od fiziološkog, koji je uobičajen u mikrookolini tumorskog tkiva (koje svoju energiju primarno dobiva iz glukoze anaerobno koristeći laktat-dehidrogenazu). Time je osigurana ciljana dostava citotoksičnog lijeka u tumorsko tkivo uz minimaliziranje nuspojava (Qu i sur., 2017).

Gelovi kitozana naročito su korisni u oftalmičkoj i vaginalnoj primjeni, gdje se ističe kombinacija njihovog antimikrobnog i mukoadhezivnog djelovanja (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Bonferoni i sur., 2006).

Razvijaju se i kitozanske spužve kao obloge za rane pripravljene liofiliziranjem kitozanskog gela. Originalno su zamišljene kao terapijski sustavi s kortikosteroidom za liječenje rana zubnog mesa nastalih stomatološkim intervencijama (Oungbho i Müller, 1997). U novije vrijeme istražuje se njihova primjena, u kombinaciji sa nanočesticama srebra, u liječenju većih rana na koži (Huang i sur., 2017). U tim slučajevima zarastanje je između ostalog usporeno i činjenicom da tkivo nema kako premostiti nastalu ranu. Primjenom kitozanskih spužvi, stanice se mogu infiltrirati u pore i tako brže premostiti oštećenje, dok istodobno razgrađuju kitozan i stvaraju međustanični matriks (Paul i Sharma, 2004).

Kitozanom se mogu oblagati raznovrsni terapijski sustavi s ciljem optimiranja površinskih svojstava i modificiranja profila oslobađanja uklopljenog lijeka. Primjerice, ispitivan je potencijal liposoma obloženih kitozanom umreženim s tripolifosfatom za oralnu primjenu kvercetina (Caddeo i sur., 2016). Obloženi liposomi karakterizirani su odličnim uklapanjem kvercetina i kontroliranim oslobađanjem u alkalnim uvjetima.

1.1.6. TERAPIJSKI SUSTAVI KITOZANA I POLIVINILNOG ALKOHOLA

Polivinilni alkohol (PVA) je linearni sintetski polimer koji se koristi dugi niz godina. Komercijalno je dostupan u širokom rasponu molekulskih masa. Tako razlikujemo PVA velike, srednje i male viskoznosti koji odgovaraju redom molekulskim masama od 20 000 Da, 130 000 Da i 200 000 Da (Rowe, i sur., 2006).

Njegova biokompatibilnost, bioadhezivnost, netoksičnost, nekancerogenost, odlična topljivost u vodi i loša topljivost u organskim otapalima te cijeli spektar fizičkih svojstava ovisnih o hidroksilaciji, molekulskoj masi i umreženju lanaca, omogućuju njegovu široku primjenu u mnogim područjima, uključujući biomedicinsko (Baker i sur., 2012). Kao ekscipijens, PVA se koristi kao sredstvo za kliženje, sredstvo za oblaganje te sredstvo za prilagođavanje viskoznosti (Rowe, i sur., 2006). Primjenjuje se u izradi obloga za rane, kontaktnih leća, umjetnih organa i novih terapijskih sustava (Sivaraman i sur.2017).

U novije vrijeme razvijaju se terapijski sustavi kitozana u kombinaciji s PVA, posebice funkcionalne obloge za rane poput film-obloga (de Souza Costa-Júniori sur., 2008), hidrogelova (Morgado i sur., 2017; Fan i sur., 2016) i nanovlakana (Majd i sur., 2016). Kombinacijom navedenih polimera moguće je optimirati biofarmaceutska svojstva navedenih terapijskih sustava, kao što je fleksibilnost, topljivost/brzina otapanja i brzina razgradnje/resorpcije koja treba pratiti dinamiku cijeljenja rane (de Souza Costa-Júniori sur., 2008). Istodobno, ponašanje polimernog matriksa u kontaktu s biološkim tekućinama, odredit će i brzinu oslobađanja djelatne tvari, iz čega proizlazi da se kombiniranjem navedenih polimera i optimiranjem njihovog omjera može optimirati i profil oslobađanja uklopljene djelatne tvari. U slučaju termoosjetljivog hidrogela kitozana i glicerofosfata kao injektirajućeg implantata s produljenim oslobađanjem/djelovanjem uklopljenog lijeka, dodatak PVA rezultirao je višestrukom koristi. Dodatkom PVA povećana je hidrofilnost površine hidrogela i, posljedično, inhibicija vezanja stanica za hidrogel, što je umanjilo infiltraciju hidrogela stanicama vezivnog tkiva. Također, dodatak PVA rezultirao je puno bržim nastankom gela, i mnogo kompaktnijom mrežom polimera, što je spriječilo i bubrenje i dehidraciju gela, osiguravajući kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka (Sun i sur., 2012).

1.2. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem metoda je prevođenja raznih vodenih i organskih otopina, suspenzija i emulzija u suhi produkt (Re, 2007). Sušenje raspršivanjem prvi put se spominje 1872. godine kad je Samuel L. Percy patentirao istodobno atomiziranje i sušenje tekućina, to jest sušenje raspršivanjem (Percy, 1872). Ono se koristi najviše u prehrambenoj industriji, najpoznatije – u proizvodnji mlijeka u prahu (Cal i Sollohub, 2010). To je proces kojemu su glavne prednosti visoka kontrola nad veličinom, morfologijom te drugim fizičko-kemijskim

svojstvima dobivenih čestica, kao i relativna brzina u odnosu na, primjerice, liofilizaciju (Nižić, 2017).

Dobivanje čestica kontrolirane veličine i morfologije omogućuje dizajniranje sustava ciljanih biofarmaceutskih svojstava. Svojstva čestica mogu se optimirati mijenjanjem otapala, brzine dotoka uzorka, sapnice (kod obične sapnice se može mijenjati veličina otvora sapnice, kod ultrazvučne frekvencija ultrazvuka, a kod bifluidne brzina protoka medija za raspršivanje), brzina dotoka i temperatura medija za sušenje i duljina kolone (Singh i Van den Mooter, 2016; Cal i Sollohub, 2010). Za iskorištenje procesa, uz efikasno sušenje, bitno je što učinkovitije odvajanje čestica produkta od medija za sušenje, za što su bitni pad tlaka na ciklonu i odabir veličine ciklona (Singh i Van den Mooter, 2016).

Sušenje se provodi tako da se nakon atomizacije tekućeg uzorka u koloni za sušenje kapljice susreću sa strujom toplog medija za sušenje te se zbog velikog odnosa površine i volumena kapljice iznimno brzo suše (Singh i Van den Mooter, 2016). Ova tehnika je prikladna i za sušenje otopina/suspenzija/emulzija termolabilnih tvari, budući da je sušenje brzo, pa isparavanje otapala hladi česticu u nastajanju, tako da 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).

U farmaceutskoj tehnologiji sušenje raspršivanjem primjenjuje se s ciljem poboljšanja svojstava tečenja i kompresibilnosti pomoćnih tvari (primjer laktoze monohidrata), ali i poboljšanja topljivosti i bioraspoloživosti te optimiranja profila oslobađanja djelatnih tvari uklopljenih u polimerni matriks. Bolja topljivost djelatne tvari može biti posljedica mikronizacije i/ili amorfizacije uslijed brzog procesa sušenja. Koprecipitacija s hidrofilnim polimerom može rezultirati boljom topljivošću djelatne tvari uslijed nastajanja amorfne disperzije i/ili hidrofilnog karaktera polimera. Ako je korišteni polimer lipofilan, pripravljeni sustav može značajnije produljiti oslobađanje uklopljenog lijeka. Sušenje raspršivanjem koristi se i za pripravu inhalacijskih prašaka, s obzirom na mogućnost optimiranja aerodinamičkih svojstava čestica kroz prilagodbu formulacijskih i procesnih parametara (Sollohub i Cal, 2010).

1.3. KITOZANSKI TERAPIJSKI SUSTAVI PRIPRAVLJENI SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem često je metoda izbora u pripravi mikročestica temeljenih na kitozanu ili njegovim derivatima. Mikročestice se mogu pripremiti sušenjem raspršivanjem jednostavnih otopina kitozana, ali i složenih sustava poput jednostrukih i dvostrukih emulzija. U tim slučajevima kitozan se kombinira s drugim polimerima i/ili lipidima kako bi se poboljšala fizičko-kemijska i biofarmaceutska svojstva pripravljenih terapijskih sustava. Tablica 2 donosi primjere kitozanskih terapijskih sustava pripravljenih sušenjem raspršivanjem namijenjenih za oralnu primjenu, ali i topikalnu primjenu putem različitih sluznica kao što su nazalna, okularna, bukalna i pulmonalna. Suhi produkt u pravilu je karakteriziran s obzirom na sposobnost bubrenja i mukoadhezivnost, biokompatibilnost te profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Primjeri prikazani u Tablici 2 potvrđuju veliki potencijal kitozanskih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem za poboljšanje terapijskog učinka uklopljenih lijekova.

Tablica 2. *Primjeri terapijskih sustava temeljenih na kitozanu, pripravljenih metodom sušenja raspršivanjem*

Polimer(i)	**Djelatna tvar**	**Terapijski sustav**	**Put primjene**	**Ispitivanja**	**Zaključak**	**Literatura**
kitozan glutamat (M_r, <200 kDa; SD 75–90%); kitozan glutamat (M_r, 200–600 kDa; SD75–90%) Kitozan u obliku baze (M_r, 150 kDa; SD>85%) Hidroksipropil-metilceluloza (19–24% metoksilirana, 7–12% hidroksipropilirana, viskoznost 2% vodene otopine je 300–5,600 cPs)	zolmitriptan	mikrosfere	nazalna primjena	*In vitro* ispitivanje mukoadhezivnosti, *ex vivo* ispitivanje mukoadhezivnosti na svinjskoj nazalnoj sluznici, *in vitro* i *ex vivo* ispitivanje permeabilnosti, analiza sluznice SEM-om nakon *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti, farmakokinetička ispitivanja nakon intravenske primjene otopine zolmitriptana i nazalne primjene mikrosfera, otopine ili suspenzije sa zolmitriptanom u štakora	Svi polimeri su mukoadhezivni, ali jedino su kitozani povećavali apsorpciju zolmitriptana nakon nazalne primjene U odnosu na intravensku primjenu, nazalna primjena mikročestica sa zolmitriptanom daje 3 puta veći omjer između koncentracije lijeka u cerebrospinalnoj tekućini i lijeka u krvi, što znači da se takvom nazalnom primjenom lijeka smanjuje potencijal perifernih nuspojava.	Gavini i sur., 2013
Kitozani (M_r: <190 kDa), (M_r: 190– 310 kDa) (Mr: >310 kDa)	terbutalin sulfat	mikročestice	pulmonalna primjena	Iskorištenje uklapanja lijeka u oblik, SEM, DSC, TGA, veličina čestica, aerosolizacija, *in vitro* ispitivanje oslobađanja	Pripravljene su mikročestice odgođenog oslobađanja terbutalin sulfata; korištenjem kitozana veće M_r dobivaju se čestice ujednačenije veličine i više odgođenog oslobađanja	Learoyd i sur., 2008
Kitozan (SD 89.0%)	teofilin	mikročestice	pulmonalna primjena	SEM, određivanje aerodinamičkog promjera i raspodjele veličina čestica, difrakcija rendgenskih zraka, DSC, FT-IR, ispitivanje oslobađanja *in vitro*	S povećanjem masenog omjera kitozana i teofilina više se odgađa i produljuje oslobađanje lijeka, te se dobivaju sferičnije mikročestice.	Asada i sur., 2004

Kitozan, (SD 86% (nanočestice); TPP, laktoza, manitol (mikročestice)	inzulin	mikročestice sa uklopljenim nanočesticama	pulmonalna primjena	Određivanje iskorištenja procesa priprave nano i mikročestica, morfologije čestica SEM-om, nasipne gustoće praška; Procjena aerodinamičnosti mikročestica, *in vitro* oslobađanje nanočestica iz mikročestica, ispitivanje stabilnosti nanočestica u prisutnosti lizozima, usporedba *in vitro* oslobađanja inzulina iz nanočestica i nanočestica uklopljenih u mikročestice	Mikročestice pripravljene s laktozom znatno su higroskopnije od mikročestica pripravljenih s manitolom. U slučaju mikročestica pripravljenih s manitolom, oslobađanje inzulina iz samih nanočestica jednako je oslobađanju inzulina iz nanočestica uklopljenih u mikročestice.	Grenha i sur., 2005
Kitozan niske viskoznosti (SD ≥75%) Pluronic® F127	melatonin	mikrosfere	dermalna primjena	Veličina čestica, zeta potencijal, uspješnost uklapanja lijeka u sustav, modulirani DSC, TGA, rendgenska difrakcija, svojstva tečenja, svojstva bubrenja, gubljenje vlage isparavanjem, *in vitro* oslobađanje melatonina, antimikrobno djelovanje, *in vitro* ispitivanje biokompatibilnosti	Melatonin pojačava antimikrobno djelovanje kitozansko-poloksamerskih mikrosfera protiv pet različitih meticilin-rezistentnih sojeva bakterije *Staphylococcus aureus*. Zbog velikog kapaciteta apsorpcije tekućine i sposobnosti stvaranja hidrogela razvijene mikročestice prikladne su za tretiranje vrlo eksudativnih rana.	Romić, i sur., 2016
Kitozan hidroklorid Mr= 140±169 kDa glutaraldehid želatina etilceluloza (uljna faza)	cimetidin nistatin famotidin	mikrosfere mikrokapsule	oralna primjena	Priprava mikročestica sušenjem raspršivanjem jednostavnih sustava te emulzija tipa V/U, U/V i V/U/V; određivanje veličine čestica, zeta potencijala, uspješnosti uklapanja lijeka, *in vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka	Mikročestice pripravljene sušenjem raspršivanjem V/U/V emulzija plutajući su sustavi s odgođenim oslobađanjem, prikladni za ciljanu dostavu lijeka u želudac. Korištenjem Tween 80, glukoze ili laktoze kao sredstva za močenje mikrosfere više ne plutaju po površini i lijek se znatno brže oslobađa.	Davis i Illum, 1999

Kitozan glutamat (150 i 350 kDa) Kitozan u obliku baze (50,150 i 300 kDa) SD > 80%, za sve kitozane Eudragit S-100 Eudragit L-100 (ovojnica mikročestica)	diklofenak-natrij	obložene mikrosfere	oralna primjena	Morfologija čestica, oslobađanje uklopljenog lijeka iz mikročestica prije i poslije oblaganja Eudragit-om, FT-IR	Pripravljeni terapijski sustav karakteriziran je odgođenim i kontroliranim oslobađanjem uklopljenog lijeka; u kiselom mediju lijek se uopće ne oslobađa (zbog ovojnice građene od Eudragita), a u lužnatom mediju lijek se oslobađa jednolikom brzinom 8-12 sati. Brzina oslobađanja lijeka raste sa smanjenjem molekulske mase kitozana. Veća brzina oslobađanja postiže se u slučaju mikročestica pripravljenih iz kitozan acetata nego iz kitozan glutamata.	Lorenzo-Lamosa i sur., 1998
N,O-[N,N-dietilaminometil-(dietildimetilen amonij)$_{2,8}$] metilkitozan SD: 88,3%, Udio supstitucije: 42,7 N,O-[N,N-dietilaminometil-(dietildimetilen amonij)$_{1,6}$] metil kitozan SD: 88,6%, Udio supstitucije: 58,9% Kitozan SD: 96%	roktiamicin	mikrosfere	oftalmička i nazalna primjena	Citotoksičnost modificiranih kitozana, iskorištenje sušenja raspršivanjem, uspješnost uklapanja, veličina i morfologija čestica, *in vitro* oslobađanje lijeka iz čestica, bubrenje mikročestica, *in vitro* ispitivanje mukoadhezije	Korištenjem derivata umjesto kitozana primijećena su nešto bolja svojstva što se tiče veličine čestica i mukoadhezivnosti, što im daje prednost pri okularnoj primjeni. Utvrđena je biokompatibilnost korištenih derivata kitozana. Također, prednost navedenih derivata je njihova topljivost u vodi.	Rassu i sur., 2009

kitozan, SD 75–85%, viskoznost (1% otopina u octenoj kiselini): 200–800 cPs natrijev alginat, viskoznosti (2,0% vodena otopina pri 25°C): 14,000 cPs	klorheksidin	Kitozanske mikročestice dobivene sušenjem raspršivanjem uklopljene u alginatne bukalne tablete	bukalna	SEM čestica, veličina čestica, DSC, količina lijeka u česticama, usporedba minimalne inhibitorne koncentracije mikročestica sa klorheksidinom i otopine klorheksidina, *in vitro* oslobađanje lijeka iz tableta, *in vivo* oslobađanje lijeka u usnoj šupljini, provedeno na zdravim dobrovoljcima	Primjenom alginatnih bukalnih tableta sa uklopljenim kitozanskim mikročesticama s klorheksidinom omogućena je jednostavna primjena klorheksidina te dugotrajniji i jači učinak u odnosu na vodice za ispiranje usne šupljine sa klorheksidinom.	Giunchedi i sur., 2002

Korištene kratice: SD-stupanj deacetilacije, PEG-polietilen glikol, TGA-termogravimetrijska analiza, DSC-diferencijalna pretražna kalorimetrija, M_r-molekulska masa, SEM-skenirajuća elektronska mikroskopija, HPLC-*High Preformance Liquid Chromatography*-tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; FT-IR-infracrvena spektrofotometrija sa Fourierovom transformacijom, TPP-tripolifosfat.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kitozan je hidrofilan, biokompatibilan i biorazgradljiv polimer koji se u zadnjih 20 godina uvelike istražuje kao polimer izbora u pripravi inovativnih terapijskih sustava. Svojstva poput mukoadhezivnosti i reverzibilnog otvaranja međustaničnih čvrstih veza (Yeh i sur., 2011) čine ga funkcionalnim ekscipijensom za oralnu primjenu lijekova (Lin i sur., 2007), ali i za topikalnu primjenu lijekova putem nazalne, pulmonalne, bukalne i okularne sluznice (Bernkop-Schnürch i Dünnhaupt, 2012; Rossi i sur., 2012). Hemostatski (Malette i sur., 1983) i antimikrobni učinak (Rodriguez, i sur., 2003; Roller i Covill, 1999; Tsai i Su, 1999) proširuju njegovu upotrebu u pripravi terapijskih sustava i medicinskih proizvoda, posebice suvremenih obloga za rane.

Sušenje raspršivanjem predstavlja metodu izbora u izradi praškastih terapijskih sustava temeljenih na kitozanu i njegovim derivatima. U farmaceutskoj tehnologiji sušenje raspršivanjem primjenjuje se s ciljem poboljšanja svojstava tečenja i kompresibilnosti farmaceutskih prašaka, ali i poboljšanja topljivosti i bioraspoloživosti te optimiranja profila oslobađanja djelatnih tvari uklopljenih u polimerni matriks (Sollohub i Cal, 2010). Sustavni pristup razvoju kitozanskih mikročestica metodom sušenja raspršivanjem uključuje preliminarnu fazu istraživanja u kojoj je potrebno provesti sveobuhvatnu karakterizaciju ishodnih polimera te polimernih mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem, a s ciljem procjene kritičnih procesnih parametara u pripravi suhog produkta.

Cilj ovog rada bio je je odrediti fizičko-kemijska svojstva triju kitozana različite molekulske mase kao ishodnih polimera, te polimernih mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem, koja će poslužiti kao temelj za optimiranje procesa sušenja i usmjereni razvoj kitozanskih mikročestica kao nosača lijekova. Uz kitozane, karakteriziran je i PVA kao polimer koji se u novije vrijeme kombinira s kitozanom u izradi terapijskih sustava s ciljem optimiranja njihovih biofarmaceutskih svojstava (Morgado i sur., 2017; Fan i sur., 2016; Majd i sur., 2016; de Souza Costa-Júniori sur., 2008), a koristi se i kao emulgator u složenim (emulzijskim) sustavima.

Fizičko-kemijska karakterizacija polimera i/ili polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem jednostavnih otopina polimera uključivala je metode poput diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), termogravimetrijske analize (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA), dinamičke sorpcije vlage (engl. *dynamic vapour soprtion*, DVS) i pretražne elektronske mikroskopije (engl.

scanning electron microscopy, SEM). Prikladnost procesnih parametara preliminarnog sušenja procijenjena je temeljem iskorištenja procesa, veličine i morfologije mikročestica te sadržaja ostatne vlage u suhom produktu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U ovom radu korištena su tri tipa kitozana: kitozan male molekulske mase (Mr 50,000-190,000 Da; stupanj deacetilacije ≥ 75%; viskoznost 1%-tne otopine u 1% octenoj kiselini pri 25°C 20-300 cP s; Lot#BCBJ1722V; Sigma-Aldrich, SAD), srednje molekulske mase (stupanj deacetilacije-75%, viskoznost 1% otopine u 1% octenoj kiselini 200-800 cP s; LOT#STBF3507V; Aldrich Chemistry, SAD) i velike molekulske mase (M_r - oko 600 000 Da; LOT: 364953/1; Fluka Chemie, Švicarska), te polivinilni alkohol PVA 8-88 (viskoznost 4% otopine u vodi 8,2 mPa s; Lot k44705551; MERCK, Njemačka).

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA MIKROČESTICA

Pripravljene su otopine kitozana male i srednje molekulske mase u 0,5%-tnoj octenoj kiselini pri koncentraciji od 1% (*m*/*m*), uz miješanje na magnetskoj miješalici preko noći. Istim postupkom je pripravljena 0,5% (*m/m*) otopina kitozana velike molekulske mase. Pripravljena je i 2,0% (*m*/*m*) otopina PVA 8-88 u pročišćenoj vodi, također uz miješanje na magnetskoj miješalici preko noći.

Otopine polimera su sušene raspršivanjem na uređaju ProCepT 4M8-TriX (ProCepT, Zelzate, Belgija), u Plivi Hrvatska d.o.o. Za raspršivanje uzoraka korištena je ultrazvučna sapnica pri snazi od 97%, frekvencije 24,25 kHz. Korištena je standardna konusna kolona za sušenje. Kao medij za sušenje korišten je vrući zrak. Odjeljivanje suhog produkta provedeno je korištenjem ciklona srednje veličine pri padu tlaka od 20-24 mbar. Sušenje raspršivanjem vođeno je pri brzini protoka vrućeg zraka od 0,25m^3/min, radu peristaltičke pumpe od 20%, te temperaturi ulaznog zraka od 150°C. Tijekom procesa sušenja raspršivanjem praćene su temperatura zraka na izlazu iz kolone za sušenje i temperatura zraka na izlazu iz ciklona.

3.2.2. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Iskorištenje procesa (I) određeno je prema dolje navedenoj formuli:

$$I \equiv \frac{masa\ dobivenog\ produkta(g)}{masa\ suhe\ tvari\ u\ otopini\ za\ sušenje(g)} \times 100\%$$

Masa suhe tvari u otopini za sušenje izračunata je iz koncentracije sušene otopine i sušenog volumena, dok je za pri određivanju mase dobivenog produkta uzet isključivo produkt koji je na kraju sušenja bio prisutan u prihvatnoj posudi.

3.2.3. ODREĐIVANJE VELIČINE MIKROČESTICA

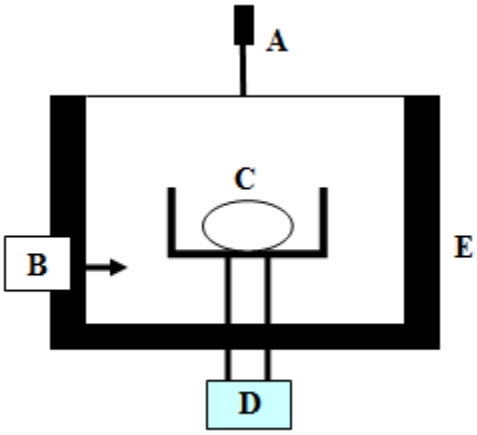
Veličina čestica određena je korištenjem mikroskopa Olympus BH-2 opremljenog CCD kamerom (ICD-42-E, Ikegami Tsushiki Co., Japan) te računalnom analizom mikroskopskih slika programom Optomax V, Cambridge, Velika Britanija.

Uzorci su naneseni špatulom na predmetno stakalce u najtanjem mogućem sloju, te je veličina čestica mjerena pod objektivom uvećanja 20 ×. Za karakterizaciju svakog od uzoraka izmjereno je najmanje 1500 čestica. Sva mjerenja rađena su u duplikatu.

3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA

Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama određen je termogravimetrijskom metodom korištenjem uređaja TGA Q5000 (TA Instruments, New Castle, DE, SAD) u Plivi Hrvatska d.o.o., a podaci su obrađeni sustavom TA Instruments Universal analysis 2000, verzija 4.5A. Termogravimetrijska analiza temelji se na praćenju promjene mase čvrstog uzorka u ovisnosti o temperaturi ili vremenu pri izlaganju uzorka promjeni temperature u kontroliranim uvjetima. Opći izgled uređaja za termogravimetrijsku analizu može se vidjeti na slici 2. Pri termogravimetrijskoj analizi, zagrijavanje se provodi u inertnom mediju kao što je dušik, jer bi u prisustvu zraka (to jest kisika) pri višim temperaturama došlo do oksidacije (gorenja) uzorka. Navedenim postupkom može se kvantificirati gubitak vode (vlage), otapala i plastifikatora, dekarbosilacija, piroliza, oksidacija, raspad uzorka, težinski udio punila i težinski udio pepela (FAQ_Beginners-Guide-to-Thermogravimetric-Analysis).

Uzorci mase 4,5-11 mg vagani su u platinaste posudice koje su pomoću automatskog uređaja postavljene u peć s analitičkom vagom (Slika 2.). Uzorci su zagrijavani brzinom od 10°C od sobne temperature do 500°C u struji inertnog plina - dušika. Iz zabilježene promjene mase u ovisnosti o temperaturi dobiven je termogram temeljem kojeg je određen sadržaj vode u svakom od ispitanih uzoraka.



Slika 2. *Dijelovi uređaja za termogravimetrijsku analizu: A-termočlanak, B-kontrolirana atmosfera (najčešće dušik), C-uzorak, D-analitička vaga, E-peć (prilagođeno prema www.nptel.ac.in)*

3.2.5. KARAKTERIZACIJA ČVRSTOG STANJA MODULIRANOM DIFERENCIJALNOM PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM

Analiza uzoraka provedena je na uređaju TA Instrument modulated DSC Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, SAD) u Plivi Hrvatska d.o.o., s ciljem određivanja temperatura prijelaznih stanja kao što su taljenje, kristalizacija i staklište. DSC mjeri promjenu toplinskog kapaciteta tvari u ovisnosti o zagrijavanju te tvari. Postoje dva načina rada uređaja, diferencijalna pretražna kalorimetrija s toplinskim tokom (engl. *heat flux DSC*) i kompenzacijska diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *power compesation DSC*), a oba uključuju referentnu posudu sa referentnim materijalom poznatog toplinskog kapaciteta koji se ne mijenja pri temperaturama kojima se izlaže ispitivani uzorak. U prvom slučaju, uzorak i referentna posuda griju se preko istog grijača, a uređaj određuje mijenja li se temperatura ispitivanog uzorka brže ili sporije u odnosu na referentni uzorak. U drugom slučaju, ispitivani i referentni uzorak imaju različite grijače, pa uređaj prati koliko više ili manje energije mora trošiti da bi održao jednaki porast temperature ispitivanog i referentnog uzorka. Modulirana

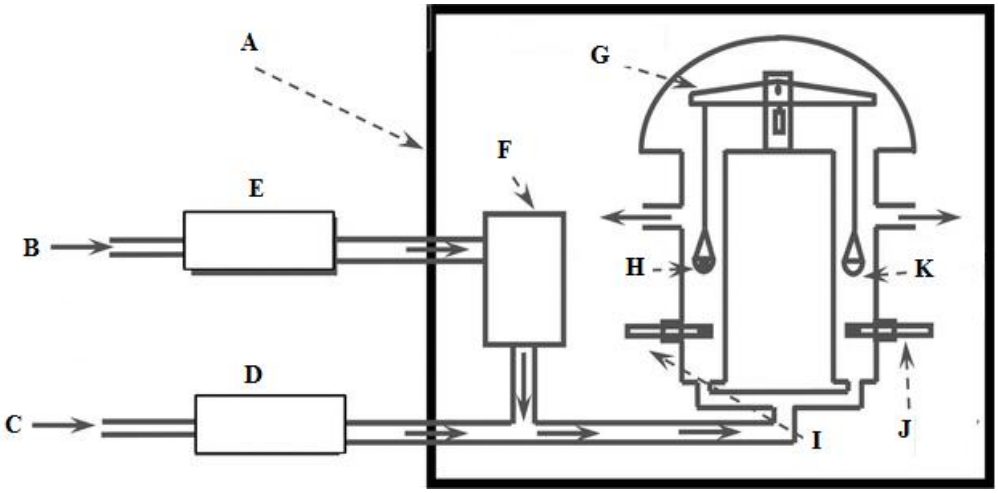
DSC je jednostavna modifikacija metode gdje se uzorak ne zagrijava konstantnim prirastom temperature, već sinusoidalno. Takvim zagrijavanjem dobiva se mnogo precizniji i osjetljiviji analitički signal, kao i bolje razdvajanje bliskih signala u odnosu na konvencionalni DSC (Verdonck i sur., 1999).

Uzorci mase 2,1-4,5 mg vagani su u posudicama za zagrijavanje. Uzorci PVA 8-88 zagrijavani su u hermetički zatvorenim posudicama, dok su uzorci kitozana zagrijavani u posudicama s probušenim poklopcem, kako bi vlaga, koja je bila prisutna u velikim količinama, mogla izaći tijekom mjerenja. Uzorci PVA 8-88 bili su ekvilibrirani pri temperaturi od -20°C te zagrijavani brzinom od 5°C/min uz modulaciju od ±2°C/min do temperature od 250°C. Uzorci kitozana bili su ekvilibrirani pri temperaturi od 0°C te zagrijavani brzinom od 5°C/min uz modulaciju od ±2°C/min do temperature od 250°C.

3.2.6.KARAKTERIZACIJA POLIMERA DINAMIČKOM SORPCIJOM VLAGE

Ishodni polimeri karakterizirani su i metodom dinamičke sorpcije vlage (engl. *dynamic vapour sorption*, DVS) korištenjem uređaja DVS Intrinsic (Surface Measurement Systems, London, Velika Britanija) dostupnog u Plivi Hrvatska d.o.o. Shematski prikaz uređaja dan je na Slici 3. Radi se o gravimetrijskoj tehnici kojom se određuje količina adsorbirane/apsorbirane vlage u ovisnosti o količini vodene pare u zraku koji okružuje uzorak. Navedena tehnika omogućuje određivanje higroskopnosti prašaka, vlakana i krutina, te kinetike sorpcije i desorpcije, promjene u morfologiji čestica uslijed sorpcije vode, pomaže u određivanju roka trajanja hrane, može poslužiti u određivanju transepidermalnog gubitka vode, u modeliranju sorpcije i u određivanju ponašanja uzorka pri vlažnim uvjetima (Thomas, 2017).

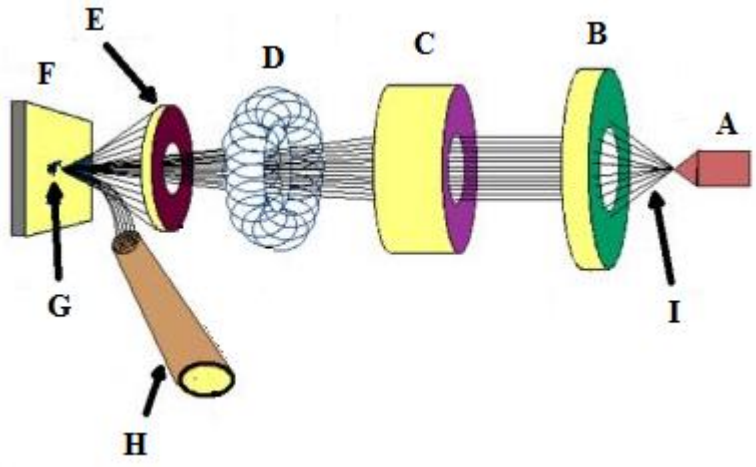
Uzorci su ekvilibrirani pri 0% relativne vlažnosti, što je kod uzoraka PVA 8-88 trajalo 37 minuta, a za uzorke kitozana 180 minuta, te je zatim zabilježena njihova masa. Ciklusi promjene relativne vlažnosti zraka u komori pri temperaturi od 25°C tekli su od 0% - 95% - 0%, u koracima od 10 % svakih 180 minuta (izuzev promjene relativne vlažnosti zraka od 90% na 95%, u koraku od 5%). Adsorbirana/apsorbirana vlaga izražena je kao postotak mase osušenog uzorka za svaki korak promjene relativne vlažnosti zraka.



Slika 3. *Shematski prikaz DVS uređaja: A-inkubator sa kontroliranom temperaturom, B i C-ulaz suhog zraka, E i D-pumpe za zrak, F- ovlaživač zraka, G-precizna vaga, H-uzorak, I i J-probe za temperaturu i vlagu, K-referenca (prilagođeno prema Sheokand i sur., 2014).*

3.2.7. ODREĐIVANJE MORFOLOGIJE ČESTICA

Morfologija polimernih mikročestica ispitana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *scanning electron microscopy*) korištenjem uređaja Vega 3 SEM, TESCAN, Republika Češka, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Shematski prikaz pretražnog elektronskog mikroskopa dan je na Slici 4.



Slika 4. *Dijelovi pretražnog elektronskog mikroskopa: A-izvor elektrona, B-anoda, C i D-magnetska leća, E-detektor odbijenih elektrona, F-podloga uzorka, G-uzorak, H- sekundarni detektor, I-snop elektrona, informacije iz D, E i H računalnom obradom daju sliku (prilagođeno prema www.testandmeasurementtips.com)*

Uzorak je nanesen na vodljivu vrpcu i fiksiran na metalni nosač te stavljen u komoru naparivača (eng. *sputter coater*) Quorum SC7620 u atmosferu inertnog plina argona. Kako bi se mjerenje moglo provesti komora mora biti pod tlakom manjim od 10^{-2} mbar što se osigurava radom rotacijske pumpe. Omotač komore, koji funkcionira kao katoda, napravljen je od platine i rodija. Pod visokim naponom (800-1200 V) električno polje ionizira argon te ioni argona udaraju u katodu pritom izbijajući atome platine i rodija koji potom oblažu promatran uzorak. Tako obložen uzorak postaje vodljiv i spreman za analizu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPRAVA POLIMERNIH MIKROČESTICA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Polimerne mikročestice pripravljene su sušenjem raspršivanjem otopina polimera korištenjem ProCepT uređaja opremljenog ultrazvučnom sapnicom, standardnom konusnom kolonom za sušenje i ciklonom srednje veličine. U načelu, ultrazvučnom sapnicom mogu se generirati čestice veličine od 10 do 100 μm. S obzirom da je jačina rada generatora ultrazvuka postavljena na 97%, očekivana je priprava mikročestica relativno malog promjera. Odabir veličine ciklona proveden je prema očekivanoj veličini mikročestica. Naime, ciklon srednje veličine može učinkovito separirati čestice veće od 3 μm (4M8-TriX: installation and operation manual).

Tablica 3. *Koncentracije otopina polimera podvrgnutih sušenju i rasponi temperatura na izlazu iz kolone za sušenje (1) i na ulazu u ciklon (2) tijekom procesa sušenja raspršivanjem*

Vrsta polimera	Kitozan male Mr	Kitozan srednje Mr	Kitozan velike Mr	PVA 8-88
Koncentracija otopine (%, *m*/*m*)	1	1	0,5	2
Raspon temperatura 1 (°C)	91,4 - 99,6	98,3 - 104,0	101,7 - 111,0	81,1 - 90,4
Raspon temperatura 2 (°C)	70,8 - 74,5	73,0 - 77,2	78,4 - 82,2	59,6 - 73,6

Kao što se vidi u tablici 3., s porastom molekulske mase kitozana rasla je i temperatura zraka na izlazu iz kolone za sušenje te na ulazu u ciklon. Navedeno zapažanje moglo bi se objasniti razlikom u viskoznosti pripravljenih otopina. Naime, s porastom molekulske mase polimera raste i viskoznost pripravljenih otopina, a pri istoj postavci peristaltičke pumpe, protok viskoznijih otopina je sporiji. Valja napomenuti da su kitozan male i srednje molekulske mase otopljeni pri istoj koncentraciji (1%, *m*/*m*), dok je kitozan velike molekulske mase otopljen pri koncentraciji od 0,5%, *m*/*m*. Viskoznost 1%-tne otopine kitozana velike molekulske mase bila je prevelika da bi se tako pripravljena otopina mogla podvrgnuti sušenju raspršivanjem.

4.2. ISKORIŠTENJE SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem otopina ispitivanih polimera korištenjem ultrazvučne sapnice za raspršivanje uzorka, standardne kolone za sušenje i ciklona srednje veličine rezultiralo je iskorištenjima procesa prikazanim u Tablici 4.

***Tablica 4**. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem polimernih otopina*

Vrsta polimera	Kitozan male Mr	Kitozan srednje Mr	Kitozan velike Mr	PVA 8-88
Koncentracija polimerne otopine (%, *m*/*m*)	1	1	0,5	2
Masa otopine	90,0	73,0	159,3	77,0
Masa suhe tvari u otopini (g)	0,90	0,73	0,80	1,54
Masa dobivenog osušenog produkta (g)	0,704	0,620	0,570	0,448
Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem (%)	78,22	84,93	71,56	29,09

Pad tlaka na ciklonu tijekom sušenja raspršivanjem (20 - 22 mbar) odgovarao je veličini/geometriji ciklona, te se može pretpostaviti da je rezultirao učinkovitom separacijom suhog produkta iz struje medija za sušenje. U usporedbi s literaturnim izvorima (Romić i sur., 2016; Huang, i sur., 2002), iskorištenja sušenja raspršivanjem kitozanskih otopina bila su relativno velika za korištenu metodu (78,2 - 84,9%), te također značajno veća od iskorištenja sušenja raspršivanjem otopine PVA 8-88 (29,1%). Pretpostavka je da je dotok otopine PVA 8-88 bio brži od dotoka otopina kitozana, te da su u procesu atomizacije većeg volumena u jedinici vremena istom snagom raspršivanja, generirane veće čestice. Nedostatno sušenje najvećih čestica u svim uzorcima, rezultiralo je formiranjem filma polimera preko temperaturne sonde na izlazu iz kolone za sušenje i u cijevi koja spaja kolonu za sušenje sa ciklonom (T-transportna cijev). Navedeno formiranje filma izraženije je za uzorak PVA 8-88, te može poslužiti kao jedno od objašnjenja za relativno malo iskorištenje procesa sušenja

otopine PVA 8-88. Slična zapažanja zabilježena su i prilikom sušenja raspršivanjem otopina alginata i PVA 18-88 korištenjem istog uređaja u istoj konfiguraciji (Mišić, 2017).

Pri optimiranju procesa sušenja raspršivanjem navedenih polimernih otopina u idućoj fazi razvoja, potrebno je razmotriti mogućnosti: (i) povećanja temperature ulaznog zraka, (ii) produljenja kolone sušenja, (iii) učinkovitijeg raspršivanja uzoraka, ali i (iv) sniženja relativne vlažnosti te (v) smanjenja brzine protoka medija za sušenje i/ili dotoka uzorka (4M8-TriX: installation and operation manual).

4.3. VELIČINA POLIMERNIH MIKROČESTICA

Srednji promjer polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem prikazan je u Tablici 5. Srednji promjer kitozanskih mikročestica kretao se u rasponu od 6,6 ± 2,4 do 9,5 ± 3,6 μm. Nije uočena jasna korelacija s molekulskom masom korištenih kitozana, što se može objasniti razlikom u koncentraciji raspršivanih sustava (Tablica 3). Mikročestice PVA 8-88 karakterizirane su najvećom veličinom čestica (11,7 ± 4,1 μm), što odgovara činjenici da je otopina PVA pripravljena u većoj koncentraciji (2%, *m*/*m*) u odnosu na ostale polimere (0,5 ili 1%, *m*/*m*; Tablica 3). Naime, raspršivanjem otopine veće koncentracije polimera, više je polimera unutar istog volumena raspršene kapljice, te su posljedično čestice veće (He, 1999).

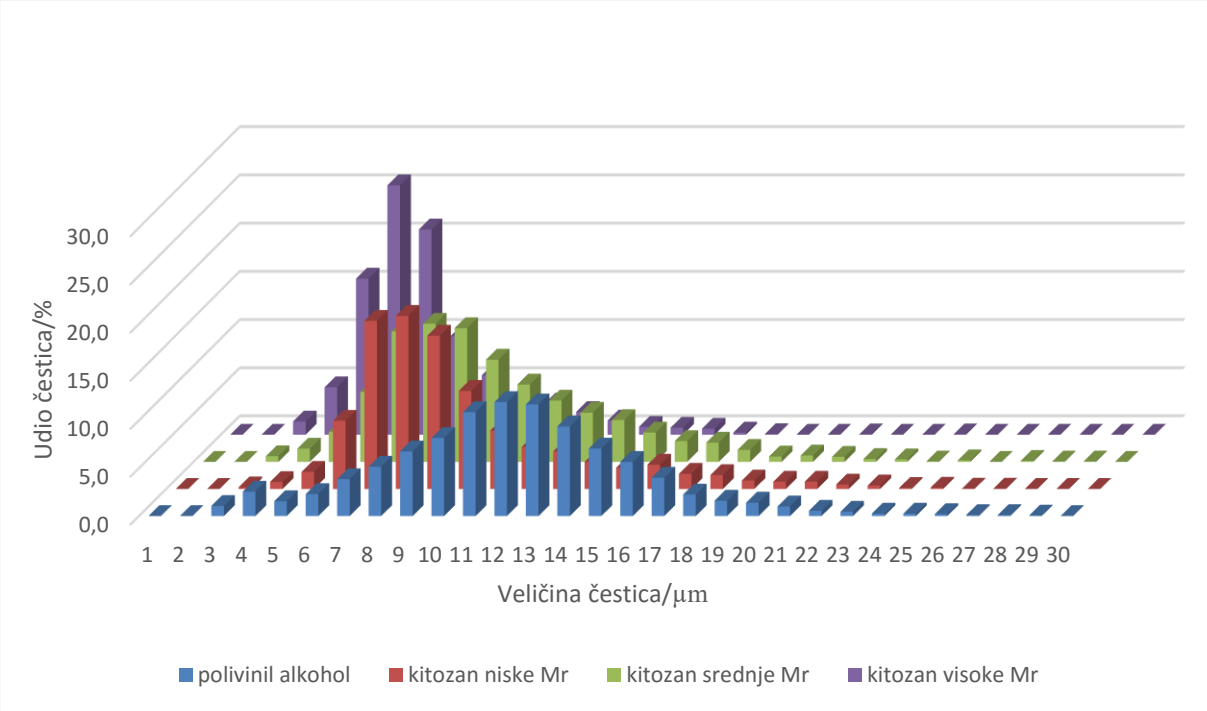
Tablica 5. *Srednji promjer polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Vrsta polimera	PVA 8-88	Kitozan male Mr	Kitozan srednje Mr	Kitozan velike Mr
Srednji promjer mikročestica (μm)	11,7 ± 4,1	9,3 ± 3,6	9,5 ± 3,6	6,6 ± 2,4

U ovom radu korištena je ultrazvučna sapnica za raspršivanje polimernih otopina. Sukladno očekivanjima, pripravljene mikročestice bile su većeg promjera od odgovarajućih mikročestica u čijoj je pripravi za raspršivanje polimernih otopina korištena bifluidna sapnica. Primjerice, u radu Filipović-Grčić i suradnika (2003) otopine kitozana male, srednje i velike molekulske mase pripravljene su u koncentraciji od 1%, *m*/*V*, te su pomiješane s etanolnom otopinom karbamazepina (u koncentraciji od 0,1, 0,2, 0,3 i 0,5% *m*/*V*) pri volumnom omjeru od 1,5:1. Sušenje raspršivanjem pri protoku uzorka od 0.25 l/h, protoku komprimiranog zraka

od 700 Nl/h, temperaturi ulaznog zraka od 120ºC i temperaturi izlaznog zraka od 75ºC, uz primjenu bifluidne sapnice rezultiralo je mikročesticama srednjeg promjera od 2,43 do 2,77 μm (Filipović-Grčić i sur., 2003). Slično tome, sušenje raspršivanjem 1%-tne otopine kitozana male molekulske mase pomiješane s etanolnom otopinom loratadina (1 i 0,75%, *m*/*V*) u volumnom omjeru 6:1 rezultiralo je mikročesticama veličine 3,23 i 3,24 μm (Martinac i sur., 2005). Iz prikazanih rezultata očita je važnost odabira prikladne sapnice za raspršivanje uzorka, uz podešavanje formulacijskih i procesnih parametara, kako bi se pripravile mikročestice željenih svojstava. Primjerice, veličina čestica od 10 μm (i više) ciljna je u slučaju razvoja mikročestica za nazalnu primjenu, dok su čestice veličine 1-5 μm prikladne za pulmonalnu primjenu.

Raspodjela veličina polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem prikazana je na Slici 5.



Slika 5. *Raspodjela veličina polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Najširom raspodjelom veličina karakterizirane su mikročestice pripravljene od PVA 8-88, dok su mikročestice pripravljene od kitozana velike molekulske mase najuže raspodjele veličine čestica. Uočene raspodjele posljedica su uzorka raspršivanja i kinetike sušenja polimernih otopina, koji pak ovise o svojstvima samih polimera te koncentraciji i viskoznosti polimernih otopina.

4.4. SADRŽAJ VLAGE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA

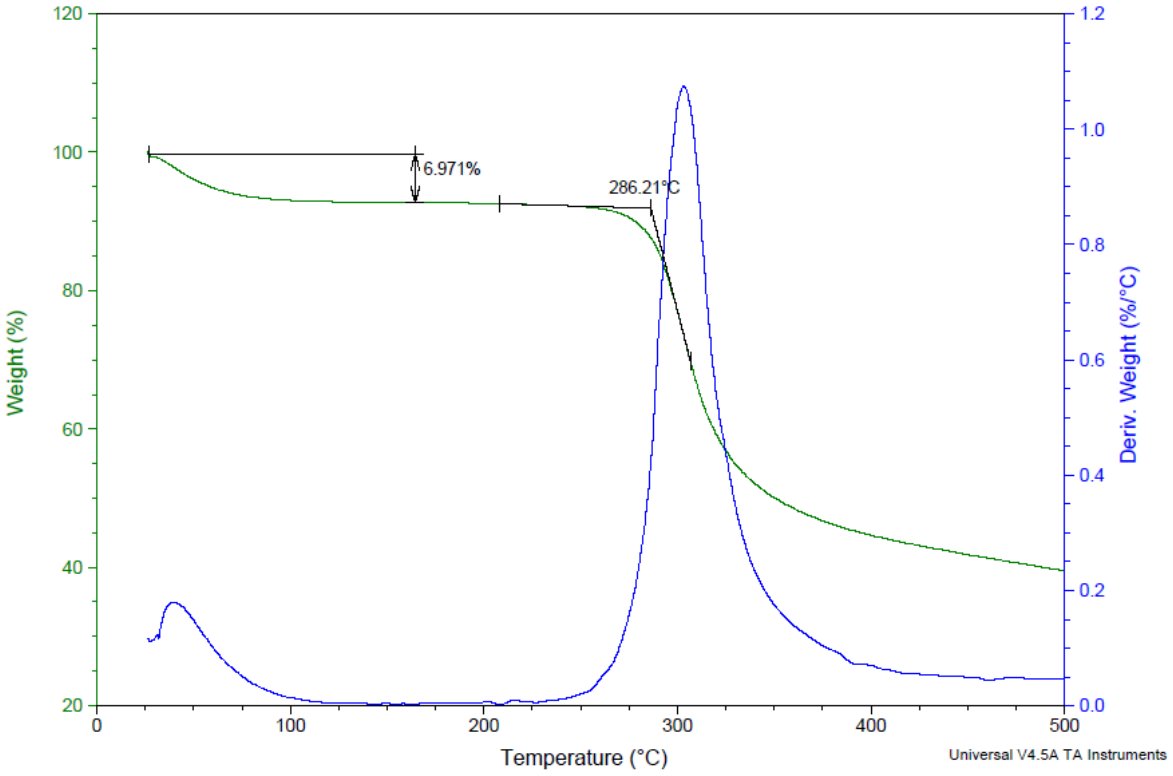
Sadržaj vlage može imati značajan utjecaj na razna kemijska i fizička svojstva farmaceutskih prašaka, primjerice, na kemijsku razgradnju, brzinu otapanja, svojstva tečenja i kompresibilnost (Nižić, 2017). Veliki sadržaj ostatne vlage u produktu sušenja raspršivanjem može značiti nedovoljno dobro podešene parametre sušenja, ali treba imati na umu da vlaga u produktu može biti i posljedica sorpcije atmosferske vlage na higroskopan suhi produkt nakon procesa sušenja raspršivanjem.

Tablica 6. *Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama pripravljenim metodom sušenja raspršivanjem*

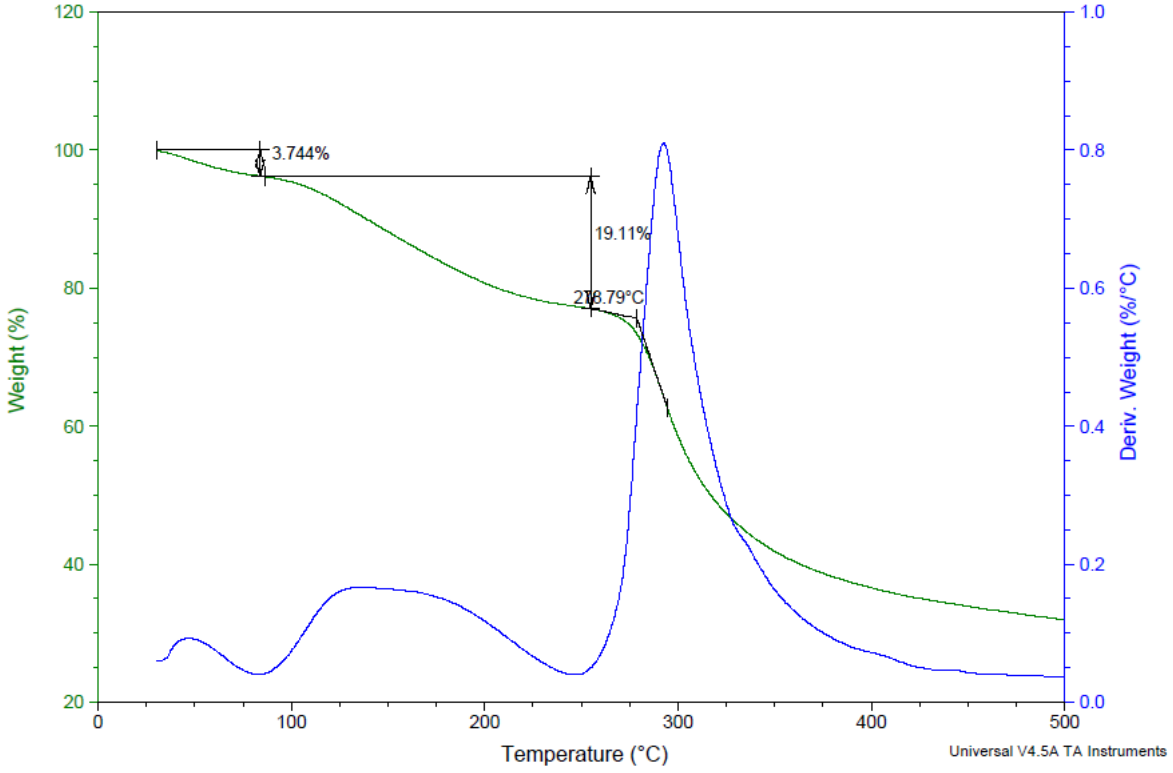
Vrsta polimera	Kitozan male M_r	Kitozan srednje M_r	Kitozan velike M_r	PVA 8-88
Sadržaj vlage u ishodnom polimeru (%)	6,97	6,97	9,04	3,29
Sadržaj vlage u mikročesticama (%)	3,74	6,06	4,10	1,38

Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama pripravljenim sušenjem raspršivanjem određen je termogravimetrijski. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 6. Vidljivo je da je sadržaj vlage u mikročesticama pripravljenim sušenjem raspršivanjem bio niži od sadržaja vlage u ishodnim polimerima, za sve ispitivane polimere. Dijelom je to rezultat kondicioniranja zraka korištenog tokom sušenja (relativna vlažnost 3,7-5,4%) kao i kondicioniranja zraka u prostoriji u kojoj su suhi produkti sakupljani (relativna vlažnost zraka od 15 do 20% pri temperaturi 20-22°C), zahvaljujući ćemu nisu bili izloženi velikoj količini vlage, što je bitno uzevši da su izrazito higroskopni.

Termogrami za sva tri kitozana bili su sličnog profila i u skladu su s literaturnim podacima (Pereira i sur., 2012). Slika 6. i 7. redom prikazuju termogram kitozana male molekulske mase prije sušenja raspršivanjem i termogram mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem otopine navedenog polimera.



Slika 6. *Termogram kitozana male molekulske mase prije sušenja raspršivanjem*



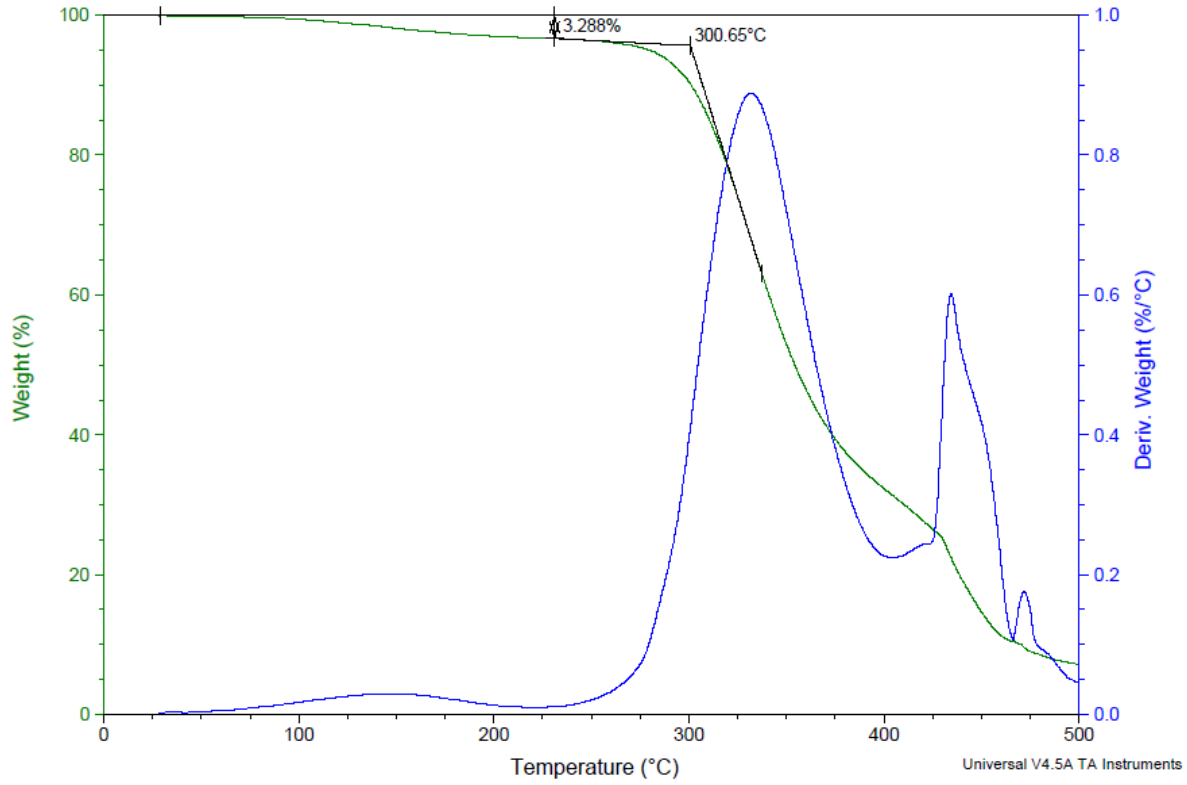
Slika 7. *Termogram mikročestica kitozana male molekulske mase pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Jedna od razlika između termograma kitozana male molekulske mase prije i poslije sušenja raspršivanjem je u broju infleksija. Naime, na termogramu ishodnog polimera - kitozana male molekulske mase, vidljiv je gubitak mase uslijed isparavanja vode (6,97%), te, pri višim temperaturama, gubitak mase uslijed termičke razgradnje polimera. Istodobno, termogram mikročestica kitozana pripravljenih sušenjem raspršivanjem, osim gubitka mase uslijed isparavanja vode (3,74%), prikazuje i gubitak mase uslijed isparavanja octene kiseline (19,11%) koja je korištena za pripravu otopine kitozana. Temperatura vrelišta octene kiseline je 117,9°C, te je temperatura sušenja bila preniska za njeno uklanjanje tijekom sušenja raspršivanjem. Prisustvo octene kiseline u otopini kitozana i suhom produktu valja uzeti u obzir, jer pri višim temperaturama (>120°C) može nastupiti acetilacija deacetiliranih amino skupina i promjena ukupnog naboja korištenog kitozana (Romić i sur., 2016).

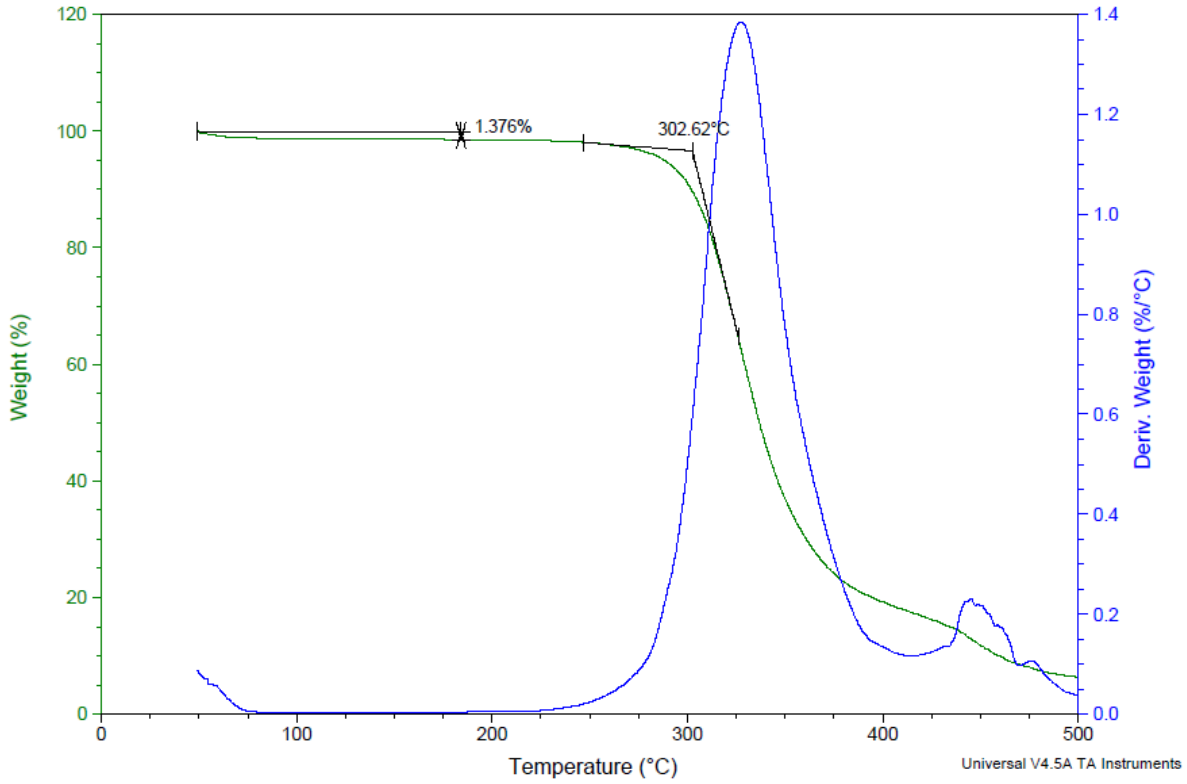
Alhalaweh i suradnici (2009) su, zagrijavajući mikročestice kitozana dobivene sušenjem raspršivanjem pri sličnim uvjetima kao i u ovom radu, uz brzinu zagrijavanja od 10°C/min u struji dušika, u rasponu temperatura od 25 do 350°C, i uzimajući gubitak mase do 120°C kao postotak vlage u produktu, procijenili udio vlage u mikročesticama od oko 9,8%. Moguće je da je količina vlage u navedenom produktu precijenjena, odnosno da je u količinu vlage ubrojen i dio octene kiseline, koja je korištena pri otapanju kitozana.

Sadržaj vlage određen u kitozanskim mikročesticama u ovom radu, usporediv je s literaturnim navodima. Romić i suradnici (2016), sušeći otopinu kitozana male viskoznosti u 0,5% octenoj kiselini (4,0 i 8,0 g/l) pomiješanu s etanolnom otopinom melatonina (maseni omjer kitozana i melatonina iznosio je 2/1 i 5/1), pri brzini zraka 700 Nl/h, temperaturi ulaznog zraka 145 ili 175°C, i dotoku uzorka 2,59 ili 7,69 ml/min, dobili su mikročestice sa sadržajem ostatne vlage od 3,7-6,7%.

Lusina Kregar (2016), koristeći bifluidnu sapnicu sušila je raspršivanjem 1,6% otopinu kitozana male ili srednje molekulske mase u 0,5% (*V*/*V*) octenoj kiselini pomiješanu u omjeru 4:1 s 1,2% otopinom mupirocina u metanolu, s postavkama procesnih parametara kao što slijedi: aspirator 100%, pumpa 20%, brzina protoka komprimiranog dušika 414 Nl/h, ulazna temperatura 130°C, izlazna temperatura 73-80°C. Pripravljene mikročestice sadržavale su 7,4 -7,9% vlage.



Slika 8. *Termogram polimera PVA 8-88 prije sušenja raspršivanjem*



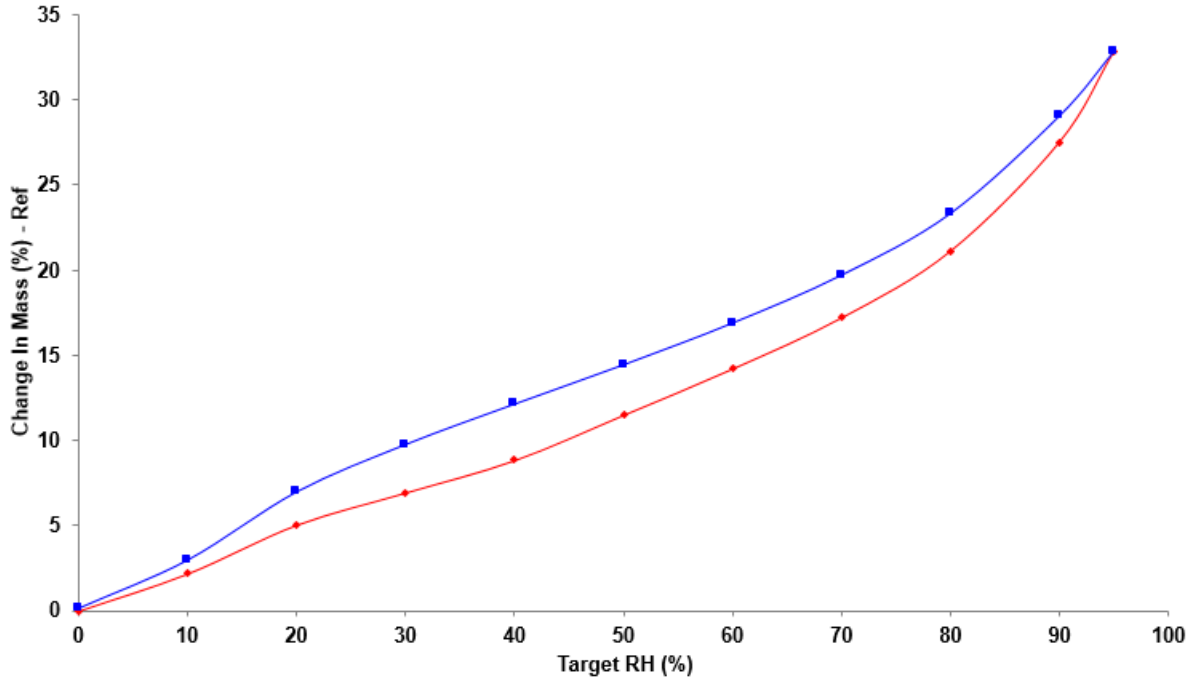
Slika 9*. Termogram mikročestica PVA 8-88 pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Slika 8. i 9. redom prikazuju termogram PVA 8-88 prije sušenja raspršivanjem i termogram mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 8-88. Navedeni termogrami u skladu su s literaturnim podacima (Mišić, 2017; Gilman i sur., 1995). Termogrami ispitivanih uzoraka prikazuju dva gubitka mase, prvi odgovara gubitku vlage, a drugi, pri temperaturi od 300-302 ºC, termičkoj razgradnji uzorka. Sadržaj vlage u uzorcima PVA manji je od sadržaja vlage u kitozanskim uzorcima (Tablica 6), što ukazuje na manju higroskopnost PVA u odnosu na kitozan.

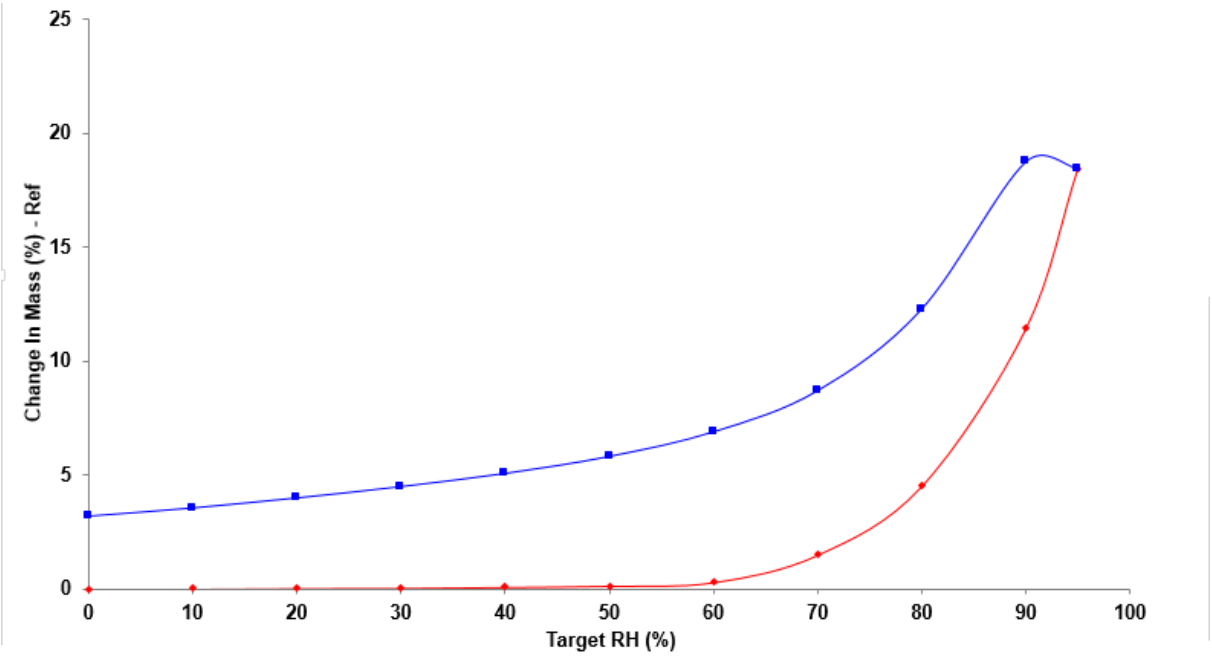
4.5. DINAMIČKA SORPCIJA VLAGE NA ISHODNE POLIMERE

Sorpcija vlage na farmaceutske praške (pomoćne tvari, gotove ljekovite oblike) predstavlja jedan od kritičnih faktora po pitanju njihove stabilnosti, procesibilnosti i/ili mogućnosti primjene (Agrawal i sur., 2004). Polimeri, kao izrazito zastupljene pomoćne tvari u oblikovanju lijekova, mogu doći u kontakt s vlagom prilikom izrade ljekovitih oblika, skladištenja i primjene. Voda može djelovati kao plastifikator u polimernom matriksu, ili može ostvariti suprotan učinak stvaranjem stabilnih mostova posredstvom vodikovih veza. Stoga je interakcija vode s praškastim polimernim sustavima važan vid karakterizacije pri oblikovanju i procjeni svojstava/izvedbenih značajki ljekovitog oblika (Agrawal i sur., 2004).

Dinamička sorpcija vlage je osjetljiva, točna i relativno brza gravimetrijska tehnika kojom se određuje količina i kinetika sorpcije vlage na krutinu. Sorpcijske i desorpcijske izoterme opisuju ravnotežnu količinu vlage sorbiranu ili desorbiranu po jediničnoj masi ili površini krutine u ovisnosti o relativnoj vlažnosti zraka, pri konstantoj temperaturi i tlaku (Sheokand i sur., 2014).



Slika 10. *Sorpcija i desorpcija vlage na kitozan srednje molekulske mase pri 25°C; crveno-ciklus sorpcije, plavo-ciklus desorpcije*



Slika 11. *Sorpcija i desorpcija vlage na PVA 8-88 pri 25°C; crveno-ciklus sorpcije, plavo-ciklus desorpcije*

U skladu s pretpostavkama izvedenim temeljem termogravimetrijske analize, rezultati DVS analize upućuju na veću higroskopnost kitozana u odnosu na PVA. Primjerice, kitozan već pri relativnoj vlažnosti zraka od 50% sadrži preko 10% vlage, dok PVA toliku količinu

vlage sorbira tek pri relativnoj vlažnosti zraka od 90%. Navedeni rezultati objašnjavaju i odnos sadržaja vlage u mikročesticama nakon sušenja ispitivanih polimera, uzevši da nakon sličnih uvjeta sušenja PVA ima značajno manji udio vlage od kitozana.

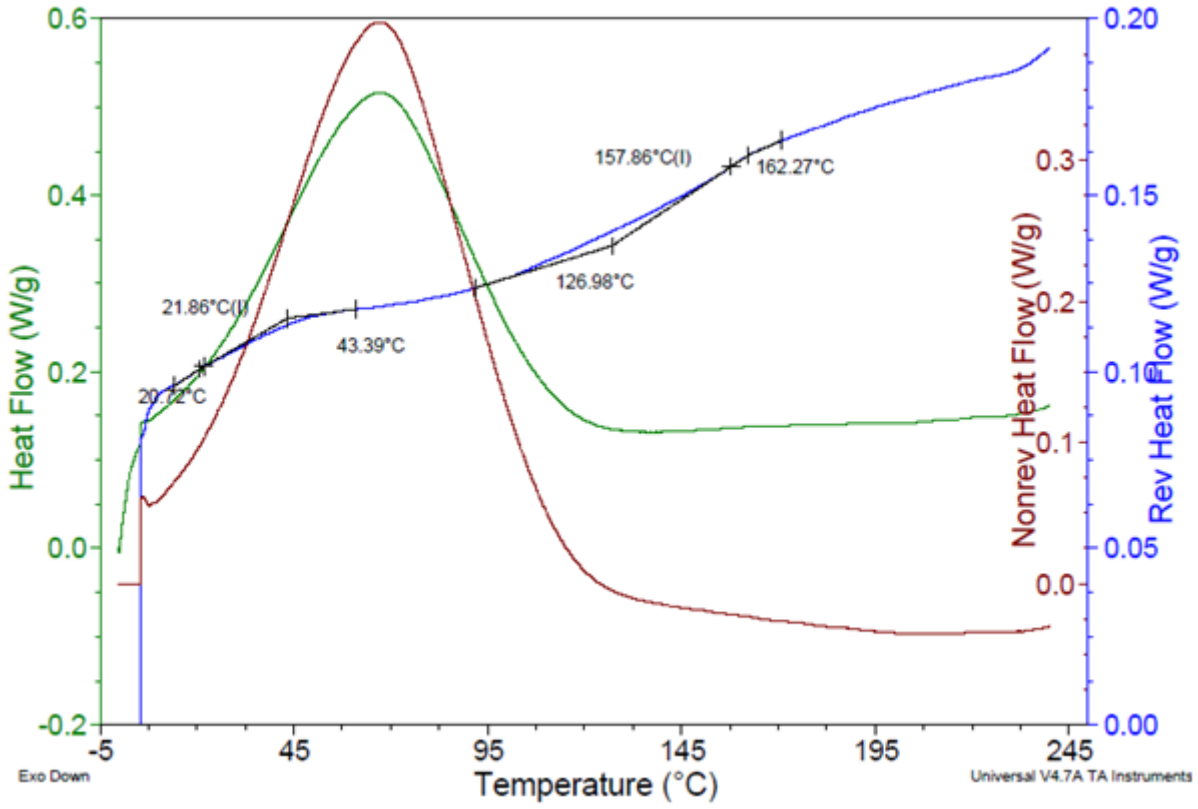
Iz grafičkog prikaza sorpcije i desorpcije vlage za navedene polimere (Slika 10. i 11.), vidljivo je da PVA dosta teže sorbira vlagu od kitozana, ali zato je i proces desorpcije sporiji, što ukazuje na različite mehanizme sorpcije vlage kitozana i PVA. Mišić (2017) je koristeći iste uvjete sušenja raspršivanjem i provođenja analize DVS-a, uspoređujući svojstva alginata i PVA dobila slične rezultate.

4.6. TERMIČKA SVOJSTVA ISHODNIH POLIMERA I POLIMERNIH MIKROČESTICA

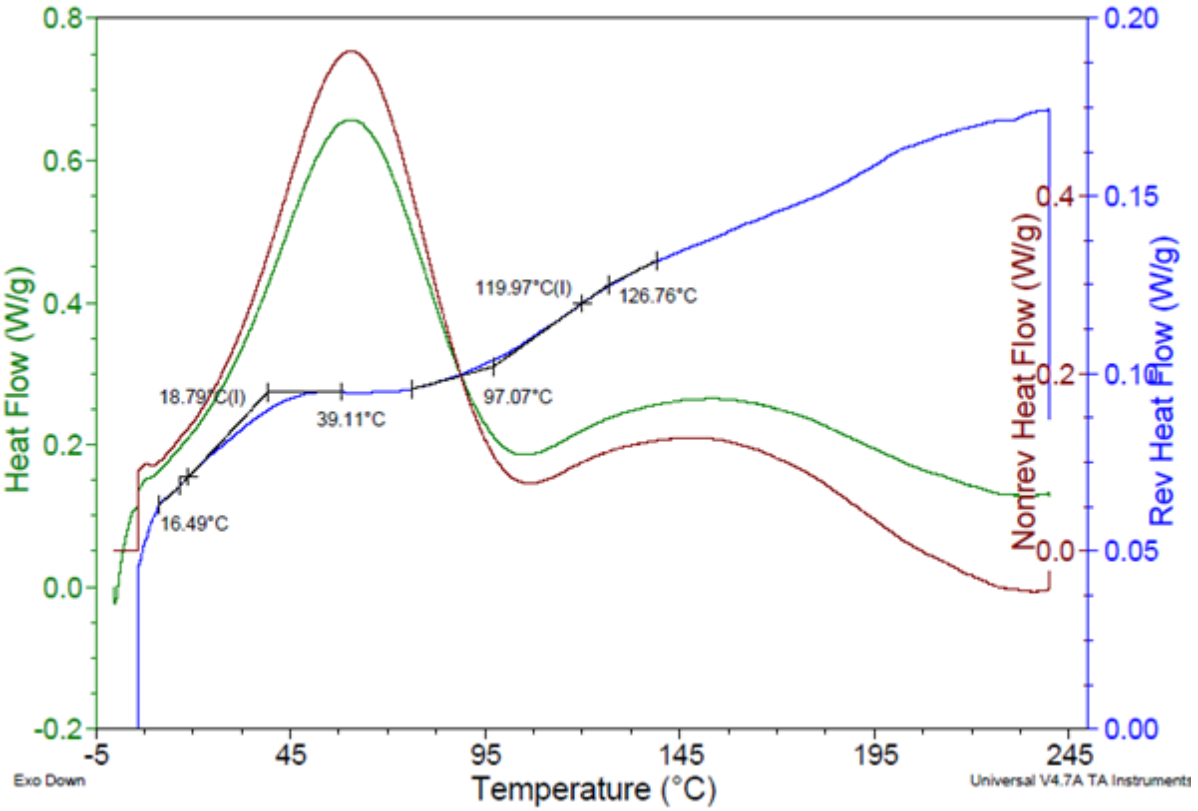
Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential scanning calorimetry* – DSC) je analitička tehnika kojom se može ustvrditi amorfnost/kristaličnost tvari određivanjem temperature staklišta (temperatura pri kojoj amorfna tvar prelazi iz stanja manje pokretljivosti u stanje veće pokretljivosti, T_g), temperature taljenja (prijelaz iz kristalnog u tekuće stanje), te temperature kristalizacije (temperatura prijelaza iz amorfnog/tekućeg u kristalinično stanje) ispitivane tvari. U složenijim sustavima kao što je primjerice polimerni terapijski sustav s uklopljenom djelatnom tvari, proučavajući promjenu navedenih temperatura polimera (ali i lijeka) može se zaključiti o tipu nastale čvrste disperzije i eventualnim interakcijama u sustavu (Clas i sur., 1999).

Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Modulated Differential Scanning Calorimetry*, MDSC) podrazumijeva sinusoidalno modulirano zagrijavanje uzorka. Navedeni pristup omogućuje odvajanje reverzibilnih od ireverzibilnih procesa koji se u termogramu ukupnog protoka topline međusobno podudaraju (primjerice istodobni staklasti prijelaz (reverzibilan) i gubitak adsorbiranog otapala (ireverzibilan) (Dürrigl, 2011).

Slika 12. i 13. redom prikazuju DSC termogram kitozana srednje molekulske mase i DSC termogram mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem otopine navedenog polimera. Oba termograma upućuju na amorfnu strukturu kitozana, što je u skladu s literaturnim navodima (Filipović-Grčić i sur., 2003). Pri korištenom termičkom programu nije bilo moguće precizno odrediti temperaturu staklišta.



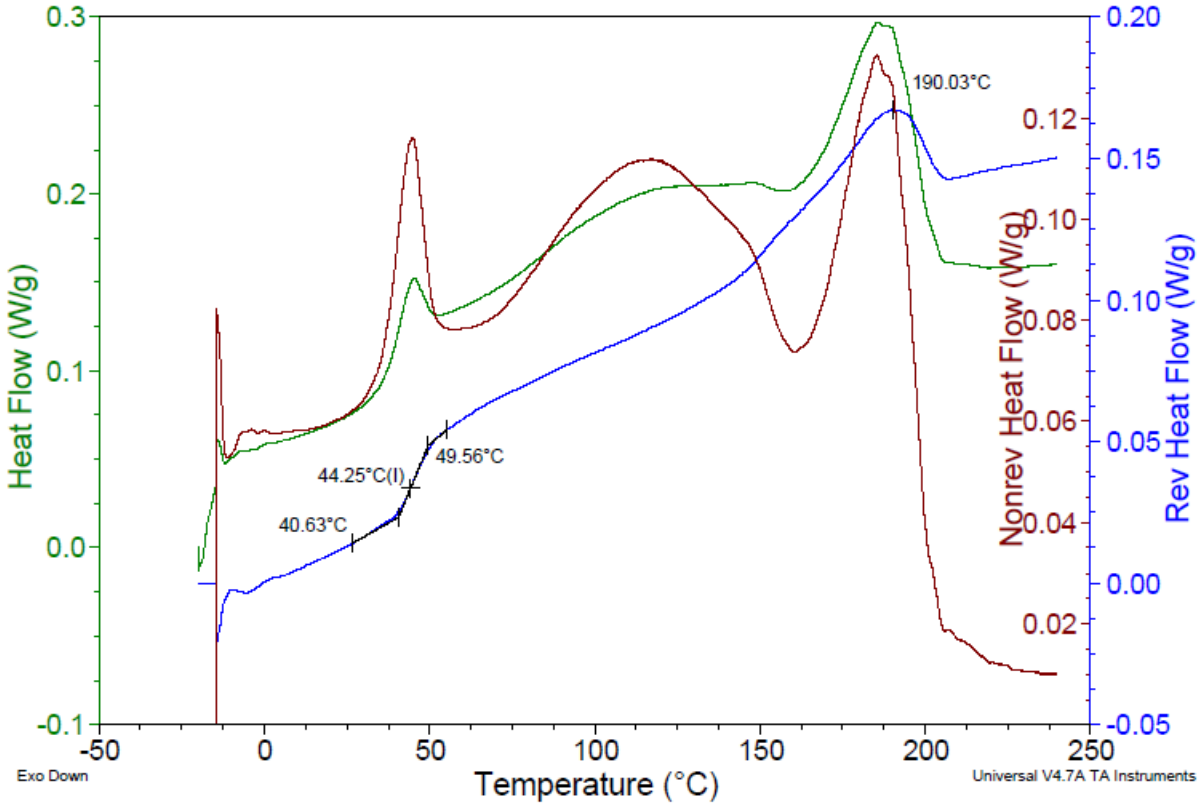
Slika 12. *DSC termogram kitozana srednje molekulske mase prije sušenja raspršivanjem*



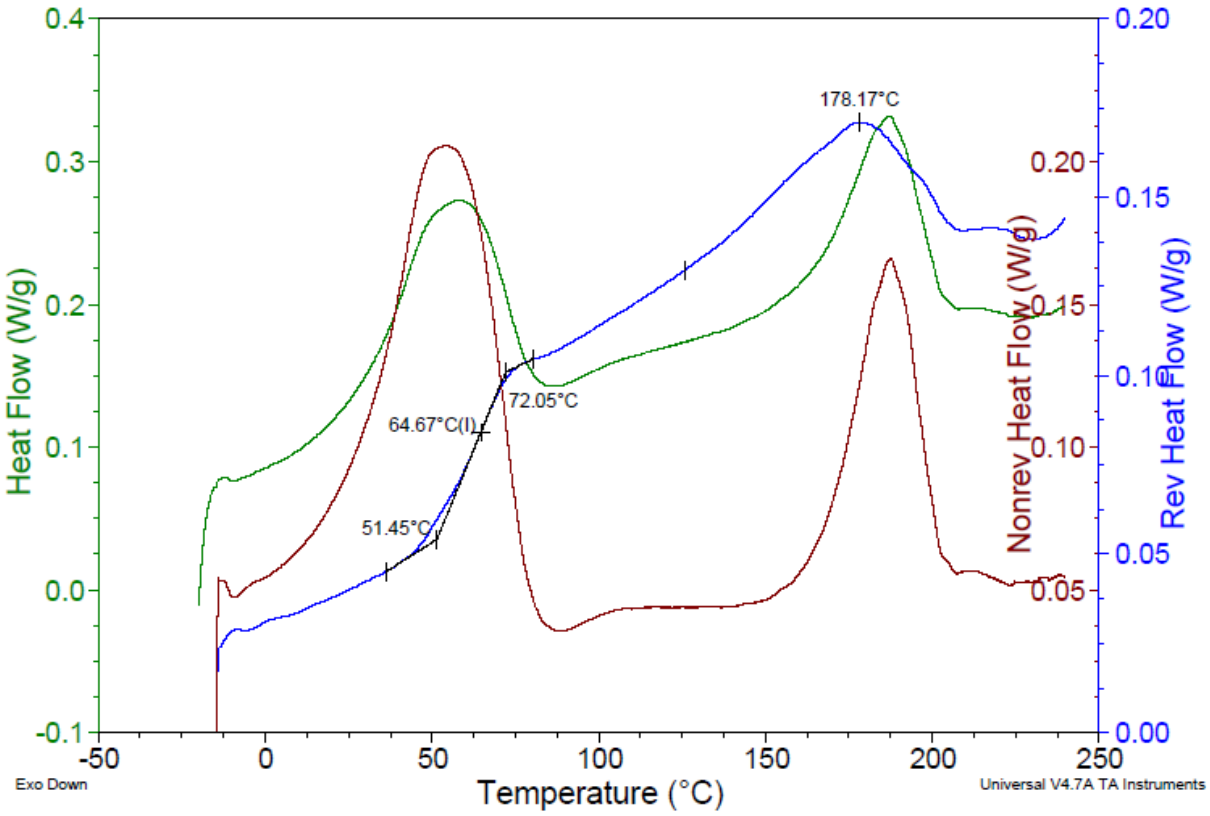
Slika 13. *DSC termogram mikročestica kitozana srednje molekulske mase pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Gu i suradnici (2015) su određivali termalna svojstva kitozanskih mikročestica s teofilinom pripravljenih sušenjem raspršivanjem kao i fizičke smjese teofilina i kitozana, MDSC-om, pri zagrijavanju brzinom od 2°C/min s moduliranom frekvencijom od 0,83°C/80s te dobili slabi signal za T_g kitozana pri 120°C. Taj se signal nije mijenjao s promjenom masenog omjera polimera i lijeka u fizičkoj smjesi, kao ni nakon sušenja raspršivanjem. Alhalaweh, i suradnici (2009) su, zagrijavajući uzorak u nehermetički zatvorenim aluminijskim posudama i skenirajući temperature 15-300°C brzinom od 4°C/min i modulacijom od 1°C/min u struji dušika izmjerili T_g kitozana od 130°C.

DSC termogram polimera PVA 8-88 i DSC termogram mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem otopine PVA 8-88 redom su prikazani na Slici 14. i 15.



Slika 14. *DSC termogram polimera PVA 8-88 prije sušenja raspršivanjem*



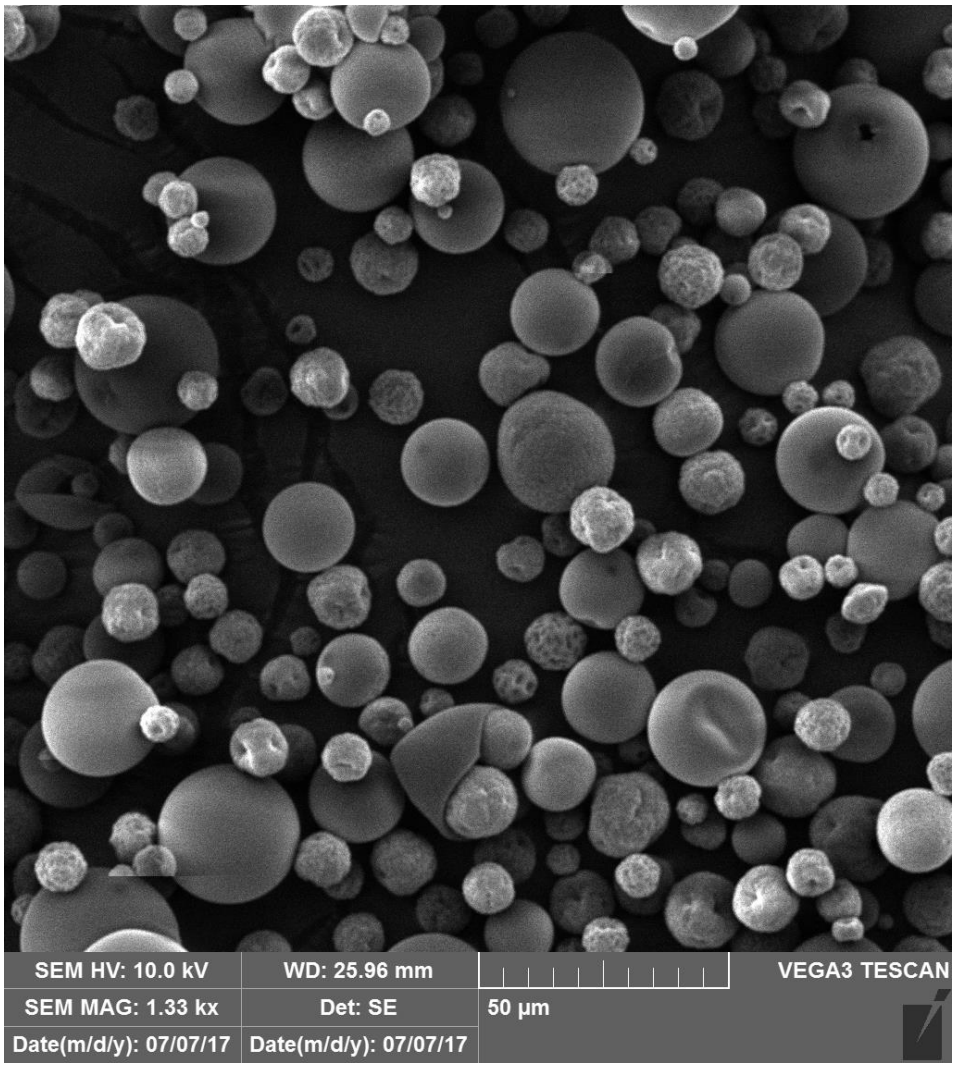
Slika 15. *DSC termogram mikročestica PVA 8-88 pripravljenih sušenjem raspršivanjem*

Na oba termograma vidljiva je temperatura staklišta od oko 44°C i temperatura taljenja oko 180°C, iz čega se može zaključiti da je PVA 8-88 dijelom kristaliničan i dijelom amorfan, prije i nakon sušenja raspršivanjem. Porast signala za temperaturu staklišta u slučaju mikročestica PVA 8-88 pripravljenih sušenjem raspršivanjem u odnosu na ishodni polimer ukazuje na dodatnu amorfizaciju polimera uslijed sušenja raspršivanjem (Caron i sur., 2011). Slične temperature prijelaza za polimer PVA 18-88 kao i amorfniju strukturu polimera sušenog raspršivanjem u odnosu na ishodni polimer uočila je i Mišić (2017) u svom radu.

U procesu sušenja raspršivanjem, temperaturu medija za sušenje treba odrediti uzimavši u obzir temperaturu staklišta sastavnica. Naime, ukoliko je temperatura zraka pri izlasku iz kolone za sušenje veća od temperature staklišta, dolazi do povećanog lijepljenja produkta za stijenke (Singh i Van den Mooter, 2015). U ovom radu prilikom sušenja otopine PVA 8-88 zabilježena je temperatura izlaznog zraka u rasponu od 81,1 - 90,4ºC, što je značajno više od temperature staklišta navedenog polimera. Time se dodatno može objasniti uočeno lijepljenje produkta za stijenke kolone i relativno malo iskorištenje procesa sušenja otopine PVA 8-88.

4.7. MORFOLOGIJA POLIMERNIH MIKROČESTICA

Morfologija polimernih mikročestica svojstvo je koje ovisi o kinetici sušenja polimerne otopine i značajkama samog polimera (Vehring, 2007). Morfološke značajke utječu na biofarmaceutska svojstva mikročestica poput brzine oslobađanja djelatne tvari, ali i reološke značajke farmaceutskog praška u cjelini. Slika 16. prikazuje SEM mikrografiju mikročestica kitozana srednje molekulske mase pripravljenih sušenjem raspršivanjem.



Slika 16. *SEM mikrografija mikročestica kitozana srednje molekulske mase pripravljenih sušenjem raspršivanjem (povećanje 1330 x)*

Kao što se zorno vidi na slici 16, u uzorku se mogu zamijetiti sferične čestice raznih veličina, što je u skladu s mjerenjima iz dijela 4.3. Može se također primijetiti da su male čestice naborane površine (neke i naborane i izvinute), dok su velike čestice glatke površine, uz rijetka blaga uvrnuća. Nabori na površini nastaju kao posljedica smežuravanja

mikročestica nakon formiranja čvrste ovojnice. Takva morfologija mikročestica kitozana srednje molekulske mase već je prikazana u literaturi (Martinac i sur., 2005, Hafner i sur., 2007), posebice u slučaju praznih mikročestica (bez uklopljenog lijeka).

Mikrosfere dobivene sušenjem raspršivanjem otopina kitozana mogu imati različitu morfologiju ovisno o molekulskoj masi kitozana, pa tako He i suradnici (1999.) navode da čestice pripravljene od kitozana male molekulske mase imaju blago naboranu površinu, dok čestice pripravljene od kitozana velike molekulske mase imaju glatku površinu. U navedenom radu He i suradnika mikročestice su pripravljene koristeći standardnu bifluidnu sapnicu, pri temperaturi ulaznog zraka od 160°C, protoku komprimiranog zraka od 10 l/min i dotoku uzorka od 6 ml/min.

Lusina Kregar (2016), koristeći bifluidnu sapnicu sušila je raspršivanjem 1,6% otopinu kitozana male ili srednje molekulske mase u 0,5% (*V*/*V*) octenoj kiselini pomiješanu u omjeru 4:1 s 1,2% otopinom mupirocina u metanolu, s postavkama procesnih parametara kao što slijedi: aspirator 100%, pumpa 20%, brzina protoka komprimiranog dušika 414 Nl/h, ulazna temperatura 130°C, izlazna temperatura 73-80°C. Koristeći navedene uvjete pripreme dobila je čestice sferičnog oblika, uz napomenu da se dio čestica nije osušio u obliku pojedinačnih čestica, već spojene sa susjednim česticama.

5. ZAKLJUČCI

- Mikročestice kitozana male, srednje i velike molekulske mase uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Korištena konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem (ultrazvučna sapnica, standardna konusna kolona za sušenje i ciklon srednje veličine) te postavljeni procesni parametri (brzina rada peristaltičke pumpe od 20%, snaga ultrazvučne sapnice 97%, brzina zagrijanog zraka 0,25 m^3/min, temperatura zraka na ulasku u kolonu za sušenje 150°C), rezultirali su iskorištenjem procesa od 71,56-84,93%.
- Proces priprave mikročestica sušenjem raspršivanjem otopine PVA 8-88 pri istoj konfiguraciji uređaja i procesnim parametrima, rezultirao je malim iskorištenjem (29,09%), prvenstveno uslijed relativno niske temperature staklišta PVA 8-88 (oko 44ºC).
- Srednji promjer kitozanskih mikročestica kretao se u rasponu od 6,6 ± 2,4 do 9,5 ± 3,6 μm. Nije uočena jasna korelacija s molekulskom masom korištenih kitozana. Mikročestice PVA 8-88 karakterizirane su najvećom veličinom čestica (11,7 ± 4,1 μm).
- Za sve ispitivane polimere, sadržaj vlage u mikročesticama pripravljenim sušenjem raspršivanjem bio je niži od sadržaja vlage u ishodnim polimerima.
- Sadržaj vlage u uzorcima PVA 8-88 manji je od sadržaja vlage u kitozanskim uzorcima, što ukazuje na manju higroskopnost PVA 8-88 u odnosu na kitozan.
- Među ishodnim polimerima, kitozani su amorfne strukture, dok je PVA 8-88 dijelom amorfne, a dijelom kristalinične strukture. Sušenje raspršivanjem otopine PVA 8-88 rezultiralo je dodatnom amorfizacijom polimera.
- Kitozanske mikročestice su sferičnog oblika i relativno široke raspodjele veličina. Male čestice su naborane površine, dok su velike čestice glatke površine, uz rijetka blaga uvrnuća. Nabori na površini nastaju kao posljedica smežuravanja mikročestica nakon formiranja čvrste ovojnice.
- Rezultati provedene karakterizacije ishodnih polimera i mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem korisni su za daljnje optimiranje procesa priprave i dizajniranje terapijskog sustava temeljenog na kitozanu.

6. LITERATURA

Agrawal A, Manek R, Kolling W, Neau S. Water Distribution Studies Within Microcrystalline Cellulose and Chitosan using Differential Scanning Calorimetry and Dynamic Vapor Sorption Analysis. *J Pharm Sci*, 2004, 93, 1766-1779.

Ahmadi Majd S, Rabbani Khorasgani M, Moshtaghian S, Talebi A, Khezri M. Application of Chitosan/PVA Nano fiber as a potential wound dressing for streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biol Macromolec*, 2016, 92, 1162-1168.

Alhalaweh A, Andersson S, Velaga S. Preparation of zolmitriptan–chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 38, 206-214.

Amidi M, Romeijn S, Borchard G, Junginger H, Hennink W, Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J Control Release*, 2006, 111, 107-116.

Asada M, Takahashi H, Okamoto H, Tanino H, Danjo K. Theophylline particle design using chitosan by the spray drying. *Int J Pharm*, 2004, 270, 167-174.

Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100, 1451-1457

Ballarín-González B, Dagnaes-Hansen F, Fenton R, Gao S, Hein S, Dong M, Kjems J, Howard K. Protection and Systemic Translocation of siRNA Following Oral Administration of Chitosan/siRNA Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013 2, p.e. 76.

Bani-Jaber A, Kobayashi A, Yamada K, Haj-Ali D, Uchimoto T, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. A newly developed lubricant, chitosan laurate, in the manufacture of acetaminophen tablets. *Int J Pharm*, 2015, 483, 49-56.

Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81, 463-469.

Bernkop-Schnürch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57, 9-17.

Bonferoni M, Giunchedi P, Scalia S, Rossi S, Sandri G, Caramella C. Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: Relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7, E141-E147.

Caddeo C, Díez-Sales O, Pons R, Carbone C, Ennas G, Puglisi G, Fadda A, Manconi M. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 461, 69-78.

Cal K, Sollohub K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 575-586.

Caron V, Tajber L, Corrigan O, Healy A. A Comparison of Spray Drying and Milling in the Production of Amorphous Dispersions of Sulfathiazole/Polyvinylpyrrolidone and Sulfadimidine/Polyvinylpyrrolidone. *Mol Pharm*, 2011, 8, 532-542.

Chirkov SN. The antiviral activity of chitosan, *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002, 38, 1-8.

Clas S, Dalton C, Hancock B. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *J Pharm Sci Technol*, 1999, 2, 311-320.

Corrigan D, Healy A, Corrigan O. Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62, 295-305.

Davis L, Bartnicki-Garcia S. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from Mucor rouxii. *Biochemistry*, 1984, 23, 1065-1073.

Davis S, Illum L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. *J Microencapsul*, 1999, 16, 343-355.

Dodane V, Vilivalam V. Pharmaceutical applications of chitosan. *J Pharm Sci Technol*, 1998, 1, 246-253.

Dürrigl M, Priprava čvrstih disperzija za kontrolirano oslobađanje lijeka metodom sušenja raspršivanjem, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, doktorska disertacija, 2011, dostupan na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:235065, datum pristupa 12.9.2017.

Estevinho B, Rocha F, Santos L, Alves A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends Food Sci Technol*, 2013, 31, 138-155.

Fan L, Yang H, Yang J, Peng M, Hu J Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydr Polym*, 2016, 146, 427-434.

Filipović-Grčić J, Perissutti B, Moneghini M, Voinovich D, Martinac A, Jalšenjak I. Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55, 921-931.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 83, 174-183.

Gilman J, VanderHart D, Kashiwagi T. Thermal Decomposition Chemistry of Poly(vinyl alcohol). *ACS Symp Ser Am Chem Soc*, 1995, 161-185.

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.

Goy R, Britto D, Assis O. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polymeros*, 2009, 19, 241-247.

Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25, 427-437.

Gu B, Linehan B, Tseng Y. Optimization of the Büchi B-90 spray drying process using central composite design for preparation of solid dispersions. *Int J Pharm*, 2015, 491, 208-217.

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.

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205-213.

He P, Davis S, Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm*, 1999, 187, 53-65.

He P, Davis S, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm*, 1998, 166, 75-88.

Honary S, Maleki M, Karami M. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/ chitosan microparticles containing prednisolone. *Trop J Pharm Res*, 2009, 8, 53-61

Howling G, Dettmar P, Goddard P, Hampson F, Dornish M, Wood E. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001, 22, 2959-2966.

Huang X, Bao X, Wang Z, Hu Q. A novel silver-loaded chitosan composite sponge with sustained silver release as a long-lasting antimicrobial dressing. *RSC Adv*, 2017, 7, 34655-34663.

Huang Y, Chiang C, Yeh M. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. *J Microencapsul*, 2002, 20, 247-260.

Hyung Park J, Kwon S, Lee M, Chung H, Kim J, Kim Y, Park R, Kim I, Bong Seo S, Kwon I, Young Jeong S. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity. *Biomaterials*, 2006, 27, 119-126.

Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher A, Davis S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 51, 81-96.

Learoyd T, Burrows J, French E, Seville P. Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 224-234.

Learoyd T, Burrows J, French E, Seville P. Sustained delivery by leucine-modified chitosan spray-dried respirable powders. *Int J Pharm*, 2009, 372, 97-104.

Lin Y, Mi F, Chen C, Chang W, Peng S, Liang H, Sung H. Preparation and Characterization of Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Insulin Delivery. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 146-152.

Liu C, Desai K, Chen X, Park H. Linolenic Acid-Modified Chitosan for Formation of Self-Assembled Nanoparticles. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 437-441.

Lorenzo-Lamosa M, Remuñán-López C, Vila-Jato J, Alonso M. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J Control Release*, 1998, 52, 109-118.

Lusina Kregar M, Razvoj in vitro metode za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari iz polimernih mikročestica za topičku primjenu, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-

biokemijski fakultet, doktorska disertacija, 2016, Dostupan na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:674196, datum pristupa: 9.9.2017.

Malette W, Quigley H, Gaines R, Johnson N, Rainer W. Chitosan: A New Hemostatic. *The Ann Thorac Surg*, 1983, 36, 55-58.

Martinac A, Filipović-Grčić J. Kitozan - biopolimer 21.stoljeća. *Farm glas*, 2002, 58.

Martinac A, Filipović-Grčić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm*, 2005, 291, 69-77.

Mišić J, Predformulacijska ispitivanja u razvoju alginatnih mikročestica pripravljenih metodom sušenja raspršivanjem, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, diplomski rad, 2017

Morgado P, Miguel S, Correia I, Aguiar-Ricardo A. Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing.*Carbohydr Polym*, 2017. 159, 136-145.

Müzzarelli R. Selective collection of trace metal ions by precipitation of chitosan, and new derivatives of chitosan. *Anal Chim Acta*, 1971, 54, 133-142.

Muzzarelli R. Chitin. Oxford: Pergamon Press. 1977

Muzzarelli R, Raith G, Tubertini O. Separations of trace elements from sea water, brine and sodium and magnesium salt solutions by chromatography on chitosan. *J Chromatogr A*, 1970, 47, 414-420.

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

No H, Meyers S, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *J Food Sci*, 2007, 72, 87-100.

Oungbho K, Müller B. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. *Int J Pharm*, 1997, 156, 229-237.

Paul W, Sharma C. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater Artif Organs*, 2004, 18, 18-23.

Percy S, 1872. US Patent 125.406 A

Pereira F, da Silva Agostini D, Job A, González E. Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. *J Therm Anal Calorim*, 2012, 114, 321-327.

PerkinElmer, FAQ Beginners Guide to Thermogravimetric Analysis, https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/FAQ_Beginners-Guide-to-Thermogravimetric-Analysis_009380C_01.pdf, pristupljeno 11.9.2017.

ProCepT 4M8-TriX: installation and operation manual: fluid bed, pan coater, spray dryer, nitrogen unit. Zelzate, Belgija.

Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16, 4243-4245.

Qi L, Xu Z, Li Y, Jiang X, Han X. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol*, 2005, 11, 5136–5141.

Qu J, Zhao X, Ma P, Guo B. pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy. *Acta Biomater*, 2017, 58, 168-180.

Rassu G, Gavini E, Jonassen H, Zambito Y, Fogli S, Breschi M, Giunchedi P. New chitosan derivatives for the preparation of rokitamycin loaded microspheres designed for ocular or nasal administration. *J Pharm Sci*, 2009, 98, 4852-4865.

Ravi Kumar M. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*, 2000, 46, 1-27.

Re MI. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Dry Technol*, 2006, 24, 433-336.

Rege P, Block L. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydr Res*, 1999, 321, 235-245.

Rege P, Garmise R, Block L. Spray-dried chitinosans Part I: preparation and characterization. *Int J Pharm*, 2003, 252, 41-51.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*, 2006, 31, 603-632.

Rodriguez M, Ramos V, Agullo E. Antimicrobial Action of Chitosan against Spoilage Organisms in Precooked Pizza. *J Food Sci*, 2003, 68, 271-274.

Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol*, 1999, 47, 67-77.

Romić MD, Klarić M, Lovrić J, Pepić I, Cetina-Čižmek, B, Filipović-Grčić J, Hafner A. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 107, 67-79.

Rossi S, Sandri G, Bonferoni M.C, Ferrari F, Mori M, Caramella C. The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery, *J Drug Deliv Sci Technol*, 2012, 22, 275-284.

Rowe R, Sheskey P, Owen S. Handbook of pharmaceutical excipients. London, Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006, str.592-593

Sawtarie N, Cai Y, Lapitsky Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 157, 110-117.

Scanning tunneling microscope vs. scanning electron microscope, http://www.testandmeasurementtips.com/basics-of-the-scanning-electron-microscope/, pristupljeno 19.8.2017.

Sheokand S, Modi S, Bansal A. Dynamic Vapor Sorption as a Tool for Characterization and Quantification of Amorphous Content in Predominantly Crystalline Materials. *J Pharm Sci*, 2014, 103, 3364-3376.

Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100, 27-50.

Sivaraman A, Ganti SS, Nguyen HX, Birk G, Wieber A, Lubda D, Banga AK, Development and evaluation of a polyvinyl alcohol based topical gel, *J Drug Deliv Sci Technol*, 2017, 39, 210-216.

Sollohub K, Cal K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 587-597.

de Souza Costa-Júnior E, Pereira M, Mansur H. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 20(2), 553-561.

Sun J, Jiang G, Wang, Y, Ding F. Thermosensitive chitosan hydrogel for implantable drug delivery: Blending PVA to mitigate body response and promote bioavailability. *J Appl Polym Sci*, 2012, 125, 2092-2101.

Thermo analytical techniques, National Programme on Technology Enhanced Learning, http://nptel.ac.in/courses/103103026/module2/lec14/4.html, pristupljeno: 11.9.2017.

Thomas LC. Modulated DSC® Paper #1 Why Modulated DSC®? An Overview and Summary of Advantages and Disadvantages Relative to Traditional DSC, 2017, http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TP006_MDSC_1_MDSCOverview.pdf, pristupljeno 11.9.2017.

Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 1997, 18, 567-575.

Tsai G, Su W. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against Escherichia coli. *J Food Prot*, 1999, 62, 239-243.

Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2000, 18, 305-312.

Vehring R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharm Res*, 2007, 25, 999-1022.

Verdonck E, Schaap K, Thomas L. A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *Int J Pharm*, 1999, 192, 3-20.).

Wang J, Kong M, Zhou Z, Yan D, Yu X, Cheng X, Feng C, Liu Y, Chen X. Mechanism of surface charge triggered intestinal epithelial tight junction opening upon chitosan nanoparticles for insulin oral delivery. *Carbohydr Polym*, 2017, 157, 596-602.

Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*, 2003, 250, 215-226.

Yadav R, Chauhan M. Pharmaceutical Diversity of Chitin and Chitosan: A Review. *Int J Pharm Sci Res*, 2017, 2, 06-11.

Yeh T, Hsu L, Tseng M, Lee P, Sonjae K, Ho Y, Sung H. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials*, 2011, 32, 6164-6173.

Zhang C, Qu G, Sun Y, Wu X, Yao Z, Guo Q, Ding Q, Yuan S, Shen Z, Ping Q, Zhou H. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. *Biomaterials*, 2008, 29, 1233-1241.

Zheng L, Zhu J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym*, 2003, 54, 527-530.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Kitozan je hidrofilan, biokompatibilan i biorazgradljiv polimer koji se u zadnjih 20 godina uvelike istražuje kao polimer izbora u pripravi inovativnih terapijskih sustava. Sušenje raspršivanjem predstavlja metodu izbora u izradi praškastih terapijskih sustava temeljenih na kitozanu i njegovim derivatima. Sustavni pristup razvoju kitozanskih mikročestica metodom sušenja raspršivanjem uključuje sveobuhvatnu karakterizaciju ishodnih polimera te polimernih mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem, a s ciljem procjene kritičnih procesnih parametara u pripravi suhog produkta.

U ovom radu provedena je fizičko-kemijska karakterizacija kitozana male, srednje i velike molekulske mase te mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem odgovarajućih polimernih otopina. Uz kitozane, karakteriziran je i polivinilni alkohol PVA 8-88 (PVA) kao polimer koji može doći u kombinaciji s kitozanom u pripravi mikročestica iz jednostavnih i složenih (emulzijskih) sustava. Kitozanske mikročestice uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Korištena konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem (ultrazvučna sapnica, standardna konusna kolona za sušenje i ciklon srednje veličine) te postavljeni procesni parametri (brzina rada peristaltičke pumpe od 20%, snaga ultrazvučne sapnice 97%, brzina zagrijanog zraka 0,25 m^3/min, temperatura zraka na ulasku u kolonu za sušenje 150°C), rezultirali su iskorištenjem procesa od 71,56-84,93%. Proces priprave mikročestica sušenjem raspršivanjem otopine PVA pri istim uvjetima, rezultirao je malim iskorištenjem (29,09%), prvenstveno uslijed relativno niske temperature staklišta PVA (oko 44ºC). Srednji promjer kitozanskih mikročestica kretao se u rasponu od 6,6 ± 2,4 do 9,5 ± 3,6 μm, dok su mikročestice PVA karakterizirane veličinom čestica od 11,7 ± 4,1 μm. Za sve ispitivane polimere, sadržaj vlage u mikročesticama bio je niži od sadržaja vlage u ishodnim polimerima. Kitozani su higroskopniji od PVA i amorfne strukture, dok je PVA dijelom kristalinične strukture. Sušenje raspršivanjem otopine PVA rezultiralo je dodatnom amorfizacijom polimera. Kitozanske mikročestice su sferičnog oblika i relativno široke raspodjele veličina. Male čestice su naborane površine, dok su velike čestice glatke površine, uz rijetka blaga uvrnuća. Nabori na površini nastali su uslijed smežuravanja mikročestica nakon formiranja čvrste ovojnice. Rezultati provedene karakterizacije ishodnih polimera i mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem korisni su za daljnje optimiranje procesa priprave i dizajniranje terapijskog sustava temeljenog na kitozanu.

Chitosan is a hydrophilic, biocompatible and biodegradable polymer that has been extensively investigated over the last 20 years as a polymer of choice in the development of innovative drug delivery systems. Spray-drying is the method of choice in the production of powdered delivery systems based on chitosan and its derivatives. The systematic approach to the development of spray-dried chitosan microparticles involves a comprehensive characterization of the polymers as raw materials and polymeric microparticles prepared by preliminary spray drying with the aim to estimate the critical process parameters in the preparation of the dry product.

In this work physico-chemical characterization of low, medium and high molecular weight chitosan and microparticles prepared by preliminary spray-drying of corresponding polymer solutions, was performed. Besides chitosans, properties of polyvinyl alcohol PVA 8-88 (PVA), the polymer that can be combined with chitosan in the preparation of microparticles from simple and complex (i.e. emulsion) systems, were determined. The chitosan microparticles were successfully prepared by spray drying method. The spray dryer configuration used (ultrasonic nozzle, standard conical drying column and medium-size cyclone) and process parameters employed (peristaltic pump speed of 20%, ultrasonic nozzle strength of 97%, inlet air flow of 0.25 m^3/min, inlet air temperature of 150°C) resulted in a process yield ranging from 71.56 to 84.93%. The PVA solution spray-drying under the same conditions resulted in a low yield (29.09%), primarily due to relatively low PVA glass-transition temperature (about 44°C). The mean diameter of chitosan microparticles ranged from 6.6 ± 2.4 to 9.5 ± 3.6 μm, while the size of PVA microparticles was 11.7 ± 4.1 μm. For all polymers tested, the moisture content of the microparticles was lower than the moisture content of the polymers as raw materials. Chitosans were found to be more hygroscopic than PVA and characterised by amorphous structure, while PVA had a partially crystalline-structure. PVA solution spray-drying promoted its amorphisation. Chitosan microparticles ware spherical in shape and had relatively wide size distribution. Small particles had wrinkled surface, while large particles had smooth or slightly curling surface. Wrinkles at the surface of the small particles were caused by shrivelling of the microparticles after the solid crust formation. The results of the characterization of the polymers as raw materials and spray-dried polymeric microparticles will be of great use for further optimization of the spray-drying process and chitosan-based drug delivery system design.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Predformulacijska ispitivanja u razvoju kitozanskih mikročestica pripravljenih metodom sušenja raspršivanjem

Josip Nodilo

SAŽETAK

Kitozan je hidrofilan, biokompatibilan i biorazgradljiv polimer koji se u zadnjih 20 godina uvelike istražuje kao polimer izbora u pripravi inovativnih terapijskih sustava. Sušenje raspršivanjem predstavlja metodu izbora u izradi praškastih terapijskih sustava temeljenih na kitozanu i njegovim derivatima. Sustavni pristup razvoju kitozanskih mikročestica metodom sušenja raspršivanjem uključuje sveobuhvatnu karakterizaciju ishodnih polimera te polimernih mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem, a s ciljem procjene kritičnih procesnih parametara u pripravi suhog produkta.

U ovom radu provedena je fizičko-kemijska karakterizacija kitozana male, srednje i velike molekulske mase te mikročestica pripravljenih preliminarnim sušenjem raspršivanjem odgovarajućih polimernih otopina. Uz kitozane, karakteriziran je i polivinilni alkohol PVA 8-88 (PVA) kao polimer koji može doći u kombinaciji s kitozanom u pripravi mikročestica iz jednostavnih i složenih (emulzijskih) sustava. Kitozanske mikročestice uspješno su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem. Korištena konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem (ultrazvučna sapnica, standardna konusna kolona za sušenje i ciklon srednje veličine) te postavljeni procesni parametri (brzina rada peristaltičke pumpe od 20%, snaga ultrazvučne sapnice 97%, brzina zagrijanog zraka 0,25 m^3/min, temperatura zraka na ulasku u kolonu za sušenje 150°C), rezultirali su iskorištenjem procesa od 71,56-84,93%. Proces priprave mikročestica sušenjem raspršivanjem otopine PVA pri istim uvjetima, rezultirao je malim iskorištenjem (29,09%), prvenstveno uslijed relativno niske temperature staklišta PVA (oko 44ºC). Srednji promjer kitozanskih mikročestica kretao se u rasponu od 6,6 ± 2,4 do 9,5 ± 3,6 μm, dok su mikročestice PVA karakterizirane veličinom čestica od 11,7 ± 4,1 μm. Za sve ispitivane polimere, sadržaj vlage u mikročesticama bio je niži od sadržaja vlage u ishodnim polimerima. Kitozani su higroskopniji od PVA i amorfne strukture, dok je PVA dijelom kristalinične strukture. Sušenje raspršivanjem otopine PVA rezultiralo je dodatnom amorfizacijom polimera. Kitozanske mikročestice su sferičnog oblika i relativno široke raspodjele veličina. Male čestice su naborane površine, dok su velike čestice glatke površine, uz rijetka blaga uvrnuća. Nabori na površini nastali su uslijed smežuravanja mikročestica nakon formiranja čvrste ovojnice. Rezultati provedene karakterizacije ishodnih polimera i mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem korisni su za daljnje optimiranje procesa priprave i dizajniranje terapijskog sustava temeljenog na kitozanu.

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

Rad sadrži: 51 stranica, 16 grafičkih prikaza, 6 tablica i 97 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sušenje raspršivanjem, Kitozan, Polivinilni alkohol, Mikročestice, Terapijski sustav

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PREFORMULATION STUDIES IN THE DEVELOPMENT OF CHITOSAN MICROPARTICLES PREPARED BY SPRAY-DRYING METHOD

Josip Nodilo

SUMMARY

Chitosan is a hydrophilic, biocompatible and biodegradable polymer that has been extensively investigated over the last 20 years as a polymer of choice in the development of innovative drug delivery systems. Spray-drying is the method of choice in the production of powdered delivery systems based on chitosan and its derivatives. The systematic approach to the development of spray-dried chitosan microparticles involves a comprehensive characterization of the polymers as raw materials and polymeric microparticles prepared by preliminary spray drying with the aim to estimate the critical process parameters in the preparation of the dry product.

In this work physico-chemical characterization of low, medium and high molecular weight chitosan and microparticles prepared by preliminary spray-drying of corresponding polymer solutions, was performed. Besides chitosans, properties of polyvinyl alcohol PVA 8-88 (PVA), the polymer that can be combined with chitosan in the preparation of microparticles from simple and complex (i.e. emulsion) systems, were determined. The chitosan microparticles were successfully prepared by spray drying method. The spray dryer configuration used (ultrasonic nozzle, standard conical drying column and medium-size cyclone) and process parameters employed (peristaltic pump speed of 20%, ultrasonic nozzle strength of 97%, inlet air flow of 0.25 m^3/min, inlet air temperature of 150°C) resulted in a process yield ranging from 71.56 to 84.93%. The PVA solution spray-drying under the same conditions resulted in a low yield (29.09%), primarily due to relatively low PVA glass-transition temperature (about 44°C). The mean diameter of chitosan microparticles ranged from 6.6 ± 2.4 to 9.5 ± 3.6 μm, while the size of PVA microparticles was 11.7 ± 4.1 μm. For all polymers tested, the moisture content of the microparticles was lower than the moisture content of the polymers as raw materials. Chitosans were found to be more hygroscopic than PVA and characterised by amorphous structure, while PVA had a partially crystalline-structure. PVA solution spray-drying promoted its amorphisation. Chitosan microparticles ware spherical in shape and had relatively wide size distribution. Small particles had wrinkled surface, while large particles had smooth or slightly curling surface. Wrinkles at the surface of the small particles were caused by shrivelling of the microparticles after the solid crust formation. The results of the performed characterization of the polymers as raw materials and spray-dried polymeric microparticles will be of great use for further optimization of the spray-drying process and chitosan-based drug delivery system design.

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

Thesis includes: 51 pages, 16 figures, 6 tables and 97 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Spray-drying, Chitosan, Polivinyl alcohol, Microparticles, Drug delivery system

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
Mario Jug, **Ph.D.** *Associate 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: September 2017.