Stabilnost kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom pripravljenih sušenjem raspršivanjem

Đakmanec, Anja

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:163:651818

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Anja Đakmanec

Stabilnost kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom pripravljenih sušenjem raspršivanjem

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika 1 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

Od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada, te na pruženom razumijevanju i strpljenju.
Veliko hvala Marieti Duvnjak Romić, mag. pharm., na pruženoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju zahvaljujem se na pomoći i susretljivosti.

Hvala prijateljima i kolegama što su uvijek bili tu za mene tokom studija.
Hvala mojim roditeljima i sestrama na pruženoj ljubavi i potpori. Moj uspjeh ne bi bio moguć bez vas.
Hvala mojem Adamu na beskrajnoj ljubavi, strpljenju, razumijevanju i poticanju da budem još bolja.
Hvala maloj Sofiji što je najbolja beba.

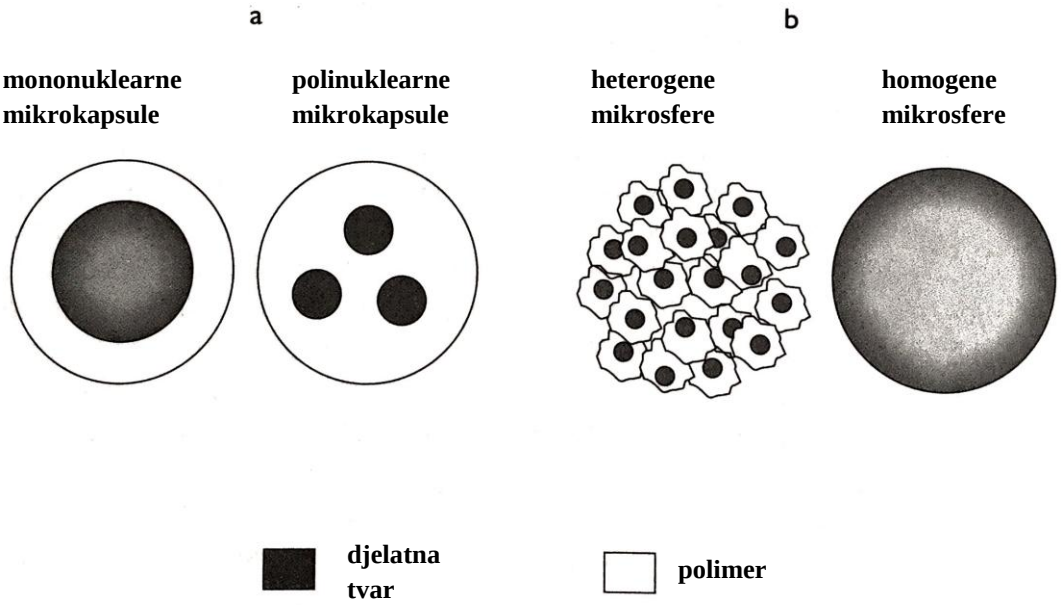
SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Mikročestice 1
1.2. Sušenje raspršivanjem kao tehnika priprave mikročestica 2
1.3. Stabilnost mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem 4
1.4. Kitozan 6
1.4.1. Razgradnja kitozana 7
1.4.2. Utjecaj relativne vlažnosti i temperature na razgradnju kitozana i stabilnost kitozanskih terapijskih sustava 9
1.5. Melatonin 10
1.6. Poloksamer 407 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 13
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. Materijali 15
3.2. Metode 15
3.2.1. Izrada mikrosfera 15
3.2.2. Određivanje iskorištenja, uspješnosti uklapanja lijeka i sadržaja lijeka 16
3.2.3. Određivanje zeta-potencijala mikrosfera 17
3.2.4. Određivanje veličine i raspodjele veličina mikrosfera 17
3.2.5. Ispitivanje stabilnosti 18
4. REZULTATI I RASPRAVA 19
4.1. Priprava mikrosfera 19
4.2. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka 21
4.3. Stabilnost mikrosfera 22
4.3.1. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera 22
4.3.2. Zeta – potencijal mikrosfera 25
4.3.3. Sadržaj lijeka 27
5. ZAKLJUČCI 29
6. LITERATURA 30
7. SAŽETAK / SUMMARY 33
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Mikročestice

Mikročestice su vrsta terapijskih sustava reda veličine od nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara, a dijele se na mikrokapsule i mikrosfere, ovisno o smještaju uklopljene djelatne tvari (Slika 1.) (Jalšenjak i sur., 1998). U farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji osnova su mnogih krutih oblika lijekova. Iako su nekada mikročestice bile samo pasivni nosači djelatne tvari, te je glavni cilj mikronizacije i postupaka sušenja bio odvajanje otapala i postizanje određene veličine čestica, s razvojem novih strategija dostave lijeka, mikročestice prerastaju u terapijski sustav koji omogućuje stabilizaciju djelatne tvari, dostavu na ciljano mjesto u organizmu, kontrolirano oslobađanje, te smanjenje nuspojava i toksičnosti lijeka (Vehring, 2008). Također, uklapanjem djelatnih tvari neugodnih organoleptičkih svojstava u mikročestice, maskira se njihov okus i miris (Lam i Gambari, 2014).



Slika 1. *Mikrokapsule (a) i mikrosfere (b) (Jalšenjak i sur., 1998).*

Mikrokapsule su spremišni sustav u kojem je djelatna tvar smještena u jezgri obavijenoj ovojnicom od makromolekularne tvari ili polimera. Za izradu ovojnice upotrebljava se niz standardnih pomoćnih tvari u farmaceutskoj tehnologiji koje možemo

podijeliti na one topljive u vodi (npr. arapska guma, želatina, škrob), netopljive u vodi (npr. etilceluloza, celulozni acetat, polietilen), topljive u crijevnom soku (npr. šelak, celulozni acetat-ftalat, acetat-butirat), te voskove i lipide (npr. više masne kiseline, viši alkoholi, esteri). Pokazano je da se gotovo sve tekuće i krute tvari mogu uklopiti u oblik mikrokapsula.

Mikrosfere su matriksne mikročestice kod kojih je djelatna tvar homogeno ili heterogeno dispergirana u polimernom matriksu. Zbog svoje dokazane biorazgradljivosti i biokompatibilnosti, pri pripravi mikrosfera najviše se koriste sintetski polimeri i kopolimeri mliječne i glikolne kiseline te prirodni polisaharidni polimer kitozan koji dodatno posjeduje i svojstvo bioadhezivnosti. Navedena svojstva čine ih prikladnima za oblikovanje u mikrosfere namijenjene za gotovo sve putove primjene.

Mikrosfere se mogu pripremiti različitim fizičko-kemijskim postupcima mikrokapsuliranja, a najčešće korišteni su:

- odjeljivanje faza iz vodenih i nevodenih medija – koacervacija
- sušenje raspršivanjem
- odjeljivanje faza isparavanjem odnosno ekstrakcijom otapala (Jalšenjak i sur., 1998).

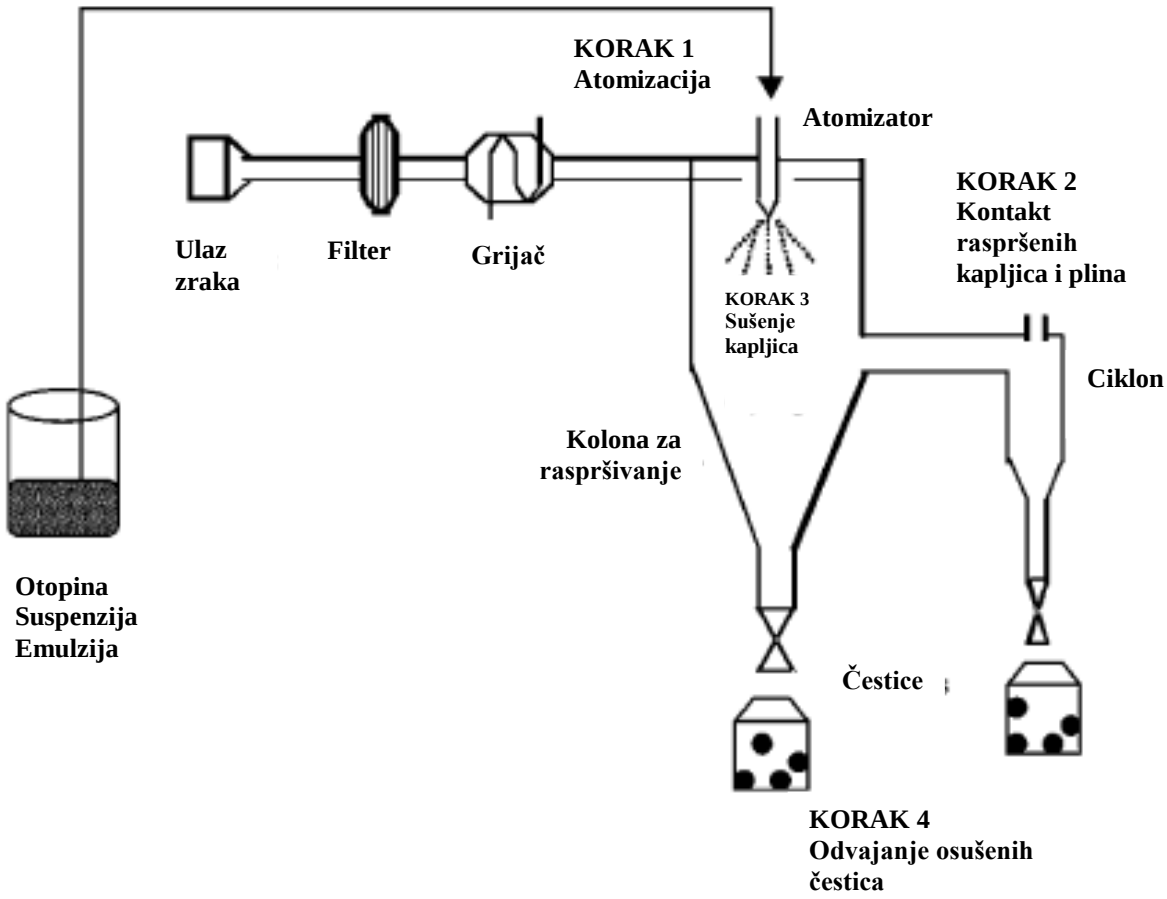
1.2. Sušenje raspršivanjem kao tehnika priprave mikročestica

Sušenje raspršivanjem je važna i široko primjenjivana tehnika u farmaceutskim, kemijskim i biokemijskim područjima. U farmaceutskoj industriji koristi se pri granuliranju i oblaganju, pripravi amorfnih oblika, proizvodnji ekscipijensa, i pripravi oblika lako hlapljivih tvari, tvari neugodnog okusa i mirisa te nedostatne stabilnosti. Također, postupak je prikladan za pripravu različitih mikrosfera i mikrokapsula od hidrofilnih i hidrofobnih polimernih materijala, a koristi se kao metoda izbora uklapanja brojnih termostabilnih i termolabilnih lijekova, te lijekova topljivih i netopljivih u vodi (Lin i sur.,2005; Jalšenjak i sur., 1998).

Sušenje raspršivanjem sastoji se od sljedećih faza (Slika 2.):

1. Atomizacija (raspršivanje tekućine)
2. Kontakt raspršenih kapljica i plina za sušenje
3. Sušenje kapljica
4. Odvajanje osušenih čestica od plina (Ré, 2006)

Svaka od prethodno navedenih faza, jednako kao i uvjeti pri kojima se sušenje raspršivanjem provodi, imaju veliki utjecaj na efikasnost samog procesa i svojstva konačnog produkta (Call i Sollohub, 2010).



Slika 2. *Sušenje raspršivanjem – glavni procesni koraci (preuređeno prema Ré, 2006).*

Atomizacija

Proces sušenja raspršivanjem započinje transportom otopine ili disperzije za raspršivanje do atomizatora pomoću peristaltičke pumpe. Atomizator zatim raspršuje tekućinu do finih kapljica velike specifične površine. Velika površina olakšava prijenos topline sa zagrijanog plina za sušenje na raspršene kapljice što omogućuje brzo isparavanje otapala.

U upotrebi su različiti tipovi atomizatora, kao što su rotirajući atomizator, tlačne, pneumatske i ultrazvučne mlaznice, a izbor atomizatora ovisi o uzorku koji je podvrgnut sušenju raspršivanjem i željenim svojstvima mikrosfera (Call i Sollohub, 2010).

Sušenje u struji zagrijanog zraka ili inertnog plina

Odmah nakon atomizacije, kapljice dolaze u kontakt sa zagrijanim plinom za sušenje pri čemu s površine kapljica isparava otapalo što rezultira formiranjem mikročestica. Najčešće se koristi atmosferski zrak, a moguća je primjena i dušika i drugih inertnih plinova. Zrak se koristi ukoliko je otapalo u tekućini za raspršivanje voda, dok se kod upotrebe organskih otapala koristi inertni plin. Također, inertni plin se koristi kod sušenja kemijski nestabilnih tvari (Call i Sollohub, 2010; Ré, 2006).

Tijekom procesa sušenja, uzorak i zagrijani zrak mogu se kretati u istom (istosmjerni tip uređaja) ili suprotnom smjeru (protusmjerni tip uređaja). Istosmjerni tip uređaja je najčešće korišteni tip uređaja u farmaceutskoj industriji. Raspršene kapljice dolaze u dodir sa zagrijanim zrakom u trenutku kada sadrže najviše otapala, te se, uslijed brzog isparavanja otapala hlade i nikad ne dosegnu ulaznu temperaturu zagrijanog zraka. Zato je taj tip uređaja prikladan i za sušenje termolabilnih tvari za razliku od uređaja s protusmjernim strujanjem zraka koji izlaže već formirane čestice relativno visokoj temperaturi što može rezultirati problemima s kemijskom stabilnošću lijeka (Call i Sollohub, 2010).

Odvajanje osušenih čestica od plina

Osušene čestice padaju prema dnu kolone za sušenje te se odvajaju od plina za sušenje primjenom ciklona ili vreća za filtriranje. U ciklonu se čestice odvajaju pomoću centrifugalne sile nastale vrtloženjem zraka. Sila usmjerava čestice prema stjenkama ciklona te se one odvajaju iz struje zraka. Vreće za filtriranje, za razliku od ciklona mogu bolje odvojiti sitne čestice te zato služe za odvajanje čestica promjera manjeg od 1μm (Call i Sollohub, 2010).

1.3. Stabilnost mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem

U procesu razvoja i komercijalizacije farmaceutskog proizvoda važan aspekt njegove karakterizacije predstavlja ispitivanje stabilnosti te definiranje roka valjanosti. U tom roku farmaceutski proizvod zadržava sva svojstva koja je imao u vrijeme priprave, čime se garantira učinkovitost i sigurnost njegove primjene.

Problem stabilnosti produkta sušenja raspršivanjem u svom preglednom radu obradio je Vehring (2008), kako je skraćeno prikazano u nastavku. Naime, u slučaju mikročestica kao

terapijskih sustava, uz kemijsku stabilnost djelatne tvari i ekscipijensa, jednako je važno osigurati i fizičku stabilnost samih mikročestica. Sušenje raspršivanjem kao proces pripreme rezultira proizvodnjom mikročestica koje se nalaze u energetski nepovoljnom stanju zbog svoje velike specifične površine i kratkog vremena sušenja zbog čega ne uspijevaju postići stanje ravnoteže. Mikročestice u tom slučaju imaju tendenciju prelaska u energetski povoljnije stanje procesima kristalizacije, polimorfne tranzicije, rasta kristala ili fuzije čestica. Navedeni procesi obično vode do promjene svojstava produkta (Vehring, 2008).

Kemijska se stabilnost djelatne tvari može narušiti na razne načine ovisno o prirodi djelatne tvari. Utjecaji pojedinih vanjskih čimbenika poput svjetlosti i vlage te kisikom izazvane reakcije mogu se izbjeći primjerice korištenjem adsorbensa vlage ili hvatača kisika. Ipak, poželjno je u što većoj mjeri ugraditi stabilnost pripravka već kroz njegov dizajn (Vehring, 2008).

Fizička se stabilnost mikročestica postiže pripravom ili potpuno kristalnih ili amorfnih čestica velike viskoznosti. Viskoznost amorfnog oblika karakterizirana je temperaturom staklišta te amorfni oblici čestica zadržavaju visoki stupanj viskoznosti prilikom čuvanja pri temperaturi nižoj od temperature staklišta koja je uglavnom 40 do 50 ˚C viša od temperature skladištenja. Ova se tehnika koristi i kao metoda očuvanja kemijske stabilnosti djelatne tvari. Pomoćne tvari korištene za ovakvu vrstu stabilizacije najčešće su saharidi, polioli ili organske soli koje formiraju strukture visoke viskoznosti. Ovom se metodom stabilizacije, ugrađivanjem molekula u rigidne amorfne strukture, usporava razgradnja same djelatne tvari ograničavanjem translacijskog gibanja. Unatoč ograničenom translacijskom gibanju navedena metoda pokazala se nedovoljnom za potpuno zaustavljanje brzih lokalnih rotacija i vibracijskih pokreta molekule te je u tom slučaju, za postizanje stabilnosti, primjenjiva metoda zamjene vode pri kojoj se koriste pojedine pomoćne tvari sa sposobnošću zamjenjivanja vodikovih veza raskinutih uklanjanjem vlage. Aminokiseline te šećeri kao što su primjerice glukoza, sorbitol, laktoza, saharoza ili trehaloza pokazali su se izuzetno djelotvornima po tom pitanju te se koriste prilikom sušenja raspršivanjem (Vehring, 2008).

Stabilnost mikročestica uvjetovana je i samim procesom formiranja čestica tijekom sušenja raspršivanjem, što je potrebno uzeti u obzir pri razvoju stabilnog produkta. Primjerice, u procesu sušenja, različite sastavnice mikročestica mogu se razdvojiti uslijed različite brzine difuzije u korištenom otapalu, što je izrazito nepovoljno ukoliko dođe do razdvajanja stabilizatora od molekula koje je potrebno stabilizirati. Drugi mehanizam koji vodi do

razdvajanja komponenata je površinska aktivnost. Surfaktanti koji uspješno drže molekule osjetljive na zrak podalje od površine same mikročestice mogu stvoriti sloj s niskom temperaturom stakliša na površini mikročestice koji dovodi do jakih kohezivnih sila između samih mikročestica. Treći potencijalni problem koji može dovesti do separacije tj. destabilizacije mikročestica je sekvencijalno taloženje komponenata zbog različite topljivosti u korištenom otapalu i različitog vremena u kojem se, uslijed isparavanja otapala, postiže zasićenje otopine (Vehring, 2008).

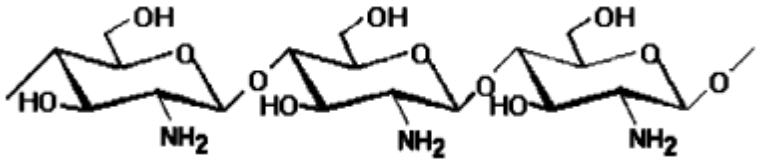
Dodatni problemi vezani za stabilnost opaženi su kod djelomično kristalnih sustava ili u prisutnosti više polimorfa. Djelomično kristalni sustavi su u principu nepoželjni iz dva glavna razloga. Prvi je razlog činjenica da je stabilniji oblik već nukleirao te postoji velika mogućnost da će manje stabilan amorfni oblik kristalizirati tijekom skladištenja, što posljedično narušava i mijenja sustav. Tijekom kristalizacije amorfnog oblika dolazi do oslobađanja vode koja djeluje kao plastifikator i povećava mobilnost preostalih amorfnih struktura. To ubrzava kristalizaciju te dovodi do promjena svojstava produkta. Drugi razlog nepoželjnosti takvih sustava leži u teškoj komercijalizaciji čvrstih oblika koji pokazuju veliku osjetljivost na male promjene u trajanju procesa sušenja. Uvećanje procesa na industrijsko mjerilo postaje otežano zbog duljeg vremena sušenja, tipičnog za veće uređaje, koje onda vodi do promjene fizičkog stanja mikročestica, a time i do promjene stabilnosti proizvoda (Vehring, 2008).

Gore navedeni mehanizmi koji predstavljaju izazov u dizajnu mikročestica kao terapijskih sustava, ujedno predstavljaju i priliku za dizajniranje mikročestica jedinstvenih svojstava. Primjerice, brza precipitacija tvari tijekom sušenja raspršivanjem često dovodi do stvaranja nanokristala. Iako taj fenomen može predstavljati rizik za stabilnost zbog potencijalnog rasta čestica Ostwaldovim zrenjem, istovremeno može rezultirati i povećanjem bioraspoloživosti teško topljivih lijekova. Nadalje, razdvajanje materijala različite viskoznosti može se iskoristiti za dizajn strukturiranih čestica koje posjeduju bolju fizičku stabilnost u usporedbi sa česticama istog sastava i homogene strukture (Vehring, 2008).

1.4. Kitozan

Kitozan je prirodni linearni biopoliaminosaharid, kopolimer N-acetil-glukozamina i glukozamina (Slika 3.). Po svakoj C_6 jedinici ima jednu (de)acetiliranu amino skupinu i dvije

slobodne hidroksilne skupine. Zbog lake dostupnosti slobodnih amino skupina, pozitivno je nabijen te reagira s negativno nabijenim površinama ili polimerima i kelira metalne ione (Sinha i sur., 2004). Topljiv je samo u razrijeđenim anorganskim i organskim kiselinama čiji je pH manji od pK_a kitozana (oko 6,5). Kod niskog pH, slobodne amino skupine su protonirane što uzrokuje elektrostatska odbijanja između lanaca polimera i omogućuje otapanje (Szymanska i Winnicka, 2015).



Slika 3. *Kemijska struktura kitozana*

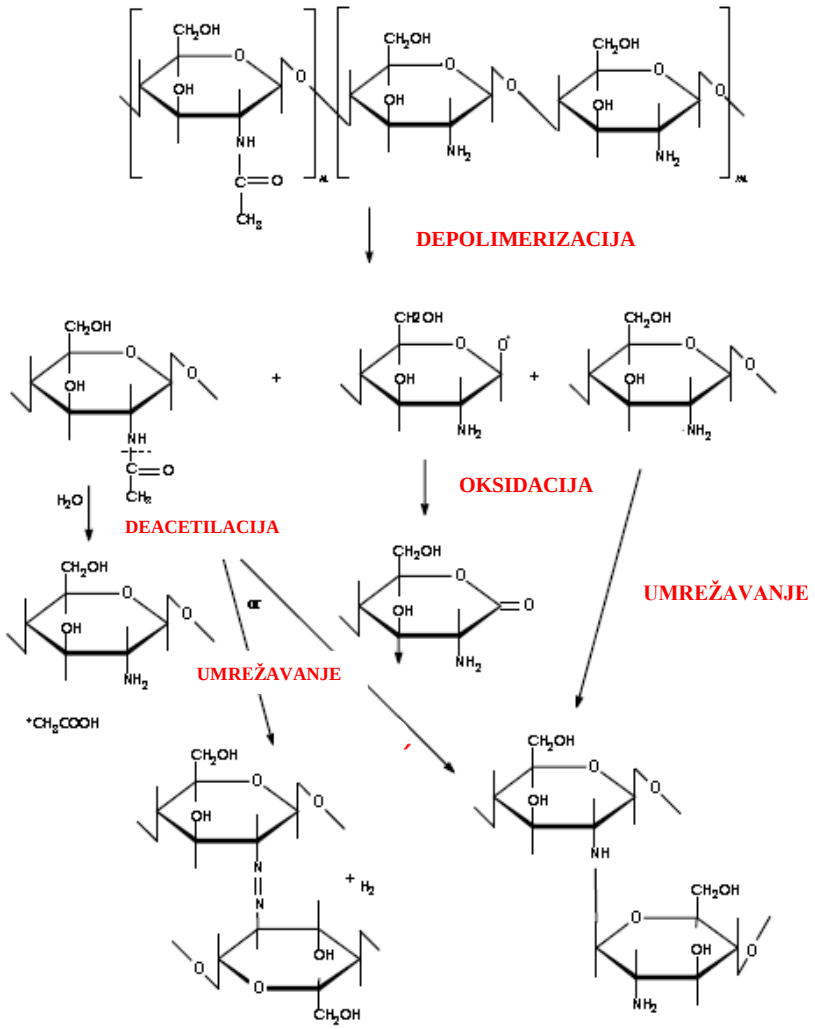
Kitozan se dobiva alkalnom deacetilacijom hitina, drugog najzastupljenijeg polisaharida u prirodi (nakon celuloze). Hitin je homopolimer građen od β-(1,4)-N-acetil-glukozaminskih jedinica s trodimenzionalnom konfiguracijom α-uzvojnice stabiliziranom intramolekularnim vodikovim vezama, te je glavna komponenta oklopa rakova i škampa (Kas, 1997; Muzzarelli, 1977).

Kitozan posjeduje brojna svojstva koja ga čine prikladnim za izradu biomedicinskih i farmaceutskih pripravaka. Kitozan je prirodni, biorazgradljivi, biokompatibilni, i mukoadhezivni polimer niske toksičnosti dostupan u obliku otopine, finog praška, filma i vlakana. Komercijalno dostupni kitozani imaju prosječnu molekulsku masu između 3,8 i 2000 kDa i stupanj deacetilacije od 66 do 95% (Kas, 1997).

1.4.1. Razgradnja kitozana

Kitozan, kao prirodni biorazgradljivi polimer, podliježe *in vivo* razgradnji posredovanoj različitim enzimima prisutnim u svim tkivima sisavaca, pri čemu nastaju netoksični oligosaharidi koji se mogu izlučiti iz organizma ili ugraditi u glikozaminoglikane ili glikoproteine (Kurita i sur., 2000). *In vitro* razgradnja kitozana reakcijama oksidacije te kemijske ili enzimske hidrolize pri kontroliranim uvjetima, metode su priprave kitozana manje molekulske mase (Slika 4.). Mehanizam i brzina razgradnje polimera ovise o

molekulskoj masi, polidisperznosti, stupnju deacetilacije, stupnju čistoće i sadržaju vlage. Proces razgradnje započinje cijepanjem β-(1,4)-glikozidnih veza (depolimerizacija), nakon čega slijedi uklanjanje N-acetilnih skupina (deacetilacija) i međusobno umrežavanje formiranih fragmenata. Istodobno s razgradnjom lanaca kitozana, dolazi i do cijepanja funkcionalnih skupina (amino, karbonilne, amido, hidroksilne). Kao posljedica depolimerizacije, opaženo je smanjenje molekulske mase, povećanje stupnja deacetilacije i stvaranje slobodnih radikala koji induciraju oksidacijske procese, dok proces umrežavanja dovodi do gubitka fizičko-kemijskih svojstava kitozana (Mucha i Pawlak, 2002).



Slika 4. *Mogući mehanizam razgradnje kitozana (prilagođeno prema Szymanska i Winnicka, 2015).*

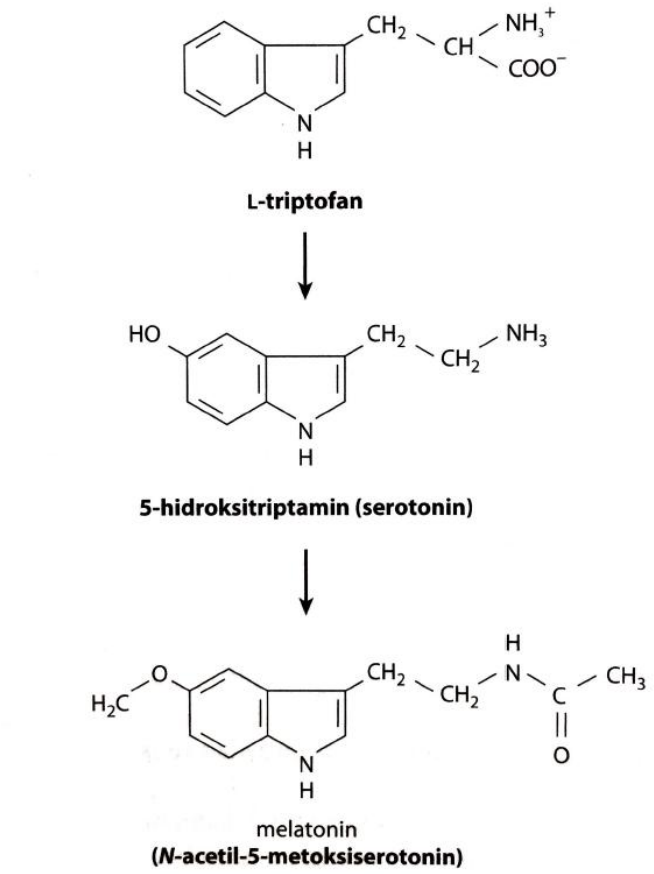
1.4.2. Utjecaj relativne vlažnosti i temperature na razgradnju kitozana i stabilnost kitozanskih terapijskih sustava

Relativna vlažnost zraka (RH) utječe na prisutnost i raspodjelu vlage u kitozanskom materijalu. Kod relativno niske vlažnosti (RH < 40%), pokazano je da difuzija vode u kitozanu slijedi Fickov zakon, dok je kod viših vrijednosti relativne vlažnosti opažena anomalna difuzija (Despond i sur., 2001). Ispitivanjem sorpcije vode pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% pokazano je da kitozan apsorbira 14-16 % (*m*/*m*) vode unutar 100 minuta te da brzina procesa ovisi o stupnju deacetilacije kitozana (Mucha i sur., 2005). Kod visoke relativne vlažnosti (RH > 60%), apsorpcija vode je intenzivnija te se sadržaj vlage u kitozanu značajno povećava (No i Prinyawiwatkul, 2009; Despond i sur., 2001). Dugotrajno skladištenje pri uvjetima visoke relativne vlažnosti ubrzava hidrolitičku razgradnju kitozana i utječe na njegova fizičko-kemijska i biološka svojstva. Tako je ispitivanje stabilnosti kitozanskih tableta skladištenih šest mjeseci pri relativnoj vlažnosti od 70% pokazalo da posjeduju lošija mehanička svojstva od onih skladištenih pri relativnoj vlažnosti od 60% (Viljoen i sur., 2014). U slučaju polučvrstih kitozanskih sustava, skladištenje u uvjetima visoke relativne vlažnosti utječe na profil oslobađanja lijeka. Tako je povećanje relativne vlažnosti od 0% do 75% rezultiralo opsežnijim bubrenjem kitozanskog filma i posljedično bržim oslobađanjem lijeka (Kurek i sur., 2014). Također, prekomjerna hidratacija pri visokoj relativnoj vlažnosti može oslabiti mukoadhezivna svojstva kitozana zbog smanjenja broja slobodnih funkcionalnih skupina dostupnih za interakciju s mucinom (Smart, 2005).

Temperatura utječe na sadržaj vlage u kitozanskim terapijskim sustavima. Uočeno je da izloženost povišenoj temperaturi (40°C) uzrokuje značajan gubitak vlage (dehidraciju kitozana) i posljedično smanjenje tvrdoće i mehaničke čvrstoće tableta (Viljoen i sur., 2014). Također, temperatura ima utjecaj i na stupanj razgradnje kitozana, posebno kod tekućih i polučvrstih sustava. Primjerice, skladištenje otopine kitozana pri temperaturi od 5°C nije rezultiralo značajnijom hidrolizom lanaca kitozana. Suprotno tome, skladištenje otopine kitozana pri sobnoj i pri povišenoj temperaturi rezultiralo je bržom razgradnjom kitozanskih lanaca te je hidroliza slijedila kinetiku prvog reda (Vårum i sur., 2001; Nguyen i sur., 2008). Ispitivanja stabilnosti otopine kitozana i glukoza 1-fosfata potvrdila su potrebu skladištenja u hladnjaku pri temperaturi od 2-8°C (Supper i sur., 2014).

1.5. Melatonin

Melatonin je N-acetil-5-metoksitriptamin, jednostavan metoksilirani i N-acetilirani produkt serotonina koji se može naći u epifizi. U biološkim se sustavima sintetizira iz aminokiseline L-triptofana (Slika 5.). Hidroksilacijom indolskog prstena L-triptofana i dekarboksilacijom aminokiselinskog međuprodukta nastaje serotonin koji zatim prelazi u melatonin djelovanjem dva enzima, serotonin N-acetiltransferaze i hidroksiindol-O-metiltransferaze. Budući da je razina aktivnosti hidroksiindol-O-metiltransferaze konstantna, dnevna sinteza melatonina je kontrolirana aktivnošću N-acetiltransferaze (Katzung i sur., 2011; Burgess Hickman i sur., 1999).



Slika 5. *Sinteza melatonina iz L-triptofana (Katzung i sur., 2011).*

Melatonin se proizvodi i oslobađa u prvom redu noću, pa je odgovoran za regulaciju ciklusa spavanja i budnosti. Oslobađanje se podudara s mrakom, obično počinje oko 9 uvečer

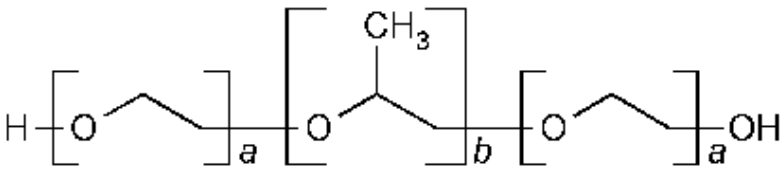
i traje do 4 ujutro, a smanjeno je pri danjem svjetlu. Trenutačno se melatonin koristi za prevenciju *jet lag* sindroma (poremećaj ciklusa spavanja i budnosti) i liječenje različitih poremećaja spavanja, uključujući nesanicu i sindrom odgođenog spavanja. Brojne druge funkcije melatonina također se istražuju, uključujući kontracepciju, zaštitu protiv endogenih oksidansa, prevenciju starenja te liječenje depresije, infekcije HIV-om i različitih karcinoma (Katzung i sur., 2011).

Receptori za melatonin (MT_1, MT_2 i MT_3) nalaze se u središnjem živčanom sustavu, te u pojedinim perifernim tkivima. Aktivacija MT_1 receptora dovodi do pospanosti, dok je aktivacija MT_2 receptora odgovorna za sinkronizaciju ciklusa svjetlo-mrak s biološkim satom za cjelodnevni ritam. Treća vrsta receptora za melatonin, MT_3, zapravo je enzim, te ima ulogu u regulaciji intraokularnog tlaka (Katzung i sur., 2011).

Melatonin posjeduje neka nepovoljna svojstava koja ograničavaju njegov terapijski potencijal. Osjetljiv je na svjetlost i oksidaciju te ima nisku oralnu bioraspoloživost zbog varijabilne apsorpcije i opsežnog prvog prolaska kroz jetru pa se ukazuje potreba za novim načinima primjene i razvojem odgovarajućeg sustava za isporuku lijeka (Hafner i sur., 2009).

1.6. Poloksamer 407

Poloksamer 407 (P407) je neionski, hidrofilni ABA-tip triblok kopolimer građen od polioksietilenskih (70 %, A) i polioksipropilenskih (30%, B) jedinica (Slika 6.). Kao surfaktant posjeduje svojstva poput močenja i solubilizacije, široko je korišten u farmaceutske i medicinske svrhe (Bharadwaj i Blanchard, 1996).



Slika 6. *Kemijska struktura poloksamera 407*

Poloksamer 407 stvara micele u vodenom mediju. Povećanjem temperature vodene otopine poloksamera, dolazi do agregacije kopolimernih molekula u sferične micele građene

od dehidrirane polioksipropilenske (PPO) jezgre i vanjske ovojnice od hidriranih polioksietilenskih (PEO) lanaca. Vodena otopina poloksamera 407 koncentracije iznad 20 %, pokazuje jedinstveno svojstvo reverzibilnog termalnog geliranja; Transformira se iz otopine niske viskoznosti u polučvrsti gel nakon zagrijavanja s temperature od 4°C na sobnu (25°C) ili tjelesnu (37°C) temperaturu.

Svojstva poput reverzibilnog termalnog geliranja, sposobnosti stvaranja bistrog gela u vodenom mediju, visokog kapaciteta solubilizacije i niske toksičnosti čine poloksamer 407 prikladnim sredstvom za pripravu terapijskih sustava s kontroliranim oslobađanjem lijekova. Također, micelarna priroda polimera u vodenom mediju pokazala se prikladnom za uklapanje hidrofilnih i hidrofobnih lijekova (Kang i sur., 2007; Bharadwaj i Blanchard, 1996).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mikrosfere se već dulje vrijeme intenzivno istražuju kao terapijski sustavi za ciljanu dostavu i kontrolirano oslobađanje lijeka. Polimerni nosač omogućuje polagano, kontrolirano i predvidljivo oslobađanje lijeka, te se stoga smanjuje učestalost doziranja. Povećanje kemijske stabilnosti različitih lijekova mikrokapsuliranjem nedvojbeno je dokazano (Martinac i sur., 2005).

Sušenje raspršivanjem koristi se kao tehnika mikrokapsuliranja koja omogućuje stvaranje mikročestica sastavljenih od lijeka i polimera prethodno otopljenih ili dispergiranih u prikladnom vodenom ili organskom mediju. Priprema mikročestica procesom sušenja raspršivanjem uključuje uklanjanje otapala uz stvaranje čestica dobro definirane morfologije, fizičko-kemijskih svojstava i profila oslobađanja uklopljenog lijeka (Dürrigl i sur., 2011).

Kitozan, jedan od prirodnih multifunkcionalnih polimera, zbog svojih jedinstvenih i prilagodljivih bioloških svojstava kao što su biorazgradljivost, biokompatibilnost i bioadhezivnost, smatra se korisnim ekscipijensom u farmaceutskoj tehnologiji. Provedena su brojna istraživanja s ciljem razvoja sigurnih i učinkovitih kitozanskih terapijskih sustava, no problem nedostatne stabilnosti ograničava njihovu praktičnu primjenu. Stoga je u fazi razvoja kitozanskog terapijskog sustava važno razmatrati i njegovu stabilnost (Szymanska i Winnicka, 2015).

Razvijeno je nekoliko strategija poboljšanja stabilnosti kitozanskih terapijskih sustava, kao što je dodatak stabilizacijskog sredstva tijekom procesa priprave, ionskog ili kemijskog umreživača i miješanje s drugim hidrofilnim polimerom, no budući da nema univerzalnog načina koji bi osigurao maksimalnu stabilnost sustava tijekom skladištenja, neophodno je provesti predformulacijska ispitivanja i utvrditi kako se kvaliteta kitozanskog terapijskog sustava mijenja s vremenom pod utjecajem okolišnih čimbenika kao što su relativna vlažnost i temperatura, odnosno odrediti najprikladnije uvjete skladištenja (Szymanska i Winnicka, 2015).

U ovom radu pripravljene su kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom prethodno optimiranom metodom sušenja raspršivanjem (Duvnjak Romić i sur., 2016). Za izradu mikrosfera korišten je kitozan molekulske mase 150 kDa i stupnja deacetilacije 84,5 %, te poloksamer 407. Glavni cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost

pripravljenih mikrosfera u ovisnosti o njihovom sastavu i uvjetima skladištenja. Mikrosfere su skladištene pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%. Stabilnost mikrosfera procijenjena je praćenjem srednjeg geometrijskog promjera, raspodjele veličine mikročestica i površinskog naboja tijekom šestomjesečnog skladištenja, te određivanjem sadržaja uklopljenog lijeka nakon šestomjesečnog i dvogodišnjeg skladištenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi ovog diplomskog rada kao djelatna tvar korišten je melatonin (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Njemačka). Za pripravu mikrosfera, kao polimeri-nosači djelatne tvari upotrebljeni su kitozan niske viskoznosti (Mr ~ 150 000, stupnja deacetilacije 84,5 %, Fluka BioChemika, SAD) i poloksamer 407 (P407) (zaštićeni naziv: Pluronic® F127, $EO_{100}PO_{65}EO_{100,}$ Mr~ 12 600, BASF, Njemačka).

Ostale korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće, proizvođača Kemika, Hrvatska. Koncentrirana octena kiselina korištena je za pripravu otopine kitozana. Etanol (96%) je korišten za pripravu otopine melatonina i poloksamera 407, a otopina NaCl (10 mM) je korištena za suspendiranje mikrosfera prije mjerenja zeta-potencijala. U svim je pokusima upotrebljavana pročišćena voda.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada mikrosfera

Prvo je pripremljena otopina kitozana koncentracije 1% (*m*/*V*), otapanjem odgovarajuće količine kitozana u 0,5% (*V*/*V*) vodenoj otopini octene kiseline. Otopina je, nakon neprekidnog miješanja na magnetskoj miješalici tijekom 24 h, filtrirana.

Za pripravu poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom (uzorak MCP), pripremljena je etanolna otopina melatonina i poloksamera 407 otapanjem 0,4 g melatonina i 0,16 g poloksamera 407 u 20 ml 96% otopine etanola. Pripravljena etanolna otopina pomiješana je s 80 g 1% (*m*/*V*) otopine kitozana na magnetskoj mješalici.

Isti postupak ponovljen je i za pripravu kitozanskih mikrosfera s melatoninom (uzorak MC), uz izostavljanje poloksamera 407.

Prazne mikrosfere (uzorci CP i C) pripremljene su slijedeći opisanu proceduru, uz izostavljanje lijeka iz postupka.

Mikrosfere su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem u struji vrućeg zraka korištenjem laboratorijskog uređaja za raspršivanje (Mini Spray Dryer Büchi 190, Flawil, Švicarska) i pri sljedećim procesnim parametrima: temperaturi ulaznog zraka od 145ºC,

protoku zraka od 700 Nlh^{-1} , brzini protoka uzorka od 2,59 $mlmin^{-1}$. Korištena je standardna sapnica promjera 0,7 mm. Detaljan sastav pripremljenih otopina za raspršivanje, odnosno odgovarajućih uzoraka mikrosfera prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. *Sastav otopina za raspršivanje, odnosno odgovarajućih uzoraka mikrosfera.*

	UZORAK			
	MCP	MC	CP	C
Melatonin / g	0,4	0,4	/	/
P407 / g	0,16	/	0,16	/
Etanol (96%) / ml	20	20	20	20
Otopina kitozana (1%) / g	80	80	80	80

3.2.2. Određivanje iskorištenja, uspješnosti uklapanja lijeka i sadržaja lijeka

Iskorištenje procesa (I; %) izračunato je kao omjer mase mikrosfera i ukupne mase suhe tvari u otopini sušenoj raspršivanjem pomnožen sa 100 :

$$I\ (\%) = \frac{masa\ mikrosfera}{masa\ suhe\ tvari\ u\ otopini} \times 100 \qquad (1)$$

Sadržaj melatonina u mikrosferama određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Prije mjerenja, odgovarajuća količina mikrosfera dispergirana je u 1 M HCl. Disperzija je nakon soniciranja i filtriranja (0.45 μm) razrijeđena smjesom etanola (96%) i pročišćene vode u omjeru 1:4. Kromatografska analiza provedena je pomoću uređaja Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Njemačka), pri valnoj duljini od 224 nm. Mobilna se faza sastojala od vode kromatografskog stupnja čistoće i acetonitrila u volumnom omjeru 52:48. Protok mobilne faze bio je 1 ml/min. Temperatura kolone (Kinetex C18, 50 × 4,6 mm^2, veličina čestica 5 mm, Phenomenex, SAD) s pripadnim filterom (KrudKatcher Ultra HPLC, 0,5 μm Depth Filter ×

0,004 in., Phenomenex, SAD) bila je 30°C. Volumen injektiranja bio je 10 µl. Izokratno eluiranje trajalo je 1 min (Duvnjak Romić i sur., 2016).

Uspješnost uklapanja (UU; %) melatonina u mikrosfere definirana je omjerom mase lijeka u mikrosferama i mase lijeka uporabljenog u pripravi mikrosfera:

$$\text{UU (\%)} = \frac{stvarna\ masa\ lijeka\ u\ mikrosferama}{teorijska\ masa\ lijeka\ u\ mikrosferama} \times 100 \qquad (2)$$

Sadržaj lijeka (SL; %) u mikrosferama izražen je kao postotni udio lijeka u mikrosferama (*m*/*m*), te se računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{SL(\%)} = \frac{stvarni\ sadržaj\ lijeka}{ispitivana\ količina\ mikrosfera} \times 100 \qquad (3)$$

3.2.3. Određivanje zeta-potencijala mikrosfera

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija). U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica upotrebljen je 10 mW He-Ne laser. Zeta-potencijal mikrosfera određen je nakon suspendiranja mikrosfera u 10 mM otopini NaCl. Mjerenja su provođena pri temperaturi 25ºC.

3.2.4. Određivanje veličine i raspodjele veličina mikrosfera

Veličina čestica i raspodjela veličine čestica određena je mikroskopskom analizom slike (engl. *Image analysis*) pomoću mikroskopa (Olympus BH-2, SAD) opremljenog kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan). Digitalizirana slika je analizirana kompjuterskim sustavom za analizu slike (Optomax V, Velika Britanija). Uzorci naneseni u vrlo tankom jednoličnom sloju na predmetno stakalce promatrani su pod mikroskopom uz povećanje od 200 puta. Izmjereno je najmanje 1500 čestica po uzorku te su iz dobivenih raspodjela veličina izračunati srednji geometrijski promjeri.

3.2.5. Ispitivanje stabilnosti

Nakon sušenja raspršivanjem, uzorci su čuvani u dobro zatvorenim plastičnim spremnicima pri temperaturi od 4-8 ºC te pri temperaturi od 25ºC i relativnoj vlažnosti od 60% u razdoblju od dvije godine. U određenim vremenskim točkama (odmah nakon pripreme – dan 1 i nakon jednog, dva, tri i šest mjeseci skladištenja) provedena je karakterizacija mikrosfera s obzirom na srednji geometrijski promjer, raspodjelu veličina čestica i zeta-potencijal, dok je sadržaj uklopljenog lijeka određen nakon šestomjesečnog i dvogodišnjeg skladištenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava mikrosfera

Kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom uspješno su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem je mehanički postupak transformacije tekućeg uzorka (otopine, emulzije, suspenzije) u čvrsti oblik raspršivanjem u zagrijanom, plinovitom mediju za sušenje. Postupak je jednostavan, brz, reproducibilan te ga je lako prilagoditi industrijskoj proizvodnji (Call i Sollohub, 2010).

Na formiranje mikročestica i njihova fizičko-kemijska svojstva utječu i procesni i formulacijski parametri. Procesni parametri uključuju ulaznu i izlaznu temperaturu te brzinu protoka zagrijanog zraka, brzinu protoka uzorka i tlak na sapnici (protok komprimiranog zraka kroz sapnicu). Formulacijski parametri odnose se na tip raspršivanog uzorka (otopina, emulzija, suspenzija), vrstu otapala, koncentraciju lijeka i polimera te viskoznost raspršivanog uzorka. Proces sušenja raspršivanjem vodi se pri definiranoj ulaznoj temperaturi i brzini protoka zagrijanog zraka, te definiranoj brzini protoka uzorka i komprimiranog zraka kroz sapnicu. Izlazna temperatura zagrijanog zraka jednako kao i veličina kapljica, iskorištenje samog postupka i fizičko-kemijska svojstva formiranih mikročestica (veličina čestica, sadržaj vlage u uzorku, higroskopnost), ovise o međudjelovanju navedenih procesnih i formulacijskih parametara (Call i Sollohub, 2010). Stoga je proces sušenja važno optimirati uzimavši u obzir međuovisnost kritičnih parametara, kako bi svojstva produkta bila zadovoljavajuća.

Dosadašnja istraživanja kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom donose neke spoznaje o povezanosti procesnih i formulacijskih parametara i obilježja mikrosfera; Ulazna temperatura, brzina protoka zagrijanog zraka, udio poloksamera 407 i koncentracija kitozana značajno utječu na iskorištenje procesa. Povećanje ulazne temperature i brzine protoka zraka rezultira smanjenjem iskorištenja. Nasuprot tome, bolje iskorištenje postiže se dodatkom poloksamera 407 i uz veću koncentraciju kitozana. Zeta-potencijal također je ovisan o ulaznoj temperaturi i udjelu poloksamera 407. Povećanje ulazne temperature i dodatak poloksamera 407 smanjuje površinski naboj mikrosfera, a najveći učinak na vrijednosti zeta-potencijala pokazuje koncentracija kitozana. Nadalje, povećanje ulazne temperature te koncentracije kitozana i melatonina uzrokuje smanjenje sadržaja vlage, dok povećan protok zraka rezultira povećanjem sadržaja vlage. Pokazano je da procesni i

fomulacijski parametri nemaju bitnog utjecaja na veličinu čestica (Duvnjak Romić i sur., 2016).

Uspješna priprava mikrosfera s melatoninom sušenjem raspršivanjem podrazumijeva konačan suhi produkt niskog sadržaja vlage, bez tendencije aglomeracije, pozitivnog površinskog naboja mikrosfera te zadovoljavajuće iskorištenje procesa. Optimalni uvjeti priprave kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera obuhvaćaju sušenje raspršivanjem vodeno-etanolne otopine sastavnica u kojoj je kitozan prisutan u koncentraciji od 8 g/l (dajući veće vrijednosti zeta-potencijala i niži sadržaj vlage), i u masenom omjeru prema melatoninu od 2/1 (dajući niži sadržaj vlage) pri ulaznoj temperaturi od 145ºC (dajući veće iskorištenje i vrijednosti zeta potencijala) i protoku zraka od 2,59 ml/min (dajući veće vrijednosti iskorištenja i niži sadržaj vlage) (Duvnjak Romić i sur., 2016). Uvjeti priprave mikrosfera korišteni u ovome radu odgovaraju optimalnim uvjetima određenim u istraživanju Duvnjak Romić i suradnika (2016) i prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. *Procesni i formulacijski parametri korišteni u pripravi mikrosfera*

Parametar	
1 – Koncentracija kitozana	8 g/l
2 – Omjer kitozana i melatonina (*m*/*m*)	2/1
3 – Omjer kitozana i P407 (*m*/*m*)	5/1
4 – Ulazna temperatura	145°C
5 – Protok zraka	2,59 ml/min

U ovom radu pri pripravi mikrosfera korišten je kitozan niske viskoznosti, molekulske mase 150 000 Da i stupnja deacetilacije 84,5 %. Kitozanske mikrosfere s melatoninom označene su kao MC, dok su poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom označene kao MCP. Usporedbe radi, pripremljene su i prazne kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere označene kao C i CP.

4.2. Iskorištenje procesa i uspješnost uklapanja lijeka

Iskorištenja procesa priprave kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera sa i bez melatonina, kao i uspješnost uklapanja lijeka, prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. *Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem i uspješnost uklapanja melatonina u kitozanske (MC) i poloksamersko-kitozanske mikrosfere (MCP).*

Uzorak	Iskorištenje (%)	Uspješnost uklapanja (% ± SD)
C	59,4	/
CP	45,9	/
MC	39,4	99,5 ± 0,9
MCP	44,2	100,1 ± 1,2

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se između 39 i 59 %. Relativno visoki prinos rezultat je prilagodbe tehnoloških parametara u preliminarnim studijama sušenja (Duvnjak Romić i sur., 2016). Slična iskorištenja priprave kitozanskih mikrosfera sušenjem raspršivanjem prethodno su objavljena u literaturi (Martinac i sur., 2005; Giuanchedi i sur., 2002). Iskorištenje ovisi tehničkim karakteristikama korištene aparature, ali i o učinkovitosti sakupljanja suhog produkta. Opažen gubitak čestica tijekom procesa sušenja raspršivanjem posljedica je prianjanja i zaostajanja čestica na stijenkama raspršivača. Nadalje, dobivene vrijednosti iskorištenja se mogu pripisati i maloj ukupnoj masi polimera i lijeka u uporabljenim otopinama za raspršivanje te gubitku najlakših i najmanjih čestica kroz izlazni otvor ciklona (Pavanetto i sur., 1992; Giuanchedi i sur., 2002; Martinac i sur., 2005). Gubitak najlakših i najmanjih čestica moguće je spriječiti primjenom ciklona sa suženim promjerom te užim izlaznim otvorom koji može odvajati čestice manje od 0,44 μm, umjesto primjene standardnog ciklona koji odvaja čestice veće od 1,43μm (Maury i sur., 2005).

Uspješnost uklapanja melatonina u kitozanske (MC) i poloksamersko-kitozanske mikrosfere (MCP) iznosila je redom 99,5 ± 0,9 % i 100,1 ± 1,2 %. Dobivene vrijednosti su očekivane i ukazuju na uspješno uklapanje lijeka u oba sustava bez gubitka djelatne tvari tijekom procesa sušenja raspršivanjem (Duvnjak Romić i sur., 2016).

4.3. Stabilnost mikrosfera

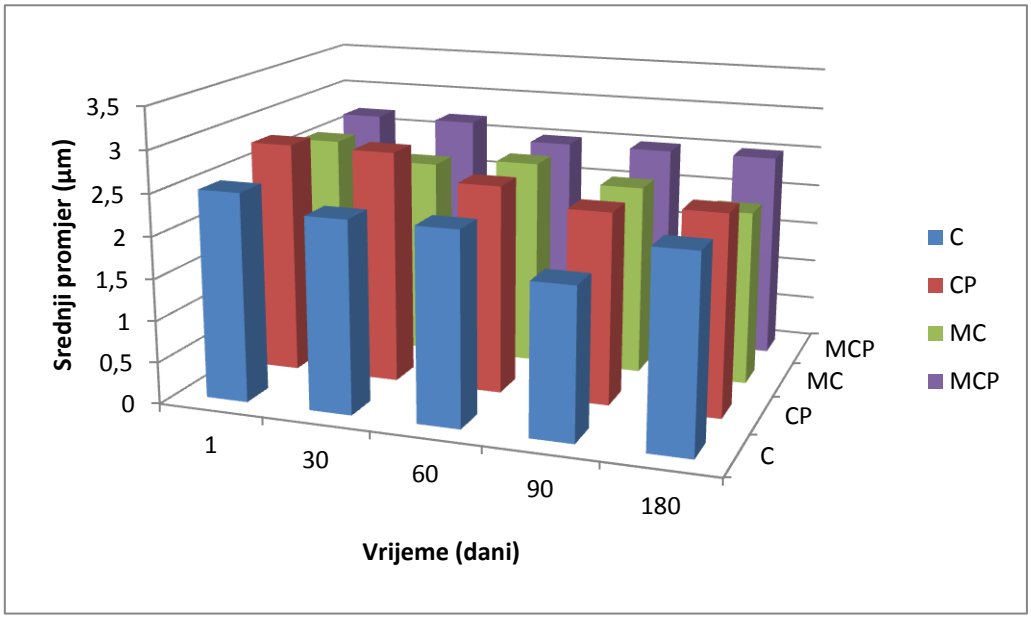
U ovom radu ispitivan je utjecaj temperature i relativne vlažnosti na stabilnost kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom; srednji geometrijski promjer, raspodjela veličine i zeta-potencijal mikrosfera praćeni su tijekom šestomjesečnog skladištenja, dok je sadržaj uklopljenog lijeka određen nakon šestomjesečnog i dvogodišnjeg skladištenja. Cilj je utvrditi kako se kvaliteta razvijenih terapijskih sustava mijenja s vremenom pod utjecajem okolišnih čimbenika i u ovisnosti o sastavu mikrosfera, odnosno odrediti prikladne uvjete njihovog skladištenja. Dodatno su karakterizirane i odgovarajuće mikrosfere bez uklopljenog lijeka.

4.3.1. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera

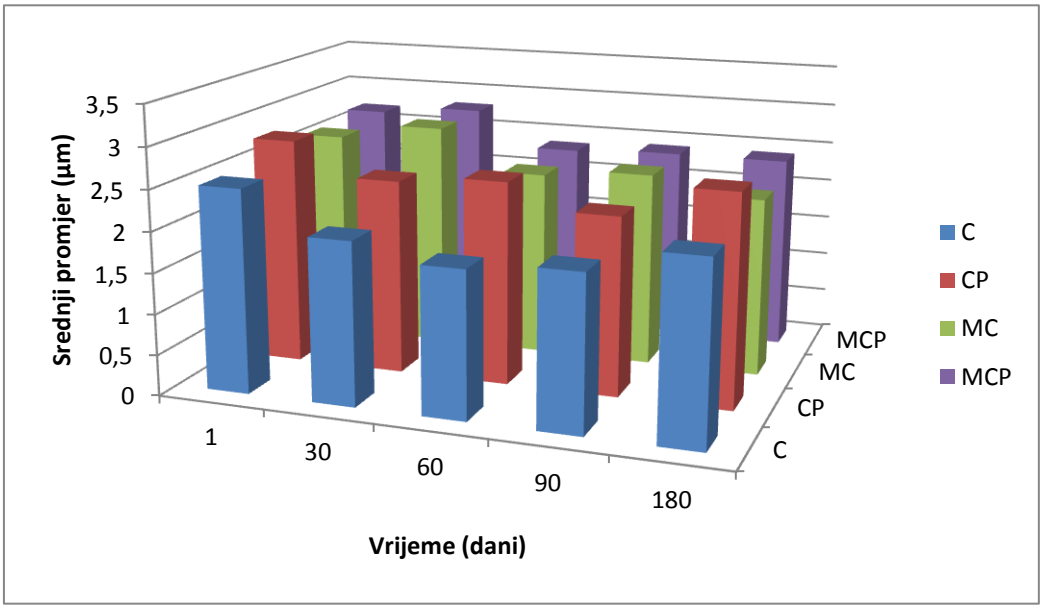
Poznavanje veličine čestica ishodnih sirovina i gotovih pripravaka vrlo je važno za oblikovanje, skladištenje, stabilnost i terapijski učinak lijeka (Jalšenjak i sur., 1998).
Uz nekoliko iznimaka, mikrosfere pripremljene metodom sušenja raspršivanjem su sferičnog oblika i njihova veličina može biti opisana geometrijskim promjerom. Geometrijski promjer je važan parametar koji utječe na sile kojima čestice podliježu tokom tečenja i na pakiranje čestica tijekom formiranja praška. Često se koristi kao referentna vrijednost jer je direktno mjerljiv ultramikroskopskim tehnikama (Vehring, 2008).

Veličina mikrosfera određena je mikroskopskom analizom slike (engl. *Image analysis*) i kompjuterskom obradom slike (Optomax V, Cambridge). Srednji geometrijski promjeri mikrosfera odmah po pripravi i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri različitim uvjetima prikazani su na Slici 7. i 8.

Mikrosfere pripravljene metodom sušenja raspršivanjem odgovarajuće su veličine i u skladu su s prethodno ostvarenim rezultatima za iste sustave (Duvnjak Romić i sur., 2016). Srednji geometrijski promjeri kitozanskih mikrosfera s melatoninom (MC) i praznih kitozanskih mikrosfera (C) iznosili su redom 2,6 μm i 2,5 μm. Srednji geometrijski promjer poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom (MCP) iznosio je 2,7 μm, dok je srednji promjer praznih mikrosfera (CP) iznosio 2,8 μm. Opažene razlike u srednjim geometrijskim promjerima nisu značajne i nemaju učinak na svojstva mikrosfera (Duvnjak Romić i sur., 2016).



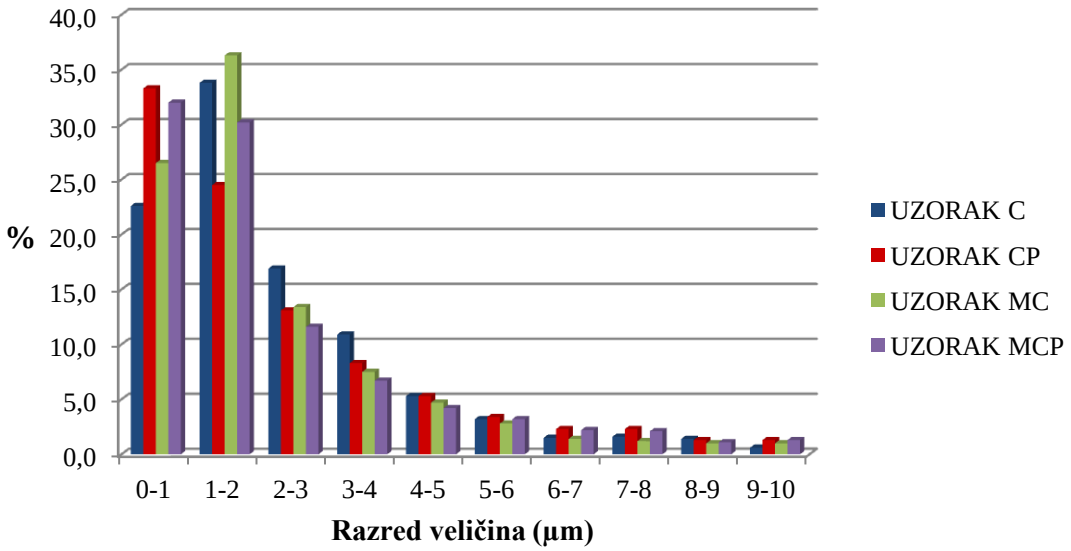
Slika 7. *Srednji geometrijski promjer kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C,CP) odmah po pripravi i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4 - 8°C. Prikazane su srednje vrijednosti; standardna devijacija ≤0,2 (n=3)*



Slika 8. *Srednji geometrijski promjer kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C, CP) odmah po pripravi i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%. Prikazane su srednje vrijednosti; standardna devijacija ≤0,2 (n=3)*

Raspodjela veličina mikrosfera odmah po pripravi prikazana je na Slici 9. Tijekom šestomjesečnog skladištenja, raspodjela veličina za sve uzorke odgovarala je početnim izmjerenim vrijednostima (podaci nisu prikazani).

Analiza ukazuje da su sve pripravljene mikrosfere imale ujednačenu i relativno usku raspodjelu veličina čestica s oko 90% mikrosfera promjera manjeg od 5 µm. Također je vidljivo da je 56 % kitozanskih (uzorak C), 57 % poloksamersko-kitozanskih (uzorak PC) odnosno 62 % kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom (uzorci MC i MCP) promjera manjeg od 2 µm. Mala veličina mikrosfera može se pripisati relativno niskoj viskoznosti otopine za raspršivanje (niskih koncentracija otopljenih tvari) i visokom tlaku raspršivanja otopine.



Slika 9. *Raspodjela veličina kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C, CP)*

Zaključno, nakon šestomjesečnog skladištenja uzoraka u zatvorenim spremnicima pri temperaturi od 4-8 ºC te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti 60%, opaženo je da se veličina i raspodjela veličina mikrosfera nije značajno promijenila te je bila prihvatljiva za sve uzorke što ukazuje da vrijeme i uvjeti uskladištenja nisu utjecali na navedena svojstva mikrosfera.

4.3.2. Zeta – potencijal mikrosfera

Zeta-potencijal mikrosfera određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) nakon suspendiranja mikrosfera u 10 mM otopini NaCl. Zeta-potencijal je važna mjera interakcije mikrosfera s negativno nabijenim površinama, a praćenje stabilnosti zeta-potencijala omogućuje uočavanje promjena površinskih svojstava čestica.

Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. *Zeta-potencijal kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C, CP). Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).*

Uzorak	Zeta-potencijal (mV)
C	33,7 ± 1,0
CP	22,9 ± 1,1
MC	33,6 ± 1,2
MCP	29,0 ± 2,0

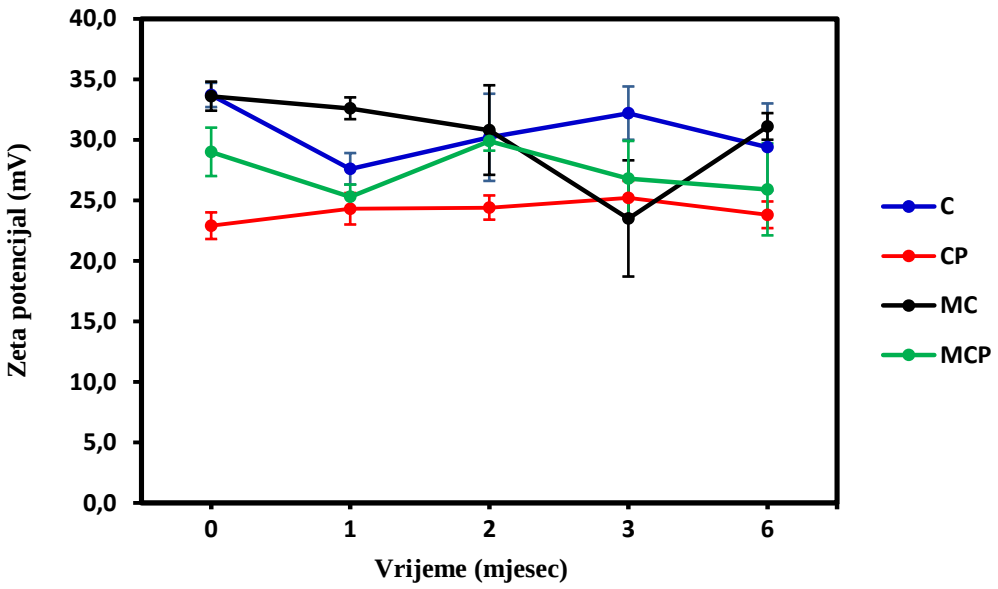
Vrijednosti zeta-potencijala su pozitivne za sve pripravljene mikrosfere (kreću se između 22,9 i 33,6 mV) što ukazuje na prisutnost kitozana na njihovoj površini. Slobodne amino skupine kitozana odgovorne su za pozitivan zeta-potencijal (Martinac i sur., 2005) i zaslužne za mukoadhezivna svojstva kitozana što je rezultat ionskih interakcija između pozitivno nabijenih amino skupina polimera i negativno nabijene sijalinske kiseline i sulfatnih ostataka glikoproteina mucina (Kassem i sur., 2014). Vrijednosti zeta-potencijala pripravljenih kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera odgovaraju prethodno objavljenim vrijednostima (Duvnjak Romić i sur., 2016).

Najveću vrijednost zeta-potencijala pokazuju prazne kitozanske mikrosfere (33,7 ± 1,0 mV) i kitozanske mikrosfere s melatoninom (33,6 ± 1,2 mV). Očekivano, dodatak poloksamera 407 u otopine za raspršivanje smanjuje površinski naboj mikrosfera (Duvnjak Romić i sur., 2016; Huang i sur., 2003). Tako je zeta-potencijal praznih poloksamersko-kitozanskih mikrosfera iznosio 22,9 ± 1,1 mV, dok je zeta-potencijal poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom iznosio 29,0 ± 2,0 mV. Opisano smanjenje vrijednosti

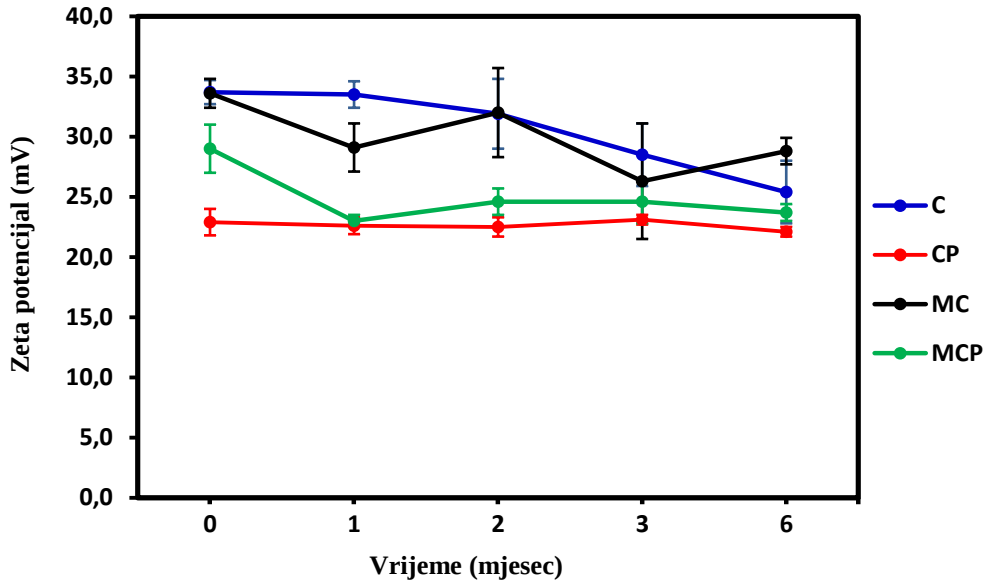
zeta-potencijala ukazuje na prisutnost neutralnog poloksamera 407 na površini mikrosfera (Duvnjak Romić i sur., 2016).

Martinac i sur. (2005) objavili su utjecaj uklopljenog lijeka na zeta-potencijal mikrosfera. Opaženo je smanjenje zeta-potencijala s povećanjem sadržaja lijeka u sustavu, ali takvi rezultati nisu dobiveni u ovome istraživanju. Iz usporedbe odgovarajućih praznih mikrosfera i mikrosfera s melatoninom, možemo zaključiti da melatonin uklopljen u kitozanske mikrosfere nije imao utjecaj na zeta-potencijal, dok je uklapanje melatonina u poloksamersko-kitozanske mikrosfere rezultiralo povećanjem zeta-potencijala čestica.

Zeta-potencijal mikrosfera nije se značajnije mijenjao tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4-8 °C (Slika 10.), dok je u slučaju mikrosfera skladištenih pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% zapaženo blago smanjenje površinskog naboja kitozanskih mikrosfera (C i MC; Slika 11.).



Slika 10. *Zeta-potencijal kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C, CP) odmah po pripravi i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4 - 8°C (srednje vrijednosti ± SD).*



Slika 11. *Zeta potencijal kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom i praznih mikrosfera (C, CP) odmah po pripravi i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% (srednje vrijednosti ± SD).*

4.3.3. Sadržaj lijeka

Sadržaj lijeka određen je kao postotni udio (*m*/*m* %) melatonina u ispitivanoj količini mikrosfera. Nakon šestomjesečnog skladištenja, nije zabilježena promjena sadržaja uklopljenog melatonina u mikrosferama, neovisno o njihovom sastavu i uvjetima skladištenja. Tablica 5. prikazuje uspješnost uklapanja odnosno sadržaj melatonina u mikrosferama nakon dvogodišnjeg skladištenja u usporedbi sa sadržajem melatonina u mikrosferama odmah po pripravi. Iz prikazanih rezultata razvidno je da je stabilnost mikrosfera s obzirom na sadržaj lijeka ovisila o njihovom sastavu, ali ne i o uvjetima skladištenja. Naime, sadržaj lijeka u mikrosferama istog sastava skladištenim pri različitim uvjetima (4-8°C *vs* 25°C/60% RH) nije se značajnije razlikovao. S druge strane, u slučaju kitozanskih mikrosfera zabilježen je blagi pad u sadržaju melatonina nakon dvogodišnjeg skladištenja, dok su nakon istog razdoblja poloksamersko-kitozanske mikrosfere sadržavale jednaku količinu melatonina kao i odmah nakon priprave, neovisno o uvjetima skladištenja (Tablica 5.). Iz toga se može zaključiti da je dodatak poloksamera poboljšao stabilnost pripravljenih mikrosfera s obzirom na sadržaj uklopljenog lijeka. Pozitivan utjecaj poloksamera na stabilnost kitozanskih terapijskih sustava već je zabilježen u literaturi (Szymanska i Winnicka, 2015).

Tablica 5. *Uspješnost uklapanja (UU)* i *sadržaj lijeka (SL) kitozanskih (MC) i poloksamersko-kitozanskih (MCP) mikrosfera s melatoninom odmah po pripravi i nakon dvogodišnjeg skladištenja pri temperaturi od 4-8°C i pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti (RH) od 60% (srednje vrijednosti ± SD; n=3).*

	MC		MCP	
	UU (%)	SL (%)	UU (%)	SL (%)
Odmah po pripravi	100,1±1,2	33,2±0,2	99,5±0,9	29,4±1,2
Nakon 2 godine skladištenja pri 4-8°C	93,4±0,4	31,8±0,1	97,1±1,1	28,8±0,2
Nakon 2 godine skladištenja pri 25°C/60% RH	91,2±1,1	31,3±0,3	97,4±0,7	28,9±0,2

Zaključno, rezultati provedenog ispitivanja upućuju na veću stabilnost poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom u odnosu na kitozanske mikrosfere s uklopljenim istim lijekom, te potvrđuju svrsishodnost dodatka poloksamera u kitozanske terapijske sustave s ciljem optimiranja njihovih fizičko-kemijskih svojstava.

5. ZAKLJUČCI

- Kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom uspješno su pripremljene tehnikom sušenja raspršivanjem uz iskorištenje procesa od 39 do 59%.

- Oba tipa mikrosfera karakterizirana su velikom uspješnošću uklapanja melatonina, relativno uskom raspodjelom veličina čestica s oko 90% mikrosfera promjera manjeg od 5 μm, te pozitivnim zeta-potencijalom.

- Pripravljene kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere imale su zadovoljavajući sadržaj melatonina od 33,2 ± 0,2 %, odnosno 29,4 ± 1,2 %.

- Poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4-8°C kao i pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%.

- Kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4-8°C dok je pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% uočen blagi pad zeta-potencijala mikrosfera.

- Stabilnost mikrosfera s obzirom na sadržaj lijeka ovisila je o sastavu mikrosfera, ali ne i o uvjetima čuvanja. Sadržaj uklopljenog lijeka u poloksamersko-kitozanske mikrosfere ostao je očuvan i nakon šestomjesečnog i nakon dvogodišnjeg skladištenja pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%, dok je u slučaju kitozanskih mikrosfera zabilježen blagi pad u sadržaju lijeka nakon dvogodišnjeg skladištenja pri istim uvjetima.

6. LITERATURA

Bharadwaj R, Blanchard J. Controlled-release delivery system for the alpha-MSH analog Melanotan-I using poloxamer 407. *J Pharm Sci*, 1996, 85, 915–9.

Burgess Hickman A, Klein DC, Dyda F. Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å Resolution Suggests a Catalytic Mechanism. *Mol Cell*, 1999, 3, 23–32.

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

Despond S, Espuche E, Domard A. Water sorption and permeation in chitosan films: Relation between gas permeability and relative humidity. *J Poly Sci B Polym Phys*, 2001, *39*, 3114–3127.

Dürrigl M, Lusina Kregar M, Hafner A, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J. Muciprocin calcium microencapsulation via spray drying: feed solvent influence on microparticle properties, stability and antimicrobial activity. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37, 1402-1414.

Duvnjak Romić M, Šegvić 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.

Giunchedi P, Juliano C, Gavini E, Cossu M, Sorrenti M. Formulation and in vivo evalution of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 2002, 53, 233-9.

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, 205-2013.

Huang YC, Chiang CH, Yeh MK. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. *J Microencapsul*, 2003, 20, 247-260.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb: Školska knjiga; 1998.

Kang ML, Jiang HL, Kang SG, Guo DD, Lee DY, Cho CS, Yoo HS. Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of Bordetella bronchiseptica antigens containing dermonecrotoxin. *Vaccine*, 2007, 25, 4602–4610.

Kas HS. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul*, 1997, 14, 689–711.

Kassem MA, ElMeshad AN, Fares AR. Lyophilized sustained release mucoadhesive chitosan sponges for buccal buspirone hydrochloride delivery: Formulation and in vitro evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 6, 1–11.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

Kurek M, Guinault A, Voilley A, Galić K, Debeaufort F. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chem*, 2014, *144*, 9–17.

Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y. Enzymatic degradation of β-chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr Polym*, 2000, *42*, 19–21.

Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J Control Release*, 2014, 178, 25-45.

Lin R, Shi Ng L, Wang CH. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials*, 2005, 26, 4476-4485.

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.

Maury M, Murphy K, Kumar S, Shi L, Lee G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59, 565-573.

Mucha M, Pawlak A. Complex study on chitosan degradability. *Polymer*, 2002, 47, 43–51.

Mucha M, Ludwiczak S, Kawińska M. Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol). *Carbohydr Polym*, 2005, *62*, 42–49.

Muzzarelli, RAA. Chitin. Pergamon Press, New York, 1977, str. 1–37.

Nguyen TTB, Hein S, Ng CH, Stevens WF. Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions. *J Appl Polym Sci*, 2008, *107*, 2588–2593.

No HK, Prinyawiwatkul W. Stability of chitosan powder during long-term storage at room temperature. *J Agric Food Chem*, 2009, *57*, 8434–8438.

Pavanetto F, Conti B, Genta I, Giunchedi P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Int J Pharm*, 1992, 84, 151-159.

Ré M-I. Formulation drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology*, 2006, 24, 433-446.

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Inter J Pharm*, 2004, 274, 1–33.

Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, *57*, 1556–1568.

Supper S, Anton N, Boisclair J, Seidel N, Riemenschnitter M, Curdy C, Vandamme T. Chitosan/glucose 1-phosphate as new stable *in situ* forming depot system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, *88*, 361–373.

Szymanska E, Winnicka K. Stability of chitozan – a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs*, 2015, 13, 1819-1846.

Vårum KM, Ottϕy MH, Smisrϕd O. Acid hydrolysis of chitosan. *Carbohydr Polym*, 2001, *46*, 89–98.

Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, 2008, 25, 999-1022.

Viljoen JM, Steenekamp JH, Marais AF, Kotzé AF. Effect of moisture content, temperature and exposure time on the physical stability of chitosan powder and tablets. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, *40*, 730–742.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Mikrosfere temeljene na kitozanu intenzivno se istražuju kao mukoadhezivni terapijski sustavi kontroliranog oslobađanja lijeka. Često se pripravljaju tehnikom sušenja raspršivanjem, koja omogućuje pripremu mikročestica željenih fizičko-kemijskih svojstava. Stabilnost mikročestica uvjetovana je svojstvima djelatne i pomoćnih tvari iz kojih su građene, ali i samim procesom formiranja čestica tijekom sušenja raspršivanjem, što je potrebno uzeti u obzir pri razvoju stabilnog produkta.

U ovom radu pripravljene su kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom prethodno optimiranom metodom sušenja raspršivanjem. Glavni cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost pripravljenih mikrosfera u ovisnosti o njihovom sastavu i uvjetima skladištenja. Mikrosfere su skladištene pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%. Stabilnost mikrosfera procijenjena je praćenjem srednjeg geometrijskog promjera, raspodjele veličine i površinskog naboja tijekom šestomjesečnog skladištenja, dok je sadržaj uklopljenog lijeka određen nakon šestomjesečnog i dvogodišnjeg skladištenja. Mikrosfere su karakterizirane prosječnom veličinom čestica od 2,5 do 2,8 μm, zeta-potencijalom od 29 do 34 mV, te velikom uspješnošću uklapanja melatonina (≥ 99,5 %). Pripravljene kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere imale su zadovoljavajući sadržaj melatonina od 33,2 ± 0,2 %, odnosno 29,4 ± 1,2 %. Kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4-8°C dok je pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% uočen blagi pad zeta-potencijala. Poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja neovisno o uvjetima skladištenja. Stabilnost mikrosfera s obzirom na sadržaj lijeka ovisila je o sastavu mikrosfera, ali ne i o uvjetima čuvanja. Sadržaj uklopljenog lijeka u poloksamersko-kitozanske mikrosfere ostao je očuvan i nakon šestomjesečnog i nakon dvogodišnjeg skladištenja pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%, dok je u slučaju kitozanskih mikrosfera zabilježen blagi pad u sadržaju lijeka nakon dvogodišnjeg skladištenja pri istim uvjetima. Rezultati provedenog ispitivanja upućuju na veću stabilnost poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom u odnosu na kitozanske mikrosfere s istim lijekom.

Chitosan-based microspheres have been extensively studied as mucoadhesive and controlled release drug delivery systems. One of the mostly used methods for their preparation is the spray-drying method, which allows for the creation of microparticles of desired physical-chemical properties. The stability of microparticles not only depends on the properties of the active pharmaceutical ingredient and excipients as microparticle constituents, but also on the particle-forming process during the spray drying, which should be taken into consideration when developing a stable product.

In this study, melatonin-loaded chitosan and poloxamer/chitosan microspheres were prepared using the previously optimised spray-drying method. The aim of this study was to test the stability of the prepared microspheres in relation to their composition and storage conditions. Microspheres were stored at the temperature of 4-8°C, and at the temperature of 25°C and relative humidity of 60%. The stability of microspheres was evaluated by monitoring the microsphere mean geometric diameter, size distribution and surface charge over six-month period and determining the content of the drug entrapped after 6-month and 2-year period of storage. Microspheres were characterised by mean diameter ranging between 2.5 and 2.8 μm, zeta-potential ranging between 29 and 34mV and high melatonin entrapment efficiency (≥ 99.5 %). The drug content in the chitosan and poloxamer/chitosan microspheres prepared was 33.2 ± 0.2% and 29.4 ± 1.2%, respectively. Melatonin-loaded chitosan microspheres preserved their physical properties during the six-month storage at the temperature of 4-8°C, while a mild decrease in zeta-potential was observed at a temperature of 25°C and the relative humidity of 60%. Melatonin-loaded poloxamer/chitosan microspheres preserved their physical properties during the six-month storage regardless of the storage conditions. Microsphere stability in terms of drug content depended on microsphere composition rather than storage conditions. Drug content in poloxamer/chitosan microspheres remained unchanged after 6-months and 2-years of storage at temperature of 4-8°C as well as at temperature of 25°C and relative humidity of 60%, while in case of chitosan microspheres, a slight decrease in drug content was observed after 2 years of storage at the same conditions. The results obtained within this investigation revealed higher stability of melatonin-loaded poloxamer/chitosan microspheres in relation to chitosan microspheres with the same drug entrapped.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

STABILNOST KITOZANSKIH I POLOKSAMERSKO-KITOZANSKIH MIKROSFERA S MELATONINOM PRIPRAVLJENIH SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Anja Đakmanec

SAŽETAK

Mikrosfere temeljene na kitozanu intenzivno se istražuju kao mukoadhezivni terapijski sustavi kontroliranog oslobađanja lijeka. Često se pripravljaju tehnikom sušenja raspršivanjem, koja omogućuje pripremu mikročestica željenih fizičko-kemijskih svojstava. Stabilnost mikročestica uvjetovana je svojstvima djelatne i pomoćnih tvari iz kojih su građene, ali i samim procesom formiranja čestica tijekom sušenja raspršivanjem, što je potrebno uzeti u obzir pri razvoju stabilnog produkta.

U ovom radu pripravljene su kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom prethodno optimiranom metodom sušenja raspršivanjem. Glavni cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost pripravljenih mikrosfera u ovisnosti o njihovom sastavu i uvjetima skladištenja. Mikrosfere su skladištene pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%. Stabilnost mikrosfera procijenjena je praćenjem srednjeg geometrijskog promjera, raspodjele veličine i površinskog naboja tijekom šestomjesečnog skladištenja, dok je sadržaj uklopljenog lijeka određen nakon šestomjesečnog i dvogodišnjeg skladištenja. Mikrosfere su karakterizirane prosječnom veličinom čestica od 2,5 do 2,8 μm, zeta-potencijalom od 29 do 34 mV, te velikom uspješnošću uklapanja melatonina (≥ 99,5 %). Pripravljene kitozanske i poloksamersko-kitozanske mikrosfere imale su zadovoljavajući sadržaj melatonina od 33,2 ± 0,2 %, odnosno 29,4 ± 1,2 %. Kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja pri temperaturi od 4-8°C dok je pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60% uočen blagi pad zeta-potencijala. Poloksamersko-kitozanske mikrosfere s melatoninom zadržale su fizička svojstva tijekom šestomjesečnog skladištenja neovisno o uvjetima skladištenja. Stabilnost mikrosfera s obzirom na sadržaj lijeka ovisila je o sastavu mikrosfera, ali ne i o uvjetima čuvanja. Sadržaj uklopljenog lijeka u poloksamersko-kitozanske mikrosfere ostao je očuvan i nakon šestomjesečnog i nakon dvogodišnjeg skladištenja pri temperaturi od 4-8°C te pri temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 60%, dok je u slučaju kitozanskih mikrosfera zabilježen blagi pad u sadržaju lijeka nakon dvogodišnjeg skladištenja pri istim uvjetima. Rezultati provedenog ispitivanja upućuju na veću stabilnost poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom u odnosu na kitozanske mikrosfere s istim lijekom.

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

Rad sadrži:	34 stranice, 11 grafičkih prikaza, 5 tablica i 34 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Kitozan; Melatonin; Poloksamer; Mikrosfere; Sušenje raspršivanjem; Ispitivanje stabilnosti
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

STABILITY OF MELATONIN-LOADED CHITOSAN AND POLOXAMER/CHITOSAN MICROSPHERES PREPARED BY SPRAY-DRYING METHOD

Anja Đakmanec

SUMMARY

Chitosan-based microspheres have been extensively studied as mucoadhesive and controlled release drug delivery systems. One of the mostly used methods for their preparation is the spray-drying method, which allows for the creation of microparticles of desired physical-chemical properties. The stability of microparticles not only depends on the properties of the active pharmaceutical ingredient and excipients as microparticle constituents, but also on the particle-forming process during the spray drying, which should be taken into consideration when developing a stable product.

In this study, melatonin-loaded chitosan and poloxamer/chitosan microspheres were prepared using the previously optimised spray-drying method. The aim of this study was to test the stability of the prepared microspheres in relation to their composition and storage conditions. Microspheres were stored at the temperature of 4-8°C, and at the temperature of 25°C and relative humidity of 60%. The stability of microspheres was evaluated by monitoring the microsphere mean geometric diameter, size distribution and surface charge over six-month period and determining the content of the drug entrapped after 6-month and 2-year period of storage. Microspheres were characterised by mean diameter ranging between 2.5 and 2.8 μm, zeta-potential ranging between 29 and 34mV and high melatonin entrapment efficiency (≥ 99.5 %). The drug content in the chitosan and poloxamer/chitosan microspheres prepared was 33.2 ± 0.2% and 29.4 ± 1.2%, respectively. Melatonin-loaded chitosan microspheres preserved their physical properties during the six-month storage at the temperature of 4-8°C, while a mild decrease in zeta-potential was observed at a temperature of 25°C and the relative humidity of 60%. Melatonin-loaded poloxamer/chitosan microspheres preserved their physical properties during the six-month storage regardless of the storage conditions. Microsphere stability in terms of drug content depended on microsphere composition rather than storage conditions. Drug content in poloxamer/chitosan microspheres remained unchanged after 6-months and 2-years of storage at temperature of 4-8°C as well as at temperature of 25°C and relative humidity of 60%, while in case of chitosan microspheres, a slight decrease in drug content was observed after 2 years of storage at the same conditions. The results obtained within this investigation revealed higher stability of melatonin-loaded poloxamer/chitosan microspheres in relation to chitosan microspheres with the same drug entrapped.

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

Thesis includes: 34 pages, 11 figures, 5 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Chitosan; Melatonin; Poloxamer; Microspheres; Spray-drying; Stability studies

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.