

Predformulacijska ispitivanja u razvoju alginatnih mikročestica pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem

Mišić, Jelena

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:802585>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Jelena Mišić

**Predformulacijska ispitivanja u razvoju
alginatnih mikročestica pripremljenih 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 svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju. Zahvaljujem asistentici Sabini Keser i djelatnicima Plive Robertu Šurini i Ani Jurić Simčić na prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovoga rada. Zahvale upućujem i Matiji Gretiću na provedbi pretražne elektronske mikroskopije.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i potpori koju su mi pružili tijekom razdoblja studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Alginati.....	1
1.1.1. Kemijska struktura alginata.....	2
1.1.2. Topljivost i viskoznost.....	4
1.1.3. Mehanizam geliranja.....	5
1.2. Biofarmaceutska svojstva i terapijski sustavi s alginatima.....	7
1.2.1. Alginatni terapijski sustavi s modificiranim oslobađanjem.....	10
1.2.2. Alginati u antirefluksnim terapijskim sustavima.....	11
1.2.3. Alginatne obloge za rane.....	11
1.2.4. Hidrogelovi alginata i polivinilnog alkohola.....	12
1.3. Sušenje raspršivanjem.....	12
1.3.1. Alginatni terapijski sustavi pripremljeni sušenjem raspršivanjem.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Materijali.....	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Priprema otopina polimera.....	19
3.2.2. Priprema polimernih mikročestica.....	19
3.2.3. Određivanje iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem.....	20
3.2.4. Određivanje sadržaja vode u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama.....	20
3.2.5. Karakterizacija polimera dinamičkom sorpcijom vlage.....	21
3.2.6. Karakterizacija čvrstog stanja moduliranom diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.....	21
3.2.7. Određivanje veličine polimernih mikročestica.....	22
3.2.8. Morfološka karakterizacija polimernih mikročestica.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Priprava polimernih mikročestica sušenjem raspršivanjem.....	23
4.2. Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama.....	27
4.3. Dinamička sorpcija vlage.....	31
4.4. Termička svojstva.....	32
4.5. Veličina polimernih mikročestica.....	36

4.6. Morfologija mikročestica.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA.....	42
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	47
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. ALGINATI

Alginati su u vodi topljivi, nerazgranati polisaharidi morskih smeđih algi (*Phaeophyceae*). Alginska kiselina i njezine soli nalaze se u staničnom zidu i intracelularnom matriksu tkiva smeđih algi te čine prosječno 40% suhe tvari. Imaju potpornu ulogu pružajući tkivu mehaničku čvrstoću i fleksibilnost.

Alginat je prvi započeo istraživati britanski kemičar E.C. Stanford krajem 19.st., a gotovo pola stoljeća kasnije započela je njihova izolacija iz smeđih algi te primjena u industriji. Od 265 vrsta smeđih algi za izolaciju alginske kiseline i njezinih soli najčešće se koriste alge *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* te alge iz roda *Laminaria* (Draget, 2009).

Osim smeđih algi, kao izvor alginata prepoznata je i bakterija *Azotobacter vinelandii* te neke bakterije roda *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* sintetizira alginat radi formiranja visokostrukturiranog biofilma, dok *Azotobacter vinelandii* koristi alginat za stvaranje cista otpornih na mehanički stres. Iako još uvijek ne postoje komercijalno dostupni alginati pripremljeni iz bakterijskih izvora razumijevanje putova biosinteze alginata u ovim bakterijama kao i razvoj staničnih kultura za njihov uzgoj predmetom su intenzivnog istraživanja. Istraživanja su posebice usmjerena k razvoju tehnika genetičkog inženjerstva koje omogućuju proizvodnju alginata točno definiranih fizičko-kemijskih svojstava pogodnih za specifične primjene u područjima biofarmacije i medicine (Nagarajan i sur., 2016).

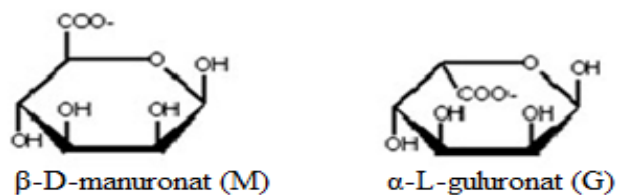
Alginati se u smeđim algama nalaze najčešće u obliku kalcijeve, natrijeve ili magnezijeve soli alginske kiseline. Proces izolacije alginske kiseline iz ubranih smeđih algi uključuje mljevenje sirovine te ispiranje vodom i kiselinom. Alginska kiselina zatim se neutralizira natrijevim karbonatom ili natrijevim hidroksidom kako bi se prevela u sol topljivu u vodi. Dobiveni natrijev alginat pročišćava se brojnim separacijskim tehnikama te se naposljetku precipitira kiselinom. Alginska kiselina potom se esterificira s propilenoksidom ili se procesom neutralizacije prevodi u komercijalno dostupne amonijeve, kalijeve, magnezijeve, natrijeve i kalcijeve soli alginske kiseline (Draget, 2009).

Intenzivnim istraživanjima ovog prirodnog polimera otkrivena su njegova svojstva zadržavanja vode, stvaranja filmova i gelova te sposobnost stabilizacije emulzija i disperzija

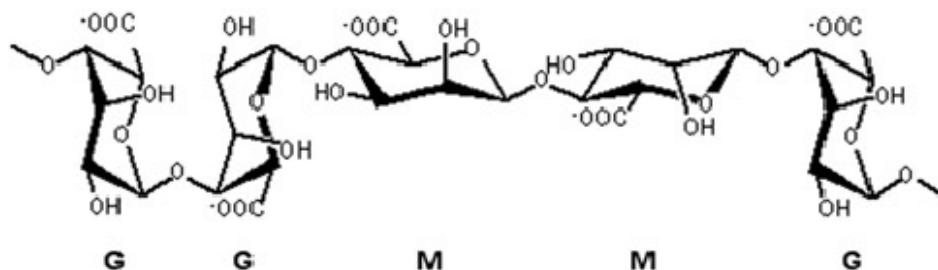
zbog čega je našao široku primjenu u dermatologiji, stomatologiji, gastroenterologiji, farmaceutskoj tehnologiji te prehrambenoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji (Draget i sur., 2005).

1.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA ALGINATA

Alginati su linearni, nerazgranati polisaharidi čije građevne blokove čine β -D-manuronska kiselina (M) i njezin C-5 epimer α -L-guluronska kiselina (G), povezane 1,4 glikozidnom vezom (Slika 1). Građevni šećerni ostaci organizirani su u homopolimerne poli(β -D-manusiluronat) i poli(α -L-gulosiluronat) i heteropolimerne blokove (Slika 2). Kopolimerna struktura dokazana je parcijalnom kiselom hidrolizom alginatnog lanca kojom su dobivene tri frakcije od kojih su dvije sadržavale homopolimerne strukture (G i M blokovi) dok je treća sadržavala veliki broj dimernih struktura (MG blokovi) (Draget i sur., 2005).



Slika 1. Građevne jedinice alginata: β -D-manuronat (M) i α -L-guluronat (G)
(preuzeto i prilagođeno prema Draget i sur., 2005).



Slika 2. Primjer građevnih blokova biopolimernog lanca alginata
(preuzeto iz Draget i sur., 2005).

Unatoč malim razlikama u strukturi, ove dvije uronske kiseline zauzimaju različite konformacije stolca kako bi se velika karboksilna skupina našla u energetski povoljnijem ekvatorijalnom položaju. Zbog toga je glikozidna veza na položaju 1 i 4 ekvatorijalna u β -D-manuronskoj kiselini, a aksijalna u α -L-guluronskoj kiselini (Gacesa, 1988). Posljedično, u kopolimernim blokovima alginatnog lanca prisutne su sve četiri moguće orijentacije glikozidne veze: diekvatorijalna (MM blokovi), diaksijalna (GG blokovi), ekvatorijalno-aksijalna (MG blokovi) i aksijalno-ekvatorijalna (GM blokovi) (Draget i sur., 2005). Zbog takve orijentacije glikozidnih veza regije bogate β -D-manuronatom imaju strukturu vrpce, slično strukturi celuloze, dok regije bogate α -L-guluronatom imaju izvijeniju strukturu. Strukture su eksperimentalno dokazane difrakcijom X zraka na parcijalnim hidrolitičkim produktima alginata te ^{13}C nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i ^1H NMR (Gacesa, 1988).

Kemijski sastav alginata ovisi o vrsti smeđe alge te o njezinom mikrokolišu, ali i o tkivu alge iz koje je izoliran. Primjerice, stabljika *Laminarie hyperboreae* bogata je guluronskom kiselinom koja joj pruža mehaničku čvrstoću dok su listovi iste alge siromašniji guluronskom kiselinom jer im je potrebna veća fleksibilnost radi plutanja u vodi (Draget, 2009). Ovisno o duljini, udjelu i raspodjeli ovih građevnih jedinica, razlikuju se fizička svojstva alginata. MM i MG građevni blokovi pridonose fleksibilnosti polisaharidnog lanca i to redom $\text{GG} < \text{MM} < \text{MG}$, dok se porastom udjela G blokova povećava sposobnost geliranja te čvrstoća samoga gela (Murillo-Álvarez i Hernández-Carmona, 2007). Viskoznost otopine najvećim je dijelom ovisna o duljini polimernog lanca, dok su imunogeničnost, gelirajuća svojstva i sposobnost vezivanja vode ovisni o udjelu α -L-guluronske kiseline (Ertesvåg i Valla, 1998). Alginati, kao i ostali polisaharidi, nemaju točno definiranu molekulsku masu stoga se ona izražava kao prosjek ukupne raspodjele molekulskih masa polimera (Draget, 2009).

Komercijalno dostupni alginati imaju prosječnu molekulsku masu od oko 200 kDa, ali dostupni su i oni s mnogo višim vrijednostima, od 400 do 500 kDa (Donati i Paoletti, 2009).

1.1.2. TOPLJIVOST I VISKOZNOST

Natrijev alginat vrlo je dobro topljiv u vodi, kao i ostale monovalentne soli i esteri alginske kiseline te zbog svoje visoke molekulske mase (100-500 kDa) daje viskozne otopine, za razliku od alginske kiseline koja veže vodu, ali u njoj nije topljiva (Khotimchenko i sur., 2001). Zbog velike koncentracije iona u strukturi alginata nastaje vrlo visoki gradijent vode što za posljedicu ima dobro otapanje (Donati i Paoletti, 2009). Na topljivost alginata u vodi utječu pH, ionska jakost te koncentracija gelirajućih metalnih kationa u otopini (Draget, 2009).

pKa vrijednost β -D-manuronske kiseline iznosi 3,38 dok je α -L-guluronske kiseline 3,65. pKa vrijednost alginatnog polimera ne razlikuje se značajno od pojedinačnih pKa vrijednosti ostataka uronskih kiselina. Naglo zakiseljavanje otopine alginata ispod pKa vrijednosti dovodi do precipitacije alginske kiseline dok kontrolirano i sporo zakiseljavanje dovodi do stvaranja gela alginske kiseline. Precipitacija alginske kiseline događa se u vrlo uskom pH području koje je ovisno o duljini lanca te kemijskom sastavu alginata. Alginati s više heteropolimernih sekvenci (MG blokovi) precipitiraju pri nižim pH vrijednostima u odnosu na one s homopolimernim strukturama (Draget, 2009).

Svaka promjena u ionskoj jakosti otopine značajno utječe na topljivost alginata. Već i dodatak manje od 0,1 M soli kalijevog klorida u otopinu značajno usporava kinetiku otapanja jer prisutnost druge soli smanjuje gradijent vode između otopine i alginatne strukture. Ukoliko se u otopinu alginata doda kalijev klorid u molarnom omjeru 1:1 nastupit će isoljavanje alginata (Donati i Paoletti, 2009).

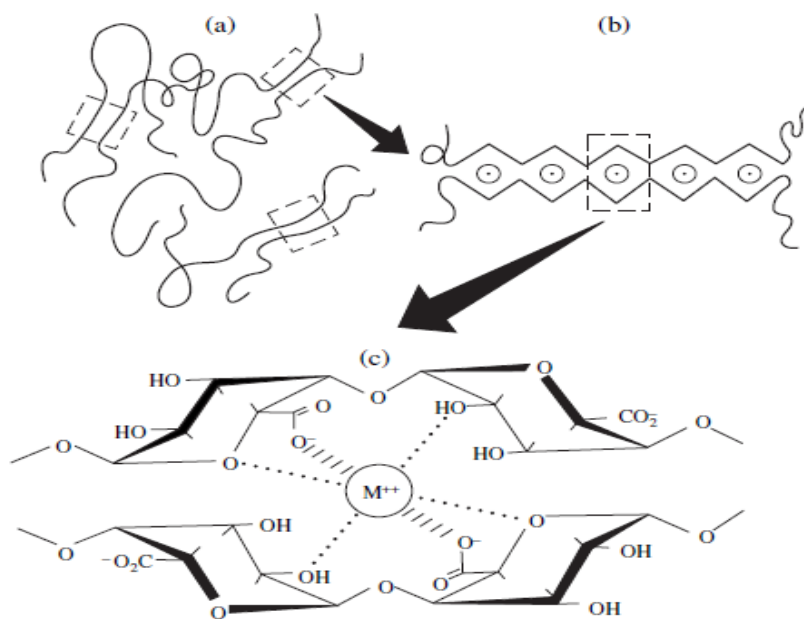
Viskoznost otopine alginata ovisi o koncentraciji otopine, pH te prosječnoj molekulskoj masi polimera. Pri istim koncentracijama polimeri veće molekulske mase daju otopine veće viskoznosti. Veća brzina miješanja otopine ili povećanje temperature rezultirat će smanjenjem viskoznosti otopine alginata (www.fmcbiopolymer.com). Dinamička viskoznost 1%-tne vodene otopine natrijevog alginata kreće se u rasponu od 20 do 400 mPa s pri temperaturi od 20 °C (Szekalska i sur., 2016). Najveću viskoznost alginati imaju pri pH vrijednosti 3-3,5 jer se karboksilne skupine uronskih ostataka protoniraju i povezuju vodikovim vezama (Lee i Mooney, 2012).

1.1.3. MEHANIZAM GELIRANJA

Alginati s monovalentnim kationima daju u vodi topljive soli dok u prisutnosti dvovalentnih (ili viševalentnih) kationa geliraju. Afinitet alginata za viševalentne katione ovisi prije svega o udjelu α -L-guluronske kiseline dok je β -D-manuronska kiselina gotovo bez afiniteta. Afinitet alginata prema zemnoalkalijskim metalima raste u slijedu $Mg \ll Ca < Sr < Ba$, a to je svojstvo jedinstveno za alginat u odnosu na druge polianione. Jedini polianion sličan alginatu u ovome svojstvu je pektin. Ta visoka selektivnost i afinitet ukazuju na postojanje specifičnih kelatorskih veza između polimera i metalnih kationa, a ne samo na nespecifične elektrostatske interakcije (Draget, 2009).

Struktura i svojstva formiranih gelova ovise o kemijskoj strukturi polisaharidnog lanca, odnosno o udjelu pojedine uronske kiseline. Alginati bogati α -L-guluronskom kiselinom tvore čvrste i krte gelove, dok oni bogati β -D-manuronskom kiselinom daju slabije, ali fleksibilnije gelove. Omjer β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline (M:G omjer) može se koristiti kao indeks predviđanja svojstava formiranog gela (Gacesa, 1988).

Sve građevne jedinice alginatnog lanca su polianionske te stvaraju intermolekularne ionske veze s dvovalentnim ili viševalentnim kationima. Pored svojstva stvaranja intermolekularnih ionskih veza, guluronatni ostaci alginatnog lanca imaju i svojstvo keliranja metalnih iona zbog prostornog rasporeda hidroksilnih skupina šećera. Zbog toga poliguluronatne strukture stvaraju mnogo čvršće veze s metalnim ionima te posljedično tvore i gelove jače strukture (Gacesa, 1988). Naime, kalcijevi ioni uliježu u prostorne strukture poliguluronatnih blokova (engl. "egg box" struktura; Slika 3). Svaki Ca^{2+} ion koordiniran je s hidroksilnim i karboksilnim skupinama s dva GG bloka dva susjedna alginatna lanca što dovodi do stvaranja dimera koji su zbog elektrostatskog odbijanja karboksilnih skupina postavljeni jedan prema drugome pod kutom od približno 90° . Na taj se način polimerni lanci prostorno približavaju te tvore zone povezivanja što rezultira geliranjem otopine alginata (Borgogna i sur., 2013).



Slika 3. Shematski prikaz formiranja alginatnog gela po modelu "egg box". (a,b)-Zone povezivanja između polimernih lanaca alginata. (c)-Povezivanje susjednih polimernih lanaca stvaranjem brojnih ionskih i koordinativnih veza između metalnog iona te karboksilnih i hidroksilnih skupina guluronatnih ostataka (preuzeto iz Khotimchenko i sur., 2001).

Svojstva gela ovise o udjelu pojedine uronske kiseline, koncentraciji metalnih iona i vremenu formiranja gela. Gel se ne stvara ukoliko udio α -L-guluronske kiseline nije minimalno 20-25%. Čvrstoća gela linearno raste s porastom molekulske mase polisaharida do 400 – 500 kDa (Khotimchenko i sur., 2001). Jedan od načina industrijskog dobivanja alginata s vrlo visokim udjelom G-blokova je korištenje C5-epimeraza izoliranih iz bakterije *A. vinelandii*. To je porodica enzima koji imaju sposobnost epimerizacije M-blokova u G-blokove bez kidanja glikozidne veze. Na taj način smanjuje se heterogenost prirodnih alginata te se dobivaju gelovi željenih svojstava. Enzimski obrađeni alginati pokazali su se elastičnijima, stabilnijima i manje permeabilnima u odnosu na prirodne (Skjåk-Bræk i Draget, 2012).

Za razliku od brojnih drugih polimera, primjerice, karagenana i agara koji se mogu gelirati i ponovno otapati ovisno o promjenama temperature, geliranje alginata je termalno ireverzibilan proces. Gelovi su temperaturno stabilni i geliraju gotovo neovisno o temperaturi, no promjenom temperature može se znatno utjecati na kinetiku geliranja (Skjåk-Bræk i Draget, 2012).

1.2. BIOFARMACEUTSKA SVOJSTVA I TERAPIJSKI SUSTAVI S ALGINATIMA

Alginati su biokompatibilni, neimunogenični i netoksični biomaterijali. U probavnom sustavu sisavaca nedostaju enzimi za probavu alginata, no on se jednostavno otapa izmjenom kalcijevih iona iz strukture gela s monovalentnim ionima iz okolnog medija, primjerice natrijevim ionima. Male molekule alginata izlučuju se renalnom ekskrecijom dok je za potpunu eliminaciju pri fiziološkim uvjetima potrebna prethodna obrada alginatnog lanca parcijalnom oksidacijom (Szekalska i sur., 2016).

Alginati se najčešće parcijalno oksidiraju natrijevim perjodatom te na taj način dobivaju sposobnost biološke razgradnje u vodenom mediju, a zadržavaju poželjna gelirajuća svojstva što se pokazalo pogodnim za razvoj terapijskih sustava za ciljanu dostavu lijeka (Lee i Money, 2012).

Biokompatibilnost alginata potvrđena je nakon topikalne, nazalne, okularne i oralne primjene, a Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) svrstala je natrijev, kalcijev, amonijev i kalijev alginat te propilenglikol alginat u skupinu GRAS (engl. *generally recognised as safe*) pomoćnih tvari za oralnu primjenu. Monografija natrijevog alginata uvrštena je u Europsku i Američku farmakopeju (Szekalska i sur., 2016).

Sa samo dva građevna šećera alginati su naizgled vrlo jednostavnog kemijskog sastava, no njihova raznolikost proizlazi iz mogućnosti različitog povezivanja kopolimernih struktura unutar lanca. To posebice dolazi do izražaja u novim istraživanjima i razvoju terapijskih sustava s alginatima gdje korištenje C5 epimeraza omogućava industrijsku proizvodnju polimera specifičnog kemijskog sastava i posljedično željenih fizičkih svojstava (Draget i sur., 2005) (Tablica 1).

Alginati su poznati po širokoj primjeni u izradi antirefluksnih terapijskih sustava te obloga za rane, gdje se koriste već desetljećima (Skjåk-Bræk i Draget, 2012).

U farmaceutskoj tehnologiji alginska kiselina se koristi kao vezivno sredstvo te sredstvo za raspadanje u tabletama. Koristi se i kao tvar za povećavanje viskoznosti te kao pomoćna tvar u oblikovanju tableta s modificiranim oslobađanjem. U oblikovanju krema, pasta i gelova služi kao sredstvo za suspendiranje dok u emulzijama tipa ulje u vodi djeluje kao stabilizator (Rowe i sur., 2006).

Najnovija istraživanja posebice su usmjerena prema primjeni alginata kao medija za uzgoj stanica sisavaca i nosača u tkivnom inženjerstvu te za razvoj terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem (Lee i Mooney, 2012).

Tablica 1. Terapijski sustavi s alginatima (Szekalska i sur., 2016; Lee i Mooney, 2012; Dumville i sur., 2011; www.halmed.hr; www.jgl.hr).

Naziv terapijskog sustava	Sastav terapijskog sustava	Mehanizam djelovanja	Indikacije
ORALNA PRIMJENA			
Gaviscon Original® oralna suspenzija, Reckitt Benckiser Healthcare	Natrijev alginat, natrijev hidrogenkarbonat i kalcijev karbonat	Lijek brzo reagira sa želučanom kiselinom i tvori gel alginske kiseline koji ima približno neutralan pH. Karbonati oslobađaju ugljikov dioksid koji izdiže gel stvarajući fizičku barijeru te sprječava gastroezofagealni refluks.	Želučani refluks, žgaravica, nadutost povezana sa želučanim refluksom za odrasle i djecu stariju od 12 godina.
Gaviscon Original® tablete za žvakanje, Reckitt Benckiser Healthcare	Natrijev alginat, natrijev hidrogenkarbonat i kalcijev karbonat	Natrijev bikarbonat pomaže u smanjenju želučane kiselosti.	
RefluSTAT®, JGL	Natrijev alginat, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev karbonat, kalcijev karbonat	Natrijev bikarbonat pomaže u smanjenju želučane kiselosti.	
Gastrotuss® sirup za djecu, DMG Italy	Magnezij alginat, simetikon, fruktoza, ksantanska guma, med, D-pantenol, ekstrakti <i>Althaeae officinalis</i> , <i>Papaver rhoeas</i> , cink oksid, natrij bikarbonat, natrij hidroksid	Natrijev bikarbonat pomaže u smanjenju želučane kiselosti.	Želučani refluks za djecu i novorođenčad od prvih dana života.

Naziv terapijskog sustava	Sastav terapijskog sustava	Mehanizam djelovanja	Indikacije
DERMALNA PRIMJENA			
Biatain® Alginate Ag obloga za rane, Coloplast A/S	Kalcijev alginat, karboksimetilceluloza, kompleks srebrnih iona	U kontaktu s eksudatom rane pretvara se u mekani, kohezivni gel koji dobro prijanja uz dno rane i sprječava infekciju. Patentirani srebrni kompleks oslobađa ione ako postoji eksudat rane. Dokumentiran je i hemostatski efekt pri manjim krvarenjima.	Za inficirane rane s umjerenim do jakim eksudacijama i rane s rizikom od infekcija te rane koje slabo krvare.
Suprasorb® A+Ag antimikrobna alginatna obloga za rane, Lohmann & Rauscher	Kalcijev alginat, ioni srebra		
Kaltostat® obloga za rane, ConvaTec	Kalcijev alginat, natrijev alginat	Vlaknasta struktura alginata bubri te dolazi do izmjene Ca ²⁺ iona iz vlakana i Na ⁺ iona iz sekreta. Vlakna se postupno pretvaraju u viskozni gel. Želatinozna masa pokriva površinu rane, održava je vlažnom i tako stvara okolinu za djelotvorno cijeljenje. U kontaktu s ranom koja krvari djeluje hemostatski.	Može se koristiti kod ulkusa noge, ulkusa na dijabetičkom stopalu, dekubitusa, traumatskih rana i opekлина drugog stupnja.
Renocare® alginatna obloga za rane, T&L Co. Ltd	Kalcijev alginat		

Naziv terapijskog sustava	Sastav terapijskog sustava	Mehanizam djelovanja	Indikacije
INTRAARTIKULARNA PRIMJENA			
ChondroArt 3D™ injekcija, Educell	Autologni hondrociti na nosaču od alginata i agaroze	Potiče sintezu i rast tkiva hrskavice. Sprječava istjecanje stanica iz sinovijalnog prostora.	Degenerativne bolesti zglobova i kralježnice.
REKTALNA PRIMJENA			
Natalsid® supozitoriji, Nizpharm	Natrijev alginat, Witepsol	Potiče obnavljanje tkiva te djeluje protuupalno i hemostatski.	Kronične analne fisure nakon operativnog zahvata u području rektuma, kronični hemoroidi.
PARODONTALNA PRIMJENA			
Progenix putty®, Progenix plus® injekcija, Medtronic Sofamor Danek Inc.	Demineralizirani koštani matriks, goveđi kolagen, natrijev alginat	Potiče regeneraciju tkiva i nadomješta gubitak kosti.	Nadomještanje gubitka kosti u parodontalnim degenerativnim stanjima.

1.2.1. ALGINATNI TERAPIJSKI SUSTAVI S MODIFICIRANIM OSLOBAĐANJEM

Alginatni terapijski sustavi s modificiranim oslobađanjem predmet su brojnih suvremenih istraživanja. U takve sustave mogu se uklopiti lijekovi male molekulske mase, hidrofobni lijekovi te proteini. Kemijska struktura lijeka te mehanizam ugradnje u alginatnu strukturu određuju kinetiku oslobađanja lijeka iz terapijskog sustava (Lee i Money, 2012). Primjerice, parcijalno oksidirani alginati istraživani su za izradu terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem i ciljanom dostavom antineoplastika na mjesto djelovanja pa je tako u alginatnom terapijskom sustavu s metotreksatom koji nije kemijski vezan za gel, došlo do trenutnog oslobađanja lijeka difuzijom, dok se ionski vezan mitoksantron oslobodio tek nakon razgradnje gela (Bouhadir i sur., 2001). Alginati su posebice prikladni za razvoj

terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem proteinskih lijekova jer se proteini mogu ugraditi u alginatne čestice pri blagim uvjetima čime se ne narušava njihova struktura, a prilikom dostave lijeka na mjesto djelovanja alginati pružaju zaštitu od biološke razgradnje (Lee i Money, 2012).

1.2.2. ALGINATI U ANTIREFLUKSNIM TERAPIJSKIM SUSTAVIMA

Gastroezofagealna refluksna bolest je kronična bolest probavnog sustava koju karakterizira povrat kiselog sadržaja želuca i dvanaesnika u jednjak. Prva linija liječenja uključuje nefarmakološke mjere te uvođenje inhibitora protonske pumpe (Katz i sur., 2013). U liječenju se koriste i H₂ antagonisti te antacidi koji neutraliziraju kiseli sadržaj želuca. Klinička istraživanja pokazuju kako se efikasnost terapijskih sustava s alginatima može usporediti s djelovanjem inhibitora protonske pumpe, a ukoliko se primjenjuju istovremeno, terapijski sustavi s alginatima pojačavaju učinak inhibitora protonske pumpe te nemaju negativan učinak na njihovu bioraspoloživost (Chiu i sur., 2013).

Alginati u dodiru s kiselim sadržajem želuca geliraju već ranije objašnjenim mehanizmom, a karbonati prisutni u formulaciji oslobađaju ugljikov dioksid unutar matriksa polimera te omogućavaju izdizanje gela i formiranje mehaničke barijere koja sprječava povrat kiselog sadržaja želuca u jednjak. Zbog mukoadhezivnih svojstava alginat oblaže sluznicu želuca te sprječava oštećenja mukoze uzrokovana kiselinom (Szekalska i sur., 2016).

1.2.3. ALGINATNE OBLOGE ZA RANE

Alginatne obloge za rane koriste se u terapiji dijabetičkih vrijedova na nogama, postoperativnih rana, opekline drugoga stupnja i inficiranih rana te rana s kavitetima (Szekalska i sur., 2016).

Obloga s kalcijevim alginatom je suha prilikom postavljanja, a uslijed izmjene iona s natrijevim ionima iz eksudata rane prelazi u oblik topljiv u vodi. Upijajući eksudat rane, alginat bubri te u svom matriksu zarobljava bakterije i na taj način sprječava infekciju te stvara vlažnu okolinu koja omogućuje reepitelizaciju tkiva i cijeljenje rane. U strukturu

alginatnih obloga za rane često se inkorporiraju čestice srebra koje djeluju antimikrobno i antioksidativno te olakšavaju vezanje elastaza i matriksnih metaloproteaza za tkivo rane. Osim konvencionalnih alginatnih obloga za rane koje se koriste već dugi niz godina istražuju se i razvijaju alginatne obloge u čijoj se strukturi nalaze tvari visoke biološke aktivnosti koje pridonose brzom cijeljenju rane kao što su dibutirilni ciklički adenzin monofosfat te faktor 1 izveden iz stromalne stanice. Uvođenje cinkovih iona u alginatna vlakna obloge za rane djeluje imunomodulatorno i antimikrobno, potiče migraciju keratinocita te povećava razine endogenih faktora rasta (Lee i Money, 2012).

1.2.4. HIDROGELOVI ALGINATA I POLIVINILNOG ALKOHOLA

Zbog svoje elastične trodimenzionalne strukture i velikog udjela vode hidrogelovi su vrlo slični prirodnim mekim tkivima. Biokompatibilni su te omogućuju transport kisika i nutrijenata što ih čini pogodnim materijalom za inkapsulaciju živih stanica. Različiti sintetski proizvedeni i prirodni materijali mogu se smatrati hidrogelovima. Jedan je od najistraživanijih polimera u izradi hidrogelova je polivinilni alkohol (PVA) koji je netoksičan, nekarcinogen, biokompatibilan, biorazgradljiv te dobrih fizičkih svojstava zbog čega je pogodan za primjenu u biomedicini. PVA se najčešće povezuje s drugim pogodnim materijalima kao što su natrijev alginat, kitozan i kolagen te se upotrebljava u oblogama za rane, tkivnom inženjerstvu te različitim terapijskim sustavima (Yang i sur., 2016). Povezivanje PVA i alginata ima velike prednosti nad tipičnim alginatnim hidrogelovima zbog prihvatljivije cijene, veće izdržljivosti i kemijske stabilnosti takvih hidrogelova te netoksičnosti za žive stanice (Zain i sur., 2011). Jedan od razloga povezivanja PVA i alginata je i taj što alginatni gel prelazi u oblik topljiv u vodi mehanizmom izmjene s monovalentnim ionima iz okolnog medija što se može izbjeći ugrađivanjem PVA u strukturu alginata (Madhavinia i sur., 2016).

1.3. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

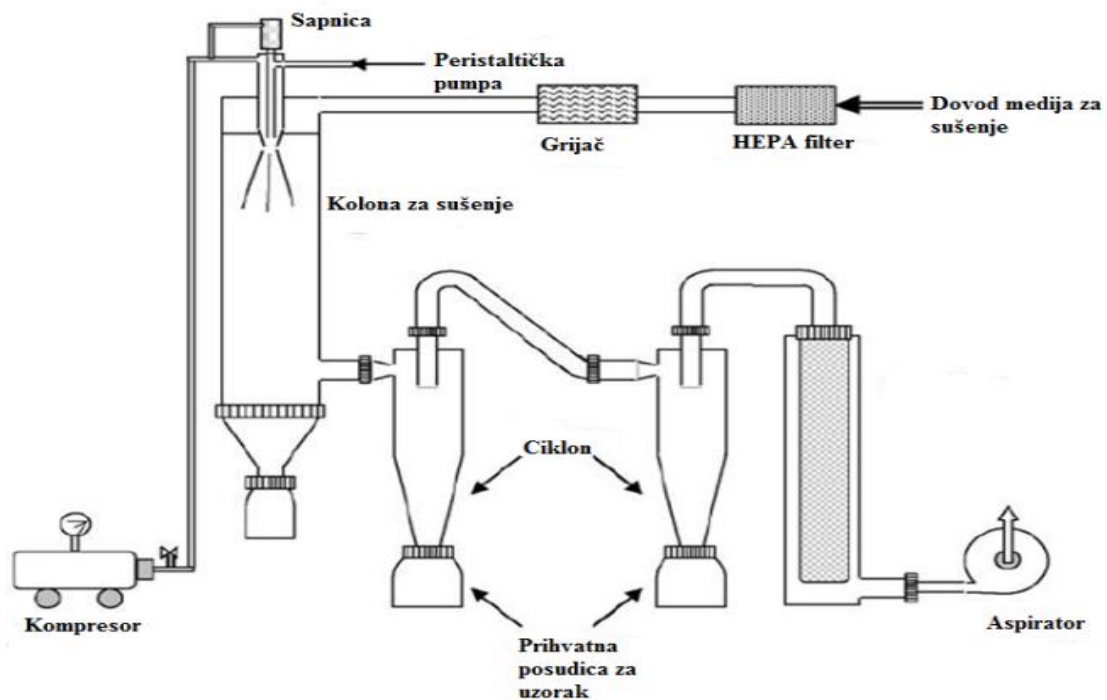
Sušenje raspršivanjem je metoda sušenja koja se uvelike koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj tehnologiji. Temelji se na raspršivanju vodene ili organske otopine, emulzije, suspenzije ili disperznog sustava u sitne kapljice u struji vrućega zraka. Osim odvajanja otapala iz uzorka ovaj postupak omogućava i kontrolu fizičko-kemijskih i morfoloških

svojtava osušenih čestica. Veličina dobivenih čestica kreće se do 1000 μm , a zbog vrlo kratkog trajanja samoga postupka omogućeno je i sušenje osjetljivih tvari (Jalšenjak i sur., 1998).

Tri osnovne faze procesa sušenja raspršivanjem su (Cal i Sollohub, 2010):

- 1) Atomizacija – raspršivanje uzorka u sitne kapljice pomoću atomizatora
- 2) Sušenje – interakcija medija za sušenje i raspršenih kapljica u komori za sušenje
- 3) Separacija – odvajanje osušenog produkta od struje vrućega zraka u ciklonu i prihvatnoj posudici.

Za proces sušenja raspršivanjem koriste se različite izvedbe uređaja, no svi sadrže nekoliko osnovnih dijelova (Slika 4).



Slika 4. Shema uređaja za sušenje raspršivanjem (preuzeto i prilagođeno iz Vasishta i Viswanathan, 2013).

Peristaltička pumpa dovodi tekući uzorak do sapnice za raspršivanje koja ga raspršuje u fine kapljice. Raspršivanje se može izvesti s rotacijskom, hidrauličkom, ultrazvučnom i pneumatskom sapnicom. Sušenje raspršivanjem može se provoditi u otvorenom ili

zatvorenom sustavu. Otvoreni sustav koristi se ukoliko je medij za sušenje vrući zrak. Brzinu protoka zraka regulira aspirator, a nakon sušenja zrak izlazi u atmosferu. Zatvoreni sustav reciklira medij za sušenje i najčešće se koristi ukoliko je taj medij inertni dušik. Dušik se upotrebljava za sušenje tvari otopljenih ili dispergiranih u zapaljivim organskim otapalima, osjetljivih na kisik te toksičnih tvari.

Kolona za sušenje omogućuje kontakt raspršenih kapljica i vrućeg medija za sušenje. Zbog velike specifične površine raspršenih kapljica u kontaktu s vrućim medijem za sušenje vrlo brzo dolazi do isparavanja otapala i efikasnog sušenja. Isparavanje je endoterman proces te dolazi do pada temperature raspršenih kapljica-čestica. Geometrija kolone i protok zraka omogućuju česticama vrijeme zadržavanja koje je potrebno kako bi se uklonila željena količina vlage. Čestice se uklanjaju iz kolone prije nego njihova temperatura dosegne temperaturu medija za sušenje te se na taj način izbjegava oštećenje čestica uzrokovano visokom temperaturom (www.buchi.com).

Parametri za optimizaciju procesa sušenja raspršivanjem su ulazna temperatura i brzina dovoda medija za sušenje, brzina dotoka uzorka, snaga sapnice za raspršivanje, vrsta otapala te koncentracija tekućeg uzorka koji se suši. Optimizacijom navedenih parametara direktno se utječe na iskorištenje procesa sušenja te fizičke karakteristike produkta kao što su veličina čestica, količina ostatne vlage i higroskopsnost (Cal i Sollohub, 2010).

U farmaceutskoj tehnologiji sušenje raspršivanjem često se koristi za pripremu ekscipijensa koji su pogodni za tabletiranje postupkom direktnog komprimiranja jer se time mogu dobiti prašci željenih svojstava tečenja. Sušenje raspršivanjem pruža i mogućnost koprecipitacije teško topljive djelatne tvari s polimerom u stabilnoj amorfnoj disperziji, čime se značajno povećava topljivost, a time i bioraspoloživost djelatne tvari. Sušenjem otopine djelatne tvari i polimera mogu se dobiti polimerne mikročestice s uklopljenom djelatnom tvari, a s ciljem postizanja modificiranog oslobađanja, maskiranja neugodnog okusa ili fizičke zaštite osjetljive tvari. Metoda sušenja raspršivanjem pogodna je i za pripremu terapijskih sustava hormona, peptida i proteina, posebice za inhalacijsku primjenu jer se optimiranjem parametara mogu dobiti čestice odgovarajuće veličine i svojstava tečenja (Aundhia i sur., 2011).

1.3.1. ALGINATNI TERAPIJSKI SUSTAVI PRIPRAVLJENI SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem jedna je od najčešće korištenih metoda pripreme različitih polimernih terapijskih sustava željenih fizičko-kemijskih svojstava, među kojima su i alginatni sustavi.

Alginati su se dugom uporabom u kliničkoj praksi pokazali kao izvrstan materijal za izradu obloga za rane. Nova istraživanja u ovome području idu u smjeru razvijanja terapijskih sustava s lijekovima uklopljenima u alginatne nano/mikročestice. Metodom sušenja raspršivanjem uspješno su pripravljene stabilne nanočestice alginata i pektina s uklopljenim antibiotikom gentamicin sulfatom. Pripravljene suhi prašak pokazao je dobra svojstva geliranja na površini rane te sposobnost apsorpcije eksudata. Uklapanjem gentamicin sulfata u nanočestice alginata i pektina osigurano je trenutno oslobađanje lijeka koje je poželjno radi sprječavanja infekcije u početnoj fazi cijeljenja, ali i produljeno oslobađanje lijeka koje je ovisno o veličini pripremljenih čestica te permeaciji lijeka kroz stvoreni gel (De Cicco i sur., 2014).

Sušenje raspršivanjem posebno je pogodno za pripremu terapijskih sustava s proteinima za nazalnu i pulmonalnu primjenu. Ovi putovi primjene često se koriste za dostavu proteinskih lijekova zbog neinvazivnosti, relativno velike apsorptivne površine, niske enzimske aktivnosti u odnosu na oralni put primjene te mogućnosti sistemske apsorpcije lijeka zaobilazanjem prvog prolaska kroz jetru. Optimizacijom parametara sušenja moguće je postići aerodinamički promjer čestica produkta od 1 do 5 μm što je uvjet za dobru pulmonalnu apsorpciju lijeka (Razavi Rohani i sur., 2014).

Liposomi su vrlo često korišteni nosači za nazalnu primjenu jer pružaju zaštitu proteinskim lijekovima te omogućuju dobru penetraciju kroz mukoznu membranu, međutim brzo se uklanjaju mukocilijarnim klirensom zbog čega ih je potrebno kombinirati s mukoadhezivnim polimerima. Alginati su široko istraživani kao mukoadhezivni biokompatibilni materijali za nazalnu primjenu lijekova zbog svoje sposobnosti stvaranja vodikovih veza s mucinom. Sušenjem raspršivanjem pripravljene su liposomi s uklopljenim goveđim serumskim albuminom kao modelnim antigenom, obloženi alginatom i kitozanom. Obloženi liposomi pokazali su bolju mukoadhezivnost i penetraciju kroz mukoznu membranu u odnosu na neobložene liposome (Chen i sur., 2013).

Pulmonalna primjena proteinskih lijekova susreće se s problemom brze eliminacije lijeka iz sistemske cirkulacije što dovodi do potrebe za učestalim uzimanjem lijeka te posljedično do male suradljivosti pacijenata. Sušenje raspršivanjem omogućuje pripremu alginatnih mikročestica s lijekom uklopljenim u polimerni matriks, čime se može postići kontrolirano oslobađanje lijeka nakon pulmonalne primjene. Sušenjem čestica hidrogela s uklopljenim lijekom mogu se dobiti porozne mikročestice s relativno velikim geometrijskim promjerom, a malim aerodinamičkim promjerom što omogućava dostavu lijeka u alveole, a onemogućava uklanjanje čestica plućnim makrofagima (Möbus i sur., 2012).

Sušenjem raspršivanjem uspješno su pripremljeni i terapijski sustavi za pulmonalnu primjenu inzulina s natrijevim alginatom, manitolom i natrijevim citratom kao ekscipijensima. Dobiveni suhi produkt za pulmonalnu primjenu karakteriziran je dobrim iskorištenjem procesa sušenja, optimalnom veličinom čestica te željenim profilom oslobađanja lijeka (Razavi Rohani i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alginati su vrlo često korišteni biopolimeri u farmaceutskoj industriji. Posjeduju svojstva zadržavanja vode, stvaranja gelova i filmova, sposobnost stabilizacije emulzija i disperzija te brojne druge poželjne karakteristike (Draget i sur., 2005). Biokompatibilni su, neimunogenični i netoksični polimeri. Alginati su najčešće korišteni u oblogama za rane te antirefluksnim terapijskim sustavima. Novija istraživanja biofarmaceutske primjene alginata usmjerena su k razvoju alginatnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem te korištenju alginata kao medija za uzgoj stanica sisavaca u tkivnome inženjerstvu. Intenzivna istraživanja provode se i u području razvoja alginata kao nosača proteina i staničnih populacija za ciljanu dostavu koji bi omogućili regeneraciju specifičnih tkiva i organskih sustava (Lee i Money, 2012).

Sušenje raspršivanjem jedna je od najčešće korištenih metoda pripreme terapijskih sustava jer optimiranje procesnih i formulacijskih parametara omogućuje dobivanje čestica željenih fizičko-kemijskih svojstava. Sušenje raspršivanjem omogućuje pripravu polimernih matriksnih sustava s uklopljenom djelatnom tvari čije je oslobađanje kontrolirano svojstvima polimernog matriksa te njegovim ponašanjem u kontaktu s vodenim medijem (Aundhia i sur., 2011). Alginati su se pokazali kao pogodni nosači lijekova te često predstavljaju polimere izbora u izradi terapijskih sustava metodom sušenja raspršivanjem (Al Zoubi i sur., 2017; Estevinho i sur., 2016; Razavi Rohani i sur., 2014; Möbus i sur., 2012). Za njihov usmjereni razvoj neophodno je provesti sustavnu karakterizaciju ishodnih polimera kao i polimernih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem u početnoj fazi razvoja.

Cilj ovog rada bio je provesti fizičko-kemijsku karakterizaciju triju različitih tipova alginata kao ishodnih polimera, i mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem polimernih otopina, a u svrhu optimiranja procesa sušenja i svojstava dobivenog suhog produkta. Uz alginat karakteriziran je i PVA kao polimer koji se može kombinirati s alginatima u izradi mikročestica kao terapijskih sustava željenih biofarmaceutskih svojstava.

Specifični ciljevi:

- provesti preliminarna sušenja raspršivanjem ishodnih polimera (otopina triju tipova alginata i otopine PVA)
- provesti fizičko-kemijsku karakterizaciju ishodnih polimera i/ili mikročestica - produkta dobivenog sušenjem raspršivanjem jednostavnih otopina polimera,

uključujući metode karakterizacije poput diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), termogravimetrijske analize (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA) te dinamičke sorpcije vlage (engl. *dynamic vapour sorption*, DVS)

- karakterizirati produkt sušenja raspršivanjem s obzirom na iskorištenje procesa, sadržaj ostatne vlage te veličinu i morfologiju čestica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Za izradu ovog diplomskog rada korištena su tri tipa natrijevog alginata, Manucol[®] LKX (viskoznost 1%-tne otopine 60,0–170,0 mPa s, Lot GQ0401805), Protanal[®] CR 8133 (viskoznost 2%-tne otopine 100–300 mPa s, Lot GQ0606204) i Protanal[®] CR 8223 (viskoznost 1,5%-tne otopine 600–900 mPa s, Lot GQ0800602), proizvođača FMC Health and Nutrition, Irska, te polivinilni alkohol (PVA) 18-88 (viskoznost 4%-tne otopine 15,3-20,7 mPa s, Lot K45090655508), proizvođača Merck KGaA, Njemačka.

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA OTOPINA POLIMERA

Pripravljene su otopine triju tipova natrijevog alginata (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223) i otopina PVA 18-88. Otopine natrijevih alginata koncentracije 0,5 % (*m/V*), te otopina PVA u koncentraciji 2 % (*m/V*) pripravljene su otapanjem polimera u pročišćenoj vodi pri sobnoj temperaturi, uz miješanje na magnetskoj mješalici.

3.2.2. PRIPREMA POLIMERNIH MIKROČESTICA

Sušenje raspršivanjem polimernih otopina provedeno je na uređaju za sušenje raspršivanjem ProcepT 4M8-TriX (ProCepT, Zelzate, Belgija), u Plivi Hrvatska d.o.o. Korištena je konusna kolona za sušenje i ciklon srednje veličine s padom tlaka u ciklonu od približno 20 mbar te ultrazvučna sapnica za raspršivanje uzorka čija je snaga podešena na 97% (frekvencija rada 24,25 kHz). Sapnica je hladena zrakom pri protoku od 30 l/min. Brzina rada peristaltičke pumpe podešena je na 20%. Kao plin za sušenje korišten je zrak u otvorenom sustavu, a brzina protoka zraka za sušenje podešena je na 0,25 m³/min te je tijekom procesa sušenja varirala od 0,22 m³/min do 0,25 m³/min. Za sušenje raspršivanjem alginatnih otopina temperatura ulaznog zraka postavljena je na 120 °C, dok je za sušenje

raspršivanjem otopine PVA 18-88 postavljena na 150 °C.

3.2.3. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Iskorištenje procesa (I) sušenja raspršivanjem izračunato je prema sljedećoj jednadžbi:

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

Iz volumena otopine koji je sušen i koncentracije polazne otopine dobivena je masa suhe tvari u otopini za sušenje za svaki od uzoraka. Za količinu dobivenog suhog produkta u obzir je uzeta samo masa produkta u prihvatnoj posudi, a ne i produkt koji je zaostao u ciklonu ili koloni.

3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA

Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikrosferama određen je termogravimetrijskom analizom, pomoću instrumenta TGA Q5000 (TA Instruments, New Castle, DE, SAD) u Plivi Hrvatska d.o.o. Podaci su obrađeni računalnim sustavom TA Instruments Universal analysis 2000, verzija 4.5A. Svaki od uzoraka je u malim količinama (1–7 mg) prenesen u platinastu posudicu koja je pomoću automatskog uređaja postavljena u peć za zagrijavanje s osjetljivom analitičkom vagom. Uzorci su zagrijavani u struji dušika od 35 ml/min, kako bi se osigurala inertna atmosfera. Postavljeni su uvjeti za zagrijavanje od sobne temperature do 500 °C, brzinom zagrijavanja od 10 °C/min. Zabilježen je gubitak mase uzorka u ovisnosti o temperaturi te je obradom podataka računalnim sustavom dobiven termogram iz kojega je određen sadržaj vode u svakome od ispitanih uzoraka.

3.2.5. KARAKTERIZACIJA POLIMERA DINAMIČKOM SORPCIJOM VLAGE

Analiza uzoraka provedena je na uređaju DVS Intrinsic proizvođača Surface Measurement Systems, London, Velika Britanija u Plivi Hrvatska d.o.o. Na početku analize uzorci su ekvilibrirani pri 0% relativne vlažnosti zraka (RH) te je zabilježena njihova masa. Protanal[®] CR 8223 izložen je tijekom analize povišenju relativne vlažnosti od 0% do 90% i zatim ponovno smanjenju RH do 0%, dok je za Protanal[®] CR 8133, Manuacol[®] LKX i PVA 18-88 ciklus promjene RH iznosio 0%-95%-0%, u koracima po 10% RH pri temperaturi od 25,0 °C. Svaki korak promjene vrijednosti relativne vlažnosti zraka proveden je nakon postizanja ravnotežnog stanja uzorka određenog vrijednošću $dm/dt < 0,002$ %/min ili nakon 720 minuta za uzorke alginata te 180 minuta za uzorak PVA 18-88. Adsorbirana/apsorbirana i desorbirana vlaga izražene su kao postotak mase suhog uzorka za svaki od koraka promjene relativne vlažnosti zraka.

3.2.6. KARAKTERIZACIJA ČVRSTOG STANJA MODULIRANOM DIFERENCIJALNOM PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM

Analiza uzoraka provedena je na uređaju TA Instrument modulated DSC Q2000 proizvođača TA Instruments, New Castle, DE, SAD u Plivi Hrvatska d.o.o. Uzorci su u malim količinama (1,5-4 mg) preneseni u prikladne hermetičke posudice za zagrijavanje. Uzorci PVA 18-88 postavljeni su u aluminijsku hermetičku, a uzorci alginata u aluminijsku hermetičku posudicu s probušenim poklopcem kako bi se omogućilo isparavanje zaostale vode iz uzorka. Uzorci su zagrijavani u struji dušika od 50 ml/min kako bi se osigurala inertna atmosfera. Uzorci PVA 18-88 ekvilibrirani su pri temperaturi od -20 °C te zagrijavani do 250 °C pri promjeni temperature od 5 °C/min i modulaciji od ± 2 °C (amplituda) svakih 60 sekundi (period). Uzorci alginata ekvilibrirani su pri temperaturi od 0 °C te zagrijavani do 200 °C pri promjeni temperature od 5 °C/min i modulaciji od ± 2 °C svakih 60 sekundi. Rezultati su obrađeni pomoću računalnog programa TA Universal analyses.

3.2.7. ODREĐIVANJE VELIČINE POLIMERNIH MIKROČESTICA

Polimerne mikročestice pripravljene sušenjem raspršivanjem analizirane su korištenjem Olympus BH-2 mikroskopa koji je povezan s CCD kamerom ICD-42-E proizvođača Ikegami Tsushinki Co., Japan te obradom slike pomoću programa Optomax V, Cambridge, Velika Britanija kako bi se odredio srednji geometrijski promjer te raspodjela veličina čestica. Svaki od uzoraka nanesen je u tankom sloju na predmetno stakalce te promatran pod objektivom uvećanja $20 \times$. U računalnom programu odabran je sferični promjer kao veličina koja se želi određivati. Za uzorke alginata kao relevantan raspon veličina čestica odabran je raspon od 0 do $20 \mu\text{m}$, a za uzorak PVA 18-88 raspon od 0 do $50 \mu\text{m}$. Za svaki od uzoraka izmjerena je veličina najmanje 1500 čestica te je svako mjerenje napravljeno u duplikatu.

3.2.8. MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH MIKROČESTICA

Morfološka karakterizacija polimernih mikročestica provedena je pomoću pretražne elektronske mikroskopije (engl. *Scanning electron microscopy*, SEM) na uređaju Tescan Vega 3 SEM na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su pripremljeni za analizu nanošenjem na vodljivu vrpču te fiksiranjem za metalni nosač koji je potom postavljen u komoru naporivača (engl. *sputter coater*) Quorum SC7620 u atmosferi inertnog plina argona. Rotacijskom pumpom postignut je tlak u komori od 10^{-2} bara. Katoda koja čini omotač komore građena je od platine i rodija. Priključivanjem elektroda na visoki napon (800 – 1200 V) električno polje ionizira argon te njegovi ioni udaraju u katodu i izbijaju atome platine i rodija koji oblažu uzorak čime on postaje vodljiv i spreman za analizu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPRAVA POLIMERNIH MIKROČESTICA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Za pripravu mikročestica odabrana je metoda sušenja raspršivanjem. Korišten je uređaj za sušenje raspršivanjem ProCepT 4M8-TriX (ProCepT, Zelzate, Belgija). Proces sušenja kontroliran je kroz centralni računalni sustav koji omogućuje praćenje svih kritičnih parametara procesa u stvarnome vremenu.

Kao medij za sušenje korišten je vrući zrak u otvorenom krugu u kojemu zrak, zajedno s parama otapala (u ovom slučaju vode) prolazi kroz HEPA filter i ventilira se kroz vanjski odsis. Prema radnome propisu za uređaj za sušenje raspršivanjem ProCepT, protok zraka za sušenje postavljen je na $0,25 \text{ m}^3/\text{min}$ te je tijekom samog procesa sušenja varirao od $0,22 \text{ m}^3/\text{min}$ do $0,25 \text{ m}^3/\text{min}$. Temperatura ulaznog zraka postavljena je na $120 \text{ }^\circ\text{C}$ za uzorke alginata jer je u preliminarnim ispitivanjima utvrđeno dostatno sušenje pri navedenoj temperaturi. Za sušenje uzorka PVA 18-88 temperatura je podešena na $150 \text{ }^\circ\text{C}$ jer je u preliminarnim ispitivanjima utvrđeno nedostatno sušenje pri nižim temperaturama ulaznog zraka (uočeno je stvaranje kapljica na stijenkama komore za sušenje).

Za raspršivanje uzorka korištena je ultrazvučna sapnica s kojom je moguće postići veličinu čestica suhog produkta između 10 i $100 \text{ }\mu\text{m}$. Veličina nastalih kapljica može se kontrolirati mijenjajući snagu na generatoru koji je povezan sa sapnicom. Maksimalna vrijednost frekvencije rada sapnice iznosi 25 kHz što odgovara protoku na sapnici od 9 ml/min . U ovome radu snaga rada ultrazvučne sapnice postavljena je na 97% snage (frekvencija od $24,25 \text{ kHz}$) jer je u preliminarnim ispitivanjima s takvom postavkom utvrđen optimalan rad sapnice. Ultrazvučna sapnica spaja se na liniju za doziranje i izvor komprimiranog zraka za hlađenje tijekom rada (prema internom propisu za rad na uređaju, protok zraka za hlađenje postavljen je na 30 l/min pod tlakom od $1,2 \text{ bara}$).

Brzina rada peristaltičke pumpe postavljena je na 20% . Cijev peristaltičke pumpe je debljine stjenke $0,85 \text{ mm}$ s unutarnjim promjerom od $1,02 \text{ mm}$.

Korištena je standardna staklena procesna kolona s konusnom osnovicom povezana sa T-transportnom cijevi i ciklonom. Odabir veličine ciklona za odjeljivanje čestica ovisi o

očekivanoj veličini čestica suhoga produkta koja opet ovisi o koncentraciji otopine za sušenje, brzini rada peristaltičke pumpe i frekvenciji ultrazvučne sapnice. S obzirom na navedene parametre, odabrana je srednja veličina ciklona koja učinkovito odjeljuje čestice veće od 3 μm . Svaki ciklon, ovisno o svojoj izvedbi, uzrokuje određeni pad tlaka koji pomaže odjeljivanje čestica suhoga produkta. Tlak u ciklonu može regulirati operater preko ručnog anemometra. Svaki ciklon ima specifično područje pada tlaka na koje se mora namjestiti, a koje za ciklon srednje veličine iznosi 10-45 mbar. Za pripravu mikročestica u ovome radu odabran je pad tlaka u ciklonu od približno 20 mbar. Različite izvedbe ciklona mogu rezultirati različitom količinom suhog proizvoda, a optimizacija ovisi o veličini čestica i njihovoj gustoći (4M8-TriX: installation and operation manual). Primjerice, Ceschan i suradnici (2016) istraživali su inhalacijski put primjene atenolola te su u tu svrhu pripravili mikročestice sušenjem raspršivanjem disperzije atenolola i alginske kiseline. Disperzije su pripravljene otapanjem 2 g alginske kiseline i 1,82 g atenolola u 200 ml vode. Prva disperzija imala je $\text{pH } 4,13 \pm 0,04$ dok je drugi uzorak zalužen s KOH do $\text{pH } 6,53 \pm 0,03$. Sušenje raspršivanjem provedeno je korištenjem bifluidne sapnice promjera 0,5 mm pri temperaturi ulaznog zraka od 140 °C, protoku uzorka od 6 ml/min te protoku komprimiranog zraka od 742 l/h. Pri optimizaciji procesa sušenja ispitivani su standardni ciklon te ciklon visoke izvedbe (engl. *high performance cyclone*). Pri korištenju ciklona visoke izvedbe zabilježene su niže temperature na izlazu iz komore za sušenje te niži udio vlage u suhom produktu u usporedbi s produktom dobivenim korištenjem standardnog ciklona. Zbog sposobnosti prikupljanja manjih čestica, uporabom ciklona visoke izvedbe zabilježeno je i veće iskorištenje procesa ($85,18 \pm 0,52\%$ za prvi uzorak i $87,80 \pm 1,34\%$ za drugi uzorak u odnosu na iskorištenja od $45,84 \pm 2,64\%$ za prvi uzorak i $53,48 \pm 1,11\%$ za drugi uzorak koja su dobivena korištenjem standardnog ciklona).

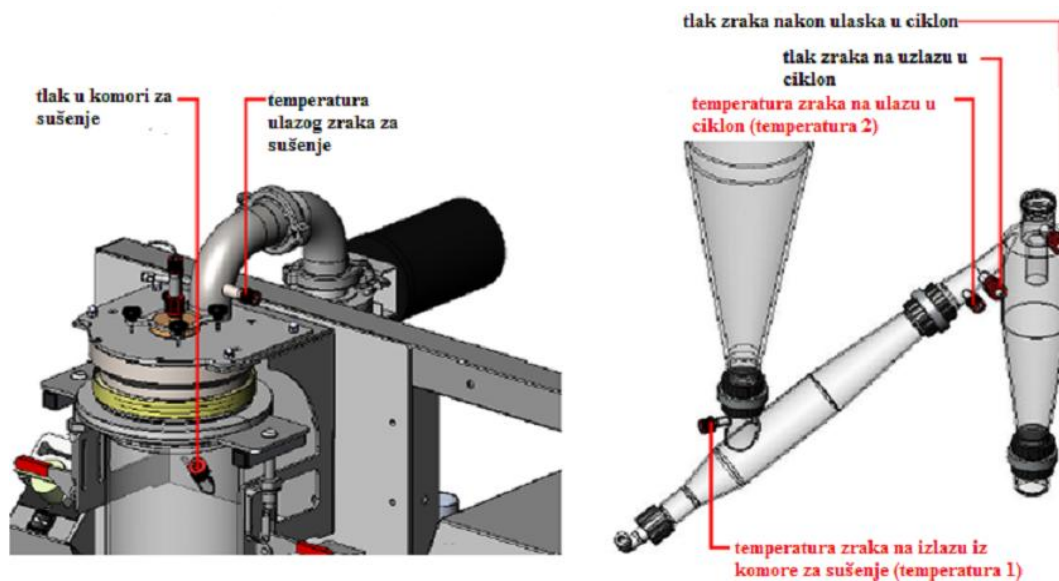
Iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem dobivena u ovome radu prikazana su u Tablici 2. Vrijednosti iskorištenja od oko 50% očekivana su za sušenje raspršivanjem. Slična su iskorištenja dobivena i u radu kojeg su proveli Estevinho i suradnici (2016). U navedenom radu sušenjem raspršivanjem pripravljene su polimerne mikročestice vitamina C i vitamina B12. Jedan od ispitivanih polimera bio je natrijev alginat. Koncentracija vitamina C i vitamina B12 u uzorcima iznosila je 10 g/l. Uzorci su pomiješani s vodenom otopinom natrijevog alginata koncentracije 1 %, *m/V*, te sušeni raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem provedeno je s bifluidnom sapnicom promjera 0,5 mm, pri protoku uzorka od 4 ml/min, protoku zraka od 32 m³/h pri tlaku od 6,0 bara i temperaturi 120 °C. Zabilježeno je iskorištenje procesa od

41,8% za mikročestice s vitaminom B12 te 43,6% za mikročestice s vitaminom C. Nadalje, prilikom istraživanja mikročestica PVA kao nosača lijekova za nazalnu primjenu pripravljene su etanolno-vodene otopine različitih koncentracija koje su sušene raspršivanjem. Zabilježene su vrijednosti iskorištenja do 50% (Ting i sur., 1992).

Tablica 2. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem polimernih otopina

POLIMER	MANUCOL® LXX	PROTANAL® 8133 CR	PROTANAL® 8223 CR	PVA 18-88
Koncentracija polimerne otopine (% <i>m/V</i>)	0,5	0,5	0,5	2,0
Masa otopine na kojoj je provedeno sušenje raspršivanjem (g)	189,6	162	183	75
Masa suhe tvari u otopini koja je sušena raspršivanjem (g)	0,948	0,81	0,915	1,5
Masa dobivenog osušenog produkta (g)	0,524	0,2	0,46	0,46
Iskorištenje procesa (%)	55,27	24,69	50,27	30,67

U ovom radu uočeno je nedovoljno sušenje za sva četiri uzorka, što je potrebno uzeti u obzir u sljedećim fazama razvoja. Tijekom sušenja nedovoljno osušene čestice lijepile su se na sonde za mjerenje temperature i tlaka zraka te stijenke T-transportne cijevi i ciklona. Čestice su stvarale film na sondama i stijenkama koji se povremeno odvajao i ulazio u ciklon. Vrijednosti temperature izlaznog zraka za sušenje nakon izlaska iz kolone za sušenje (temperatura 1) te prije ulaska u ciklon (temperatura 2) razlikovale su se ovisno o sušenom uzorku te su varirale tijekom procesa sušenja, a nakon odvajanja filma nedovoljno osušenih čestica s temperaturne sonde zabilježen je primjetan pad temperature zraka na izlazu iz kolone za sušenje kod svakoga od četiri sušena uzorka (Slika 5, Tablica 3).



Slika 5. Položaj sonde za mjerenje temperature i tlaka zraka (preuzeto i prilagođeno prema 4M8-TriX: installation and operation manual).

Tablica 3. Vrijednosti temperature zraka nakon izlaska iz komore za sušenje (temperatura 1) te prije ulaska u ciklon (temperatura 2) za uzorke sušene raspršivanjem na uređaju ProceprT 4M8-TriX

POLIMER	MANUCOL® LKX	PROTANAL® 8133 CR	PROTANAL® 8223 CR	PVA 18-88
Temperatura 1 / °C	79 - 84	80 - 85	72,3 - 83	81,7 – 88,9
Temperatura 2 / °C	54 - 58	55,4 - 64	57 – 60,1	68,5 – 71,5

Za efikasnije sušenje uzoraka prije svega potrebno je koristiti dulju kolonu. Uređaj ProceprT 4M8-TriX omogućuje produljenje kolone za sušenje dodavanjem jednog ili dva dodatna cilindrična dijela između konusne osnovice i glave komore. Produljenje kolone omogućuje dulje zadržavanje čestice u koloni što dovodi i do duljeg kontakta sa zagrijanim zrakom i posljedično do boljega sušenja. Dulji kontakt raspršenog uzorka sa zagrijanim zrakom rezultirao bi većim prijenosom topline na uzorak, učinkovitijim sušenjem i manjom temperaturom zraka na izlasku iz kolone za sušenje (temperatura 1). Bolje sušenje uzorka

smanjilo bi lijepljenje čestica za stijenke uređaja čime bi se postigla bolja separacija čestica u ciklonu te veća količina suhoga produkta u prihvatnoj posudi tj. bolje iskorištenje procesa sušenja. Iskorištenje procesa moguće je povećati i povećanjem brzine protoka ulaznoga zraka te povećanjem razlike tlaka u ciklonu što bi dovelo do bolje separacije čestica u ciklonu.

4.2. SADRŽAJ VLAGE U ISHODNIM POLIMERIMA I POLIMERNIM MIKROČESTICAMA

Sušenjem raspršivanjem dolazi do amorfizacije tvari (Singh i Van den Mooter, 2015). Amorfne tvari se po podložnosti kemijskim reakcijama razgradnje nalaze između otopina u kojima su te kemijske reakcije najbrže i kristalnih tvari u kojima je razgradnja najsporija. Poznavanje fizičko-kemijske (ne)stabilnosti tvari od velikog je značaja za razvoj ljekovitih oblika. Jedan od najčešćih faktora koji utječu na stabilnost je vlaga koju suhi pripravak može nakupiti iz atmosfere prilikom skladištenja. Vlaga u pripravku može zaostati i nakon određenih proizvodnih procesa kao što su sušenje raspršivanjem, vlažna granulacija, liofilizacija i drugi te se tada naziva ostatnom vlagom. U najvećem broju slučajeva veći sadržaj vode označava i bržu kemijsku razgradnju suhoga pripravka (Ohtake i Shalaev, 2013).

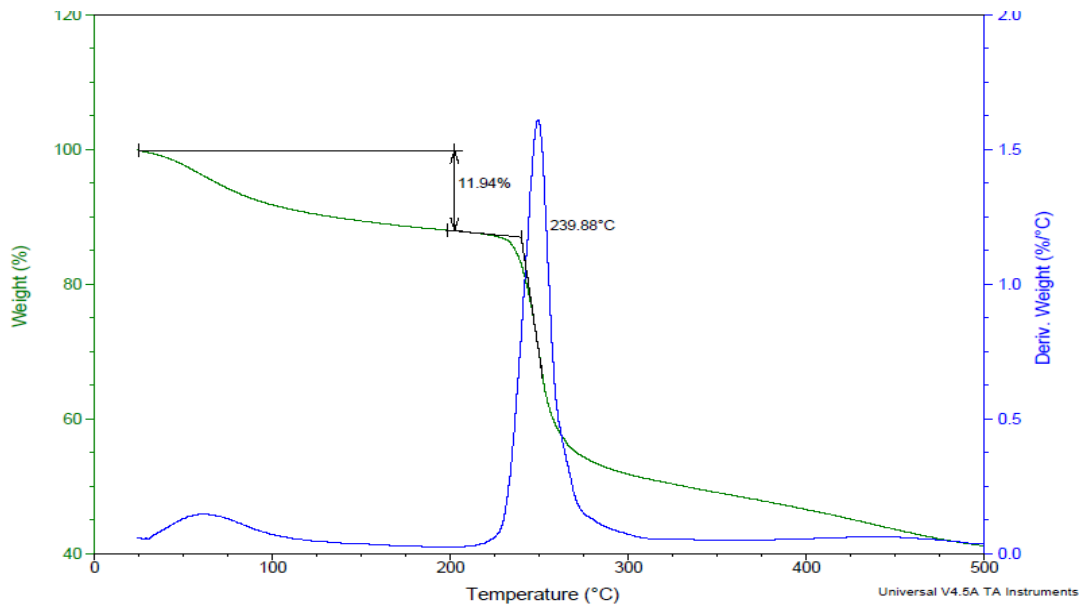
Kako bi se odredio sadržaj vlage, uzorci su analizirani termogravimetrijskom metodom. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4. Na Slici 6. i 7. redom su prikazani termogrami ishodnog polimera Manucol® LKX te mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera Manucol® LKX. Navedeni termogrami reprezentativni su za sve analizirane alginatne i u skladu su s literaturnim podacima (Soares i sur., 2004). Na Slici 8. i 9. prikazani su termogrami ishodnog polimera PVA 18-88 te mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88. Termogrami navedenog polimera u skladu su s literaturnim podacima (Gilman i sur., 1995). Sadržaj vlage u ishodnim polimerima te pripremljenim polimernim mikročesticama nije se značajno razlikovao.

Tablica 4. Sadržaj vlage u ishodnim polimerima i polimernim mikročesticama pripremljenim metodom sušenja raspršivanjem

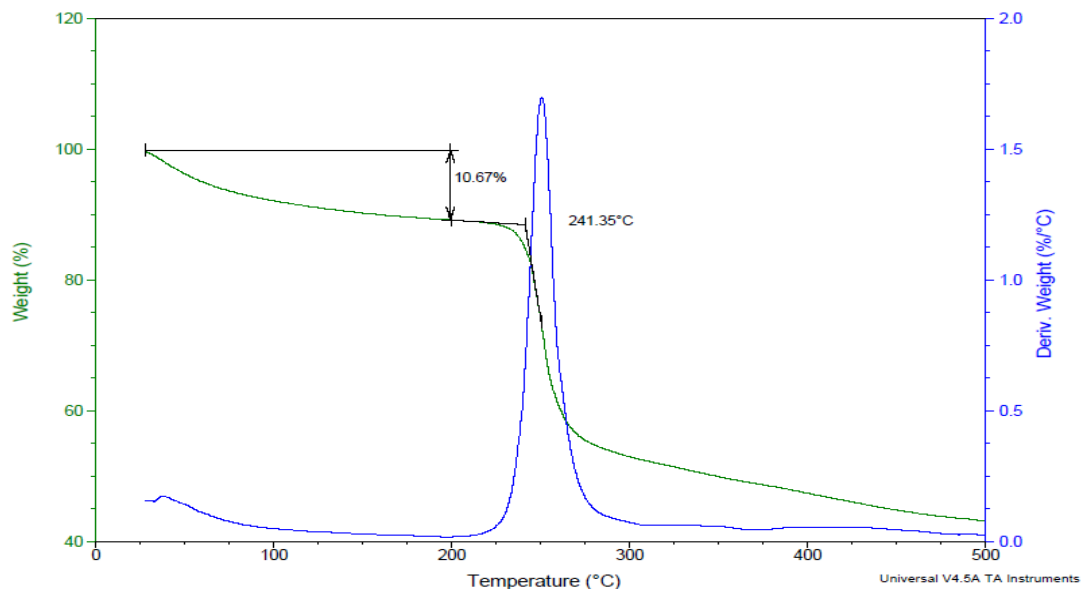
TIP POLIMERA	Δm (%)	
	Ishodni polimer	Polimerne mikročestice
MANUCOL® LKX	11,94	10,67
PROTANAL® 8133 CR	13,19	10,66
PROTANAL® 8223 CR	14,00	11,95
PVA 18-88	1,85	2,52

Izmjereni sadržaj vlage polimernih mikročestica veći je nego u sličnim istraživanjima dostupnima u literaturi. Primjerice, istraživane su polimerne mikročestice za pulmonalnu primjenu inzulina kao modelnog proteinskog lijeka, pripravljene sušenjem raspršivanjem uz primjenu pomoćnih tvari D-manitola (60%), natrijevog alginata (30%) i natrijevog citrata (4%). Sadržaj vlage u pripremljenim polimernim mikročesticama iznosio je 6% (Razavi Rohani i sur., 2014). U istraživanju u kojem su pripravljene mikročestice metformin hidroklorida i različitih polimera sušenjem raspršivanjem s ciljem povećanja kompresibilnosti prašaka jedan od ispitivanih polimera bio je natrijev alginat. Pripremljene su otopine metformin hidroklorida i natrijevog alginata u masenim omjerima 97,5:2,5 te 95,0:5,0 koje su potom vodom razrijeđene do koncentracije od 30%, *m/V*, i sušene raspršivanjem. Sadržaj vlage određen termogravimetrijskom analizom iznosio je 0,12% za niski udio natrijevog alginata te 0,74% za mikročestice s većim udjelom polimera (Al-Zoubi i sur., 2017). Nadalje, u istraživanju mukoadhezivnih polimera kao potencijalnih nosača lijekova za pulmonalnu primjenu pripravljene su mikročestice sušenjem raspršivanjem koje su sadržavale 10%, *m/m*, lijeka doksiciklina, 33% leucina, 37% laktoze i 20% mukoadhezivnog polimera. Jedan od ispitivanih polimera u tom istraživanju bio je natrijev alginat, a prilikom karakterizacije pripremljenih mikročestica termogravimetrijom je određen sadržaj vlage od $5,03 \pm 0,17$ % (Mishra i Mishra, 2012). Alginat kao ishodni polimer i alginatne mikročestice pripravljene sušenjem raspršivanjem vrlo su higroskopi stoga je moguće pretpostaviti kako

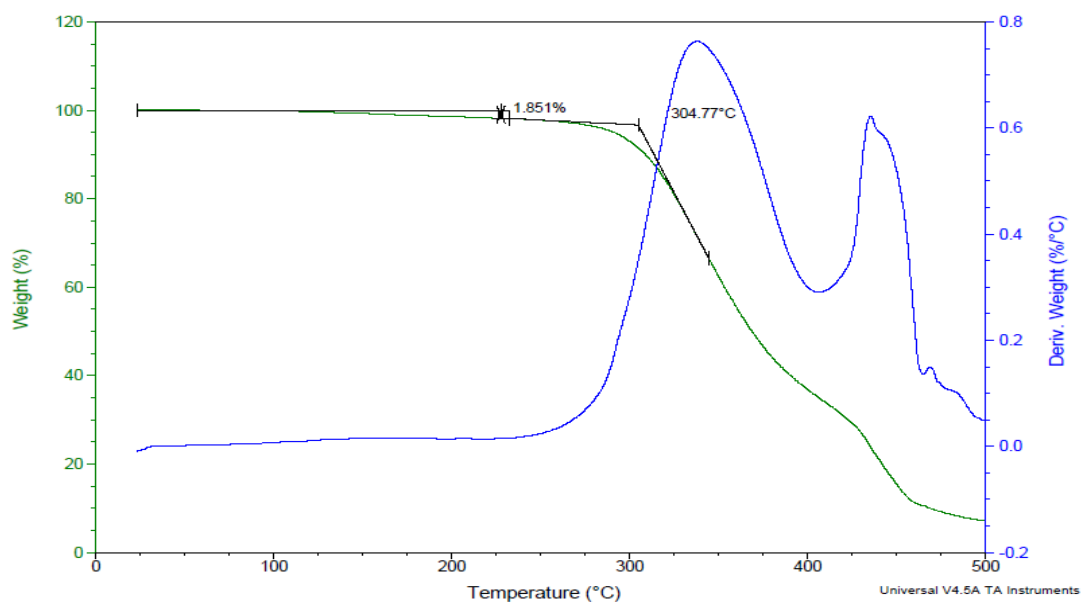
je razlog visokom sadržaju vlage utvrđenome u ovome radu nakupljanje atmosfere vlage prilikom sakupljanja suhoga produkta iz prihvatne posudice odnosno skladištenja ishodnog polimera/osušenog produkta između analiza.



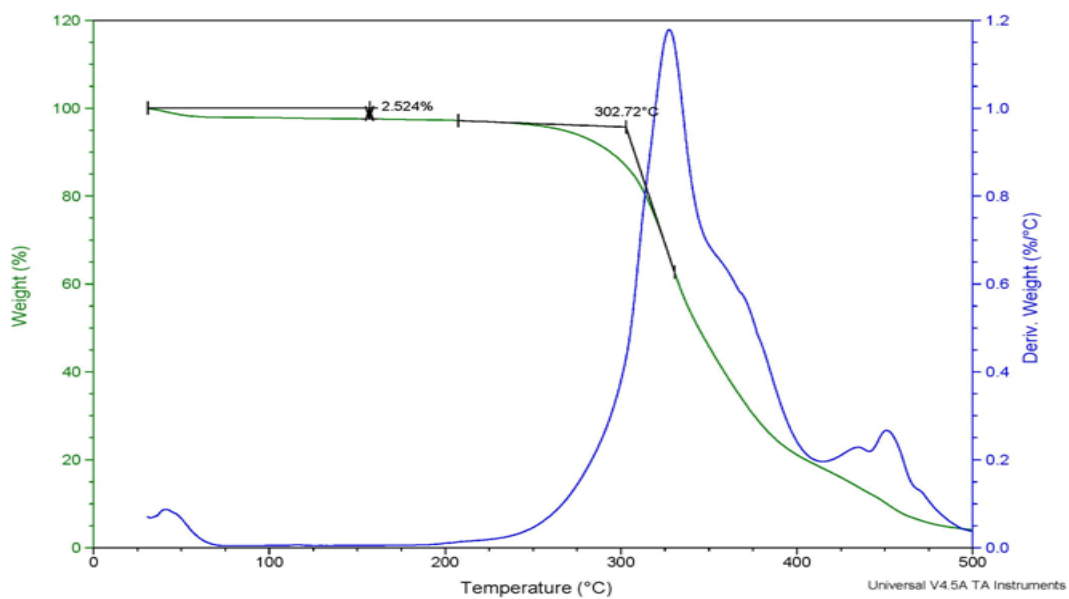
Slika 6. Termogram ishodnog polimera Manucol® LKX



Slika 7. Termogram mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera Manucol® LKX



Slika 8. Termogram ishodnog polimera PVA 18-88



Slika 9. Termogram mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88

4.4. DINAMIČKA SOPRCIJA VLAGE

Dinamička sorpcija vlage (engl. *dynamic vapour sorption*, DVS) je analitička tehnika kojom se analizira afinitet promatranog materijala prema vodi. Izoterma dobivena ovom analizom predstavlja interakciju materijala i vode tj. povezuje relativnu vlažnost zraka sa sadržajem vlage u materijalu pri konstantnoj temperaturi i tlaku (Punčochová, 2014). Razumijevanje utjecaja sadržaja vlage na strukturu i svojstva analiziranoga polimera od velike je važnosti pri razvoju novih terapijskih sustava. Usto, rezultati praćenja dinamičke sorpcije vlage pri kontroliranim uvjetima vlažnosti zraka i temperature, neophodni su pri razvoju matematičkih modela procesa sušenja raspršivanjem, za predviđanje sadržaja ostatne vlage u sušenim uzorcima u ovisnosti o postavljenim procesnim i formulacijskim parametrima (Langrish, 2009).

U radu u kojem je ispitivan utjecaj protoka komprimiranog zraka i ulazne temperature sušenja kao procesnih parametara sušenja raspršivanjem na svojstva dobivenih alginatnih mikročestica, sadržaj vlage u pripremljenim alginatnim mikročesticama varirao je između 10,13 i 11,63% (Svetec, 2017). U drugom radu u kojem je ispitivan utjecaj brzine dotoka uzorka i protoka medija za sušenje kroz sustav na svojstva alginatnih mikročestica određen je udio vlage koji je varirao između 9,75% i 11,51% (Nižić, 2017). Slični rezultati dobiveni su i u ovom radu (Tablica 4).

U Tablici 5 prikazani su rezultati dinamičke sorpcije vlage ishodnih polimera iz čega je vidljivo kako su alginatne mikročestice vrlo higroskopne te adsorbiraju/apsorbiraju velike količine vode. Postotak adsorbirane/apsorbirane vlage pri temperaturi od 25 °C i RH 40% odgovara utvrđenom sadržaju vlage u mikročesticama pripremljenim sušenjem raspršivanjem. Ti rezultati potvrđuju utemeljenost pretpostavke iznesene u prijašnjim radovima (Svetec, 2017; Nižić, 2017) da vlaga u sušenim uzorcima nije zaostala u procesu sušenja, već da se radi o vlazi adsorbiranoj/apsorbiranoj od strane suhog produkta prilikom sakupljanja iz prihvatne posudice pri ambijentalnim uvjetima.

Rezultati DVS analize ukazuju na značajno manju higroskopnost polimera PVA 18-88 u odnosu na ispitivane alginatne, što je u skladu i sa značajno manjim sadržajem vlage u uzorcima ishodnog polimera PVA 18-88 i mikročesticama pripremljenim sušenjem raspršivanjem otopine PVA 18-88 (Tablica 4).

Tablica 5. Dinamička sorpcija vlage na ishodne polimere

Uzorak RH/%	MANUCOL® LXX		PROTANAL® 8133 CR		PROTANAL® 8223 CR		PVA 18-88	
	A/ %	D/ %	A/ %	D/ %	A/ %	D/ %	A/ %	D/ %
0	0	0,66	0	0,45	0	0,29	0	2,70
10	2,19	5,70	2,22	5,61	1,74	4,87	0	2,97
20	*	10,88	5,69	10,83	4,77	9,88	0,02	3,43
30	8,07	14,48	8,65	14,49	7,42	13,42	0,06	3,93
40	11,63	17,73	12,16	17,60	10,84	16,58	0,11	4,50
50	15,82	20,54	16,22	20,67	14,60	19,68	0,18	5,21
60	20,17	23,85	20,52	23,93	18,11	23,11	0,68	6,23
70	25,39	28,27	25,59	27,87	23,27	26,54	1,93	7,90
80	33,51	33,74	33,78	33,87	30,43	32,18	5,08	11,20
90	51,09	50,59	53,52	54,85	42,18	42,18	12,13	17,56
95	69,49	69,49	71,41	71,41	/	/	18,76	18,76

A adsorbirana/apsorbirana vlaga; D desorbirana vlaga

Količina adsorbirane/apsorbirane i desorbirane vlage tijekom analize prikazana je kao postotak mase početnog uzorka ekvilibriranog pri 0% relativne vlažnosti.

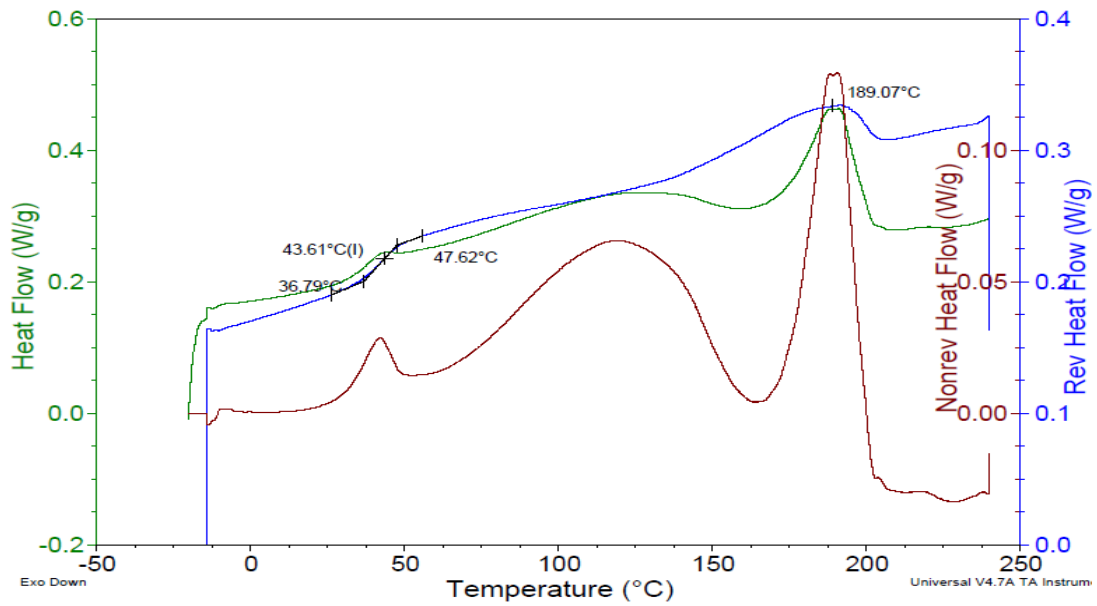
*Nije zabilježen podatak u postotku promjene mase pri 20% relativne vlažnosti. Zabilježen je podatak na 14% RH te iznosi 3,39.

4.5. TERMIČKA SVOJSTVA

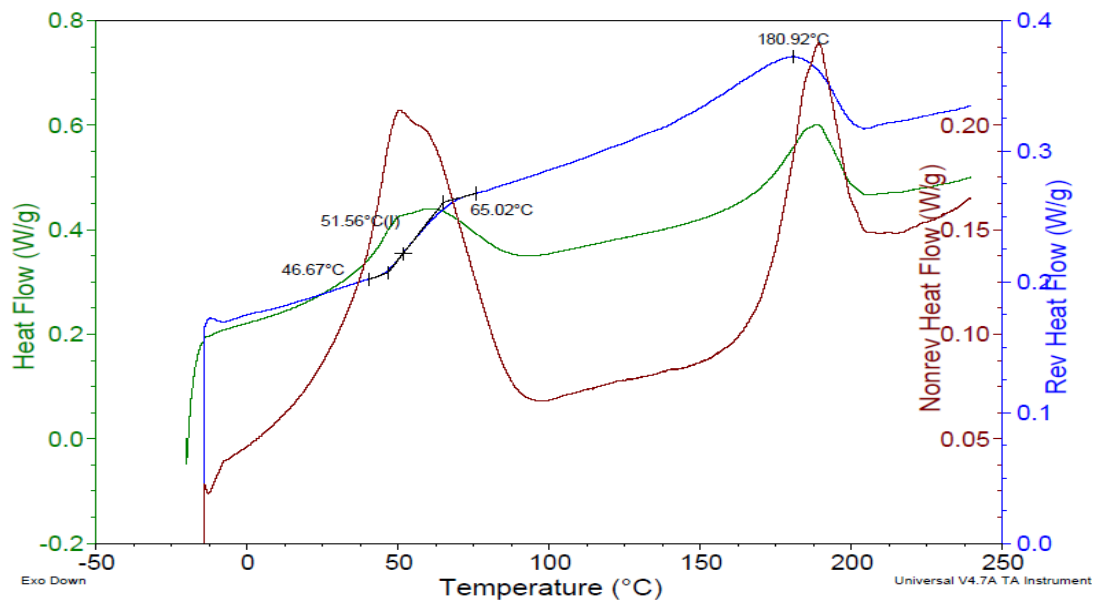
Termalna analiza uzoraka provedena je moduliranom diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (MDSC). MDSC je termalna analitička tehnika koja bilježi promjene toplinskog kapaciteta ispitivanog materijala kao promjenu u protoku topline u ovisnosti o temperaturi. Te promjene manifestiraju se kao fazni prijelazi tj. promjene faze termodinamičkog sustava. DSC se vrlo često koristi u ispitivanju polimernih materijala pri čemu se promatraju temperatura staklišta, temperatura kristalizacije i temperatura taljenja. Važno je napomenuti kako ne prolaze svi polimeri sve navedene promjene prilikom zagrijavanja (Menczel i sur., 2009).

Iz analize polimera PVA 18-88 vidljive su promjene u protoku topline u ovisnosti u temperaturi koje su određene kao temperatura staklišta i temperatura taljenja (Slika 10). Temperatura staklišta (T_g) je temperatura prijelaza iz stanja "stakla" u stanje "gume", odnosno iz stanja manje u stanje veće pokretljivosti molekula (Jalšenjak i sur., 1998). Iz prikaza je vidljivo kako se taj prijelaz ne događa pri točno određenoj vrijednosti temperature, već u određenom temperaturnom rasponu pri kojem dolazi do povećanja toplinskog kapaciteta polimera. Kao vrijednost temperature staklišta uzima se sredina nagiba krivulje, a očitana vrijednost za PVA 18-88 u ovome radu iznosi 47,62 °C. Temperatura taljenja (T_m) očitana je na maksimumu krivulje taljenja pri 189,07 °C. Pri temperaturi taljenja polimerni lanci nemaju organiziranu strukturu i slobodno se gibaju što dovodi do povećanja entropije sustava. Iz termograma je vidljivo kako je taljenje endoterman proces pri čemu dolazi do apsorpcije topline. Pri taljenju polimera temperatura ostaje ista iako se toplina konstantno dovodi u sustav. Energija dovedena tijekom tog vremena naziva se latentna toplina taljenja i troši se na taljenje kristaliničnih regija te ne povećava prosječnu kinetičku energiju polimernih lanaca koji su već rastaljeni. Latentna toplina taljenja može se izračunati iz površine ispod krivulje taljenja (Menczel i sur., 2009).

Iz termalne analize polimernih mikročestica PVA 18-88 pripremljenih sušenjem raspršivanjem i usporedbe s termogramom ishodnog polimera vidljiv je porast signala za temperaturu staklišta (Slika 11). Iz toga se može pretpostaviti kako je nakon sušenja raspršivanjem polimer amorfiji u odnosu na nativni polimer što je u skladu sa kinetikom sušenja raspršivanjem u čijoj podlozi leži brzo isparavanje otapala i amorfizacija suhe tvari (Singh i Van den Mooter, 2015).



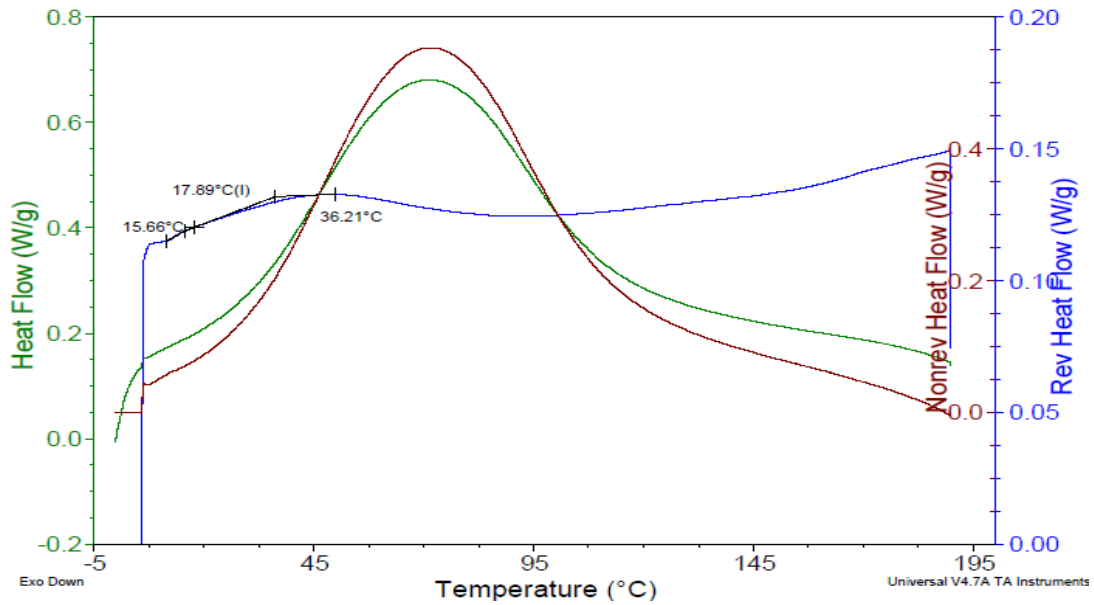
Slika 10. DSC termogram ishodnog polimera PVA 18-88



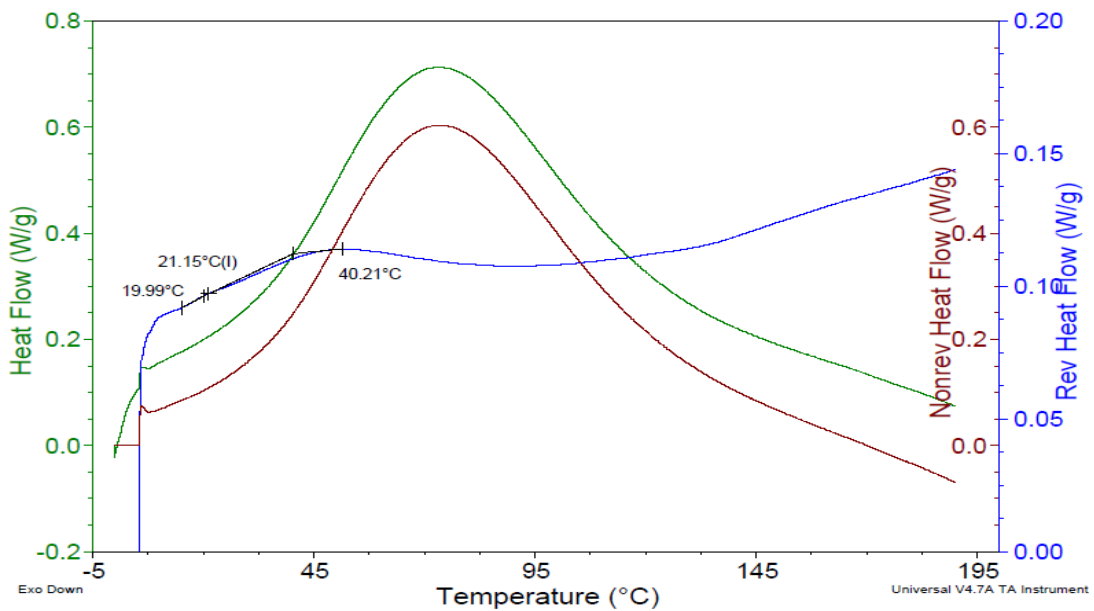
Slika 11. DSC termogram mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88

Na termogramima ishodnog polimera Protanal[®] 8223 i mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera Protanal[®] 8223 vidljiv je samo pik staklišta tj. prijelaz iz stanja "stakla" u stanje "gume" što je karakteristično za amorfne polimere (Slika 12.

i 13.). Pikovi kristalizacije i taljenja vidljivi su samo za kristalinične polimere, čime je potvrđena amorfnost alginatnih polimera.



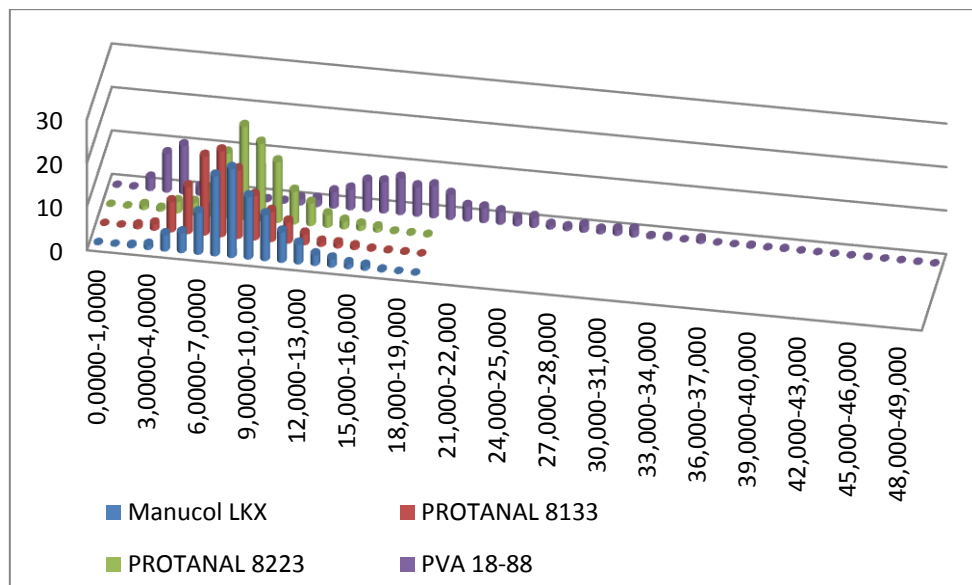
Slika 12. DSC termogram ishodnog polimera Protanal® 8223



Slika 13. DSC termogram mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera Protanal® 8223

4.5. VELIČINA POLIMERNIH MIKROČESTICA

Raspodjela veličina polimernih mikročestica te srednji promjer za svaki od uzoraka koji je sušen raspršivanjem prikazani su na Slici 13. te u Tablici 6.



Slika 13. Raspodjela veličina polimernih mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem

Kako je vidljivo iz prikazane raspodjele, najveći broj čestica kod uzoraka pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopina polimera Manucol[®] LKX i Protanal[®] CR 8223 bio je unutar razreda od 8 do 9 µm, a kod uzorka pripremljenog sušenjem raspršivanjem otopine polimera Protanal[®] CR 8133, u razredu od 7 do 8 µm. Kod PVA 18-88 mikročestica uočena je bimodalna raspodjela veličina čestica. Najveći broj izmjerenih čestica kretao se u razredima od 3 do 4 µm i od 17 do 18 µm. Bimodalna raspodjela veličina vidljiva je i na SEM mikrografiji (Slika 16).

Tablica 6. Srednji promjer polimernih mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem

Polimer	MANUCOL [®] LKX	PROTANAL [®] 8133 CR	PROTANAL [®] 8223 CR	PVA 18-88
Srednja veličina čestica/ µm	8,9±2,5	7,9±2,3	9,3±2,4	15,6±8,1

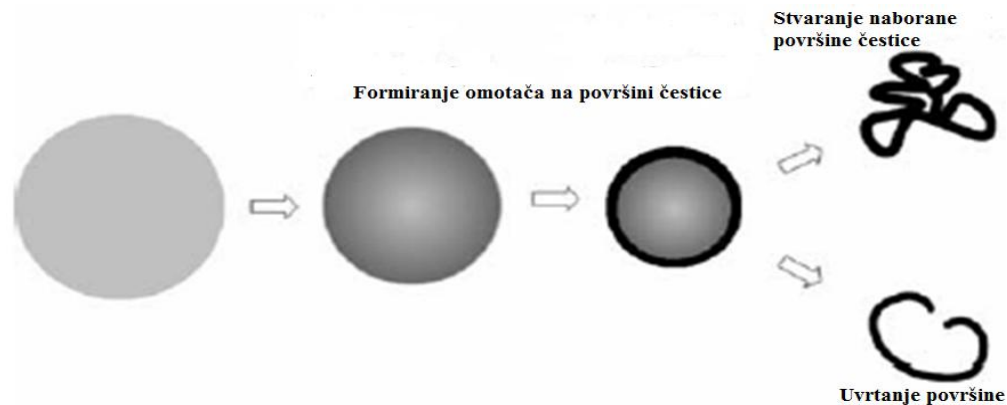
U radu u kojem je ispitivan utjecaj protoka komprimiranog zraka i ulazne temperature sušenja kao procesnih parametara sušenja raspršivanjem na svojstva dobivenih alginatnih

mikročestica pripravljena je 0,5 %, *m/V*, otopina polimera Protanal[®] CR 8223. Korištena je bifluidna sapnica veličine otvora od 0,5 mm. Aspirator je radio na 50% kapaciteta, a brzina dotoka uzorka iznosila je ~3,9 g/min. Ulazna temperatura i protok komprimiranog zraka su parametri koji su varirani te su iznosili 120 °C, 140 °C i 160 °C te 550 NI/h, 600 NI/h i 700 NI/h. Srednji promjer dobivenih čestica varirao je između $3,29 \pm 1,16$ i $3,59 \pm 1,50$ μm te je kod svih uzoraka primijećena slična raspodjela veličina čestica. Najveći postotak čestica imao je promjer u rasponu od 2 do 3 μm (Svetec, 2017). Vidljivo je kako su u ovome radu sušenjem raspršivanjem otopine istog polimera u istoj koncentraciji dobivene čestice većega promjera što je posljedica korištenja ultrazvučne sapnice. Bifluidna sapnica omogućuje dobivanje čestica u rasponu veličina od 1 do 25 μm , dok ultrazvučna sapnica omogućuje dobivanje većih čestica, u rasponu od 10 do 100 μm (4M8-TriX: installation and operation manual). Ultrazvučna sapnica posebice je pogodna za rad s pseudoplastičnim sustavima kakve su i alginatne otopine. Optimizacija frekvencije rada sapnice omogućuje dobivanje čestica željene veličine te postizanje uniformnosti veličina što je glavna prednost ove sapnice (Cal i Sollohub, 2010). Ultrazvučna sapnica posjeduje mogućnost atomizacije uzorka u relativno velike kapljice uz male vrijednosti protoka otopine (<50 ml/min) (Panão i sur., 2014). U ovome radu alginatne mikročestice imale su veličinu na donjoj granici raspona koji odgovara ultrazvučnoj sapnici, što može biti posljedica niske koncentracije otopina za sušenje i visoke frekvencije rada sapnice.

4.6. MORFOLOGIJA MIKROČESTICA

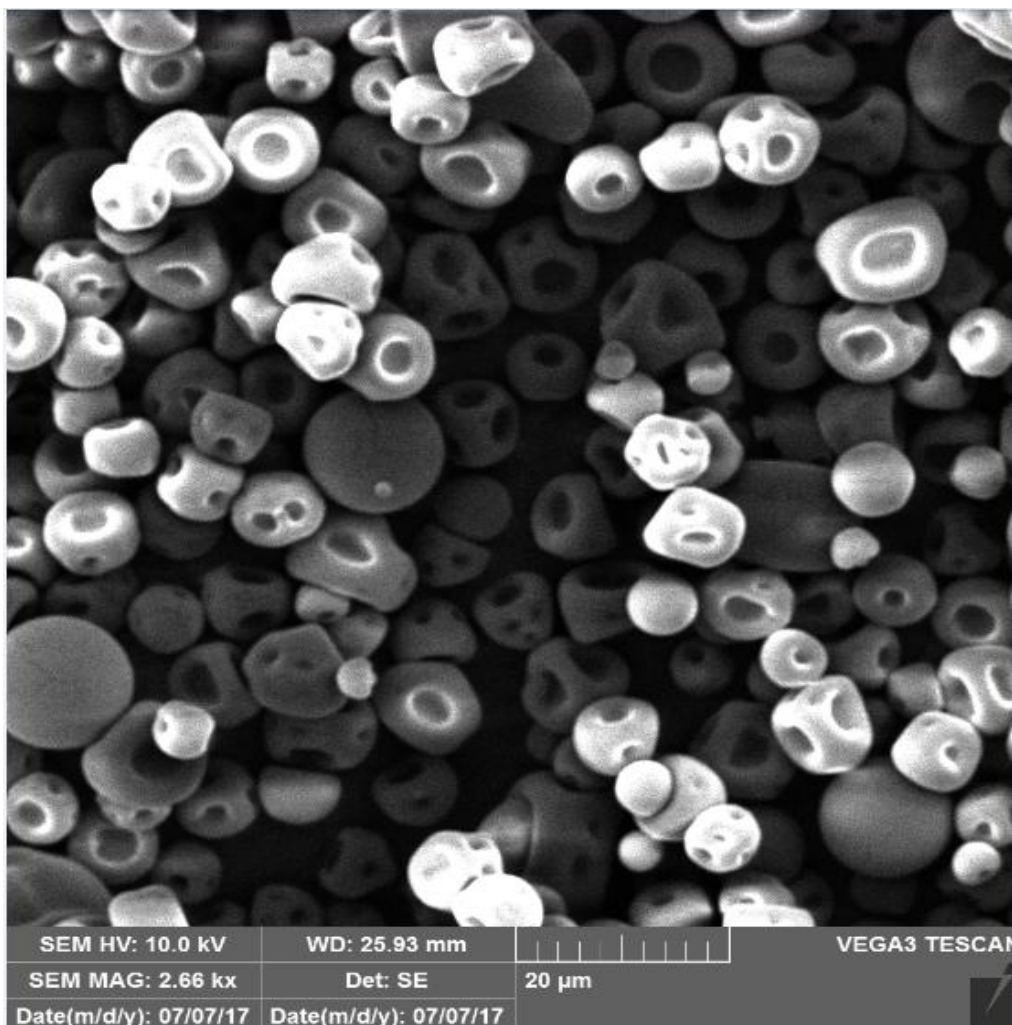
Morfologija polimernih mikročestica posljedica je kinetike sušenja raspršivanjem tj. različitih faza isparavanja otapala te prijenosa mase i energije između uzorka i vrućega medija za sušenje. Na konačnu morfologiju mikročestica utječu svi već ranije spomenuti parametri procesa sušenjem raspršivanjem, a posebice temperatura medija za sušenje te sadržaj vlage u uzorku (Alamilla-Beltrán i sur., 2005). Pri kontaktu raspršenih kapljica uzorka s vrućim zrakom, isparavanje otapala događa se gotovo trenutačno te se na površini čestice stvara ovojnica koja zarobljava ostatak otapala u njezinoj unutrašnjosti. U slučaju materijala veće molekulske mase kao što su alginati, formirani omotač može biti dovoljno stabilan i fleksibilan da omogući isparavanje preostalog otapala stvaranjem pora na površini čestice dok ostatak omotača zadržava sferični oblik čestice (Razavi Rohani i sur., 2014). Stvaranje takvih

deformacija na površini mikročestica tipično je za polimerne materijale sušene raspršivanjem koji imaju Pecletov broj veći od 1 (Slika 14; Vehring, 2008).



Slika 14. Oblikovanje površine mikročestica tijekom sušenja raspršivanjem za materijale čiji je Pecletov broj veći od 1 (preuzeto i prilagođeno iz Vehring, 2008)

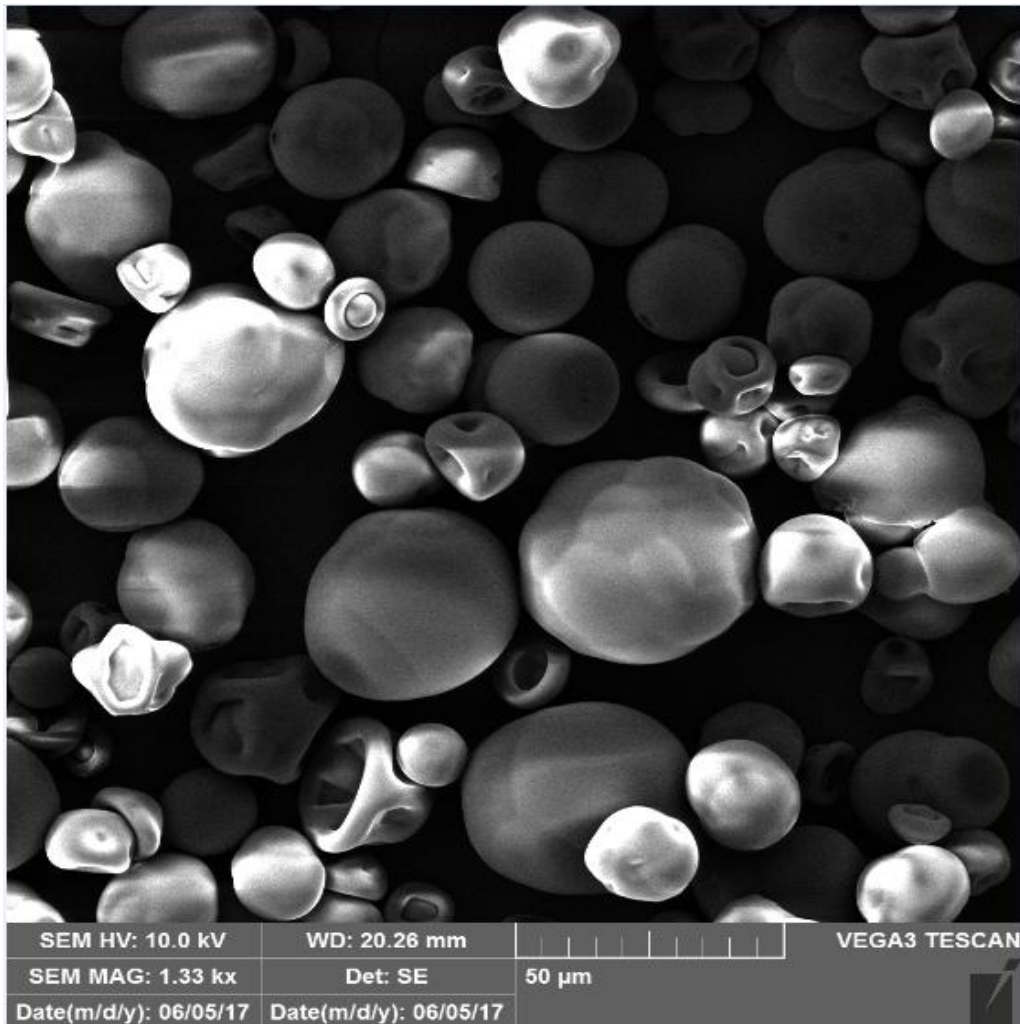
Na Slici 15. i 16. prikazana je SEM mikrografija alginatnih i PVA mikročestica pripremljenih u ovom istraživanju. Alginatne mikročestice sferičnog su oblika. Na njihovoj površini prisutna su brojna uvrnuća. Može se uočiti i nekoliko čestica s formiranim omotačem tj. korom s pukotinama koje nisu kolabirale i stvorile uvrnutu površinu (Slika 15.). Slična morfologija alginatnih mikročestica zabilježena je i u radovima Svetec (2017) i Nižić (2017). U već spomenutom radu kojeg su proveli Al-Zoubi i suradnici (2017) mikročestice metformin hidroklorida i natrijevog alginata bile su sferične s glatkom površinom, bez uvrnuća. Sušenje raspršivanjem provedeno je korištenjem bifluidne sapnice, pri ulaznoj temperaturi od 130-135 °C i protoku uzorka od 11-14 ml/min. Takva je morfologija primijećena i u istraživanju nanočestica pektina i alginata s uklopljenim gentamicin sulfatom, kojeg su proveli De Cicco i suradnici (2014). Maseni omjer pektina, natrijevog alginata i gentamicin sulfata iznosio je 1:1:1, a ukupne koncentracije koje su sušene raspršivanjem bile su 0,10%, 0,25% i 0,50%, *m/V*. Sušenje raspršivanjem provedeno je pri ulaznoj temperaturi od 90 °C, protoku uzorka od 9,7 ml/min, protoku zraka 100 l/min, pri radu aspiratora na 100% te korištenjem vibracijske sapnice promjera 4,0 μm . Međutim, povećanjem promjera sapnice na 7,0 μm smanjila se sferičnost nanočestica te se povećao broj čestice s naborima i uvrnućima.



Slika 15. SEM mikrografija alginatnih mikročestica (povećanje 2660 ×) pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera Protanal[®] 8223

Na SEM mikrografiji mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88 vidljive su čestice različitih razreda veličina tj. bimodalna raspodjela veličina (Slika 16.). Kod većine mikročestica vidljiva su uvrnuća na površini. Slična morfologija opisana je i u istraživanju u kojem su sušenjem raspršivanjem pripremljene mikročestice polivinilnog alkohola kao nosača lijekova za nazalnu primjenu. Uočene su agregirane čestice, ravne i glatke površine, ali i čestice s rupturama i uvrnućima (Ting i sur., 1992).

Veličine polimernih mikročestica dobivene SEM mikrografijom odgovaraju veličinama koje su izmjerene mikroskopski i prikazane na Slici 13.



Slika 16. SEM mikrografija mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88 (povećanje 1330 ×)

Morfologija (oblik i veličina) mikročestica uvelike utječe na reološka svojstva suhih prašaka kao i na biofarmaceutska svojstva mikročestica. O navedenim svojstvima ovisi primjenjivost i terapijski učinak mikročestica (primjerice, prašci inhalata), kao i mogućnost daljnjeg oblikovanja. Kako na morfologiju čestica suhog produkta utječu i procesni i formulacijski parametri, razvidna je važnost ispitivanja međuovisnosti i optimiranja parametara sušenja raspršivanjem, s ciljem pripreve mikročestica ciljnih morfoloških obilježja.

5. ZAKLJUČCI

- Polimerne mikročestice pripravljene su sušenjem raspršivanjem otopina triju tipova natrijevog alginata (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223, u koncentraciji 0,5 % (m/V)) i otopine PVA 18-88 u koncentraciji 2 % (m/V) korištenjem uređaja ProCepT.
- Odabrana konfiguracija uređaja za sušenje raspršivanjem (ultrazvučna sapnica, konusna kolona za sušenje i srednji ciklon s padom tlaka od približno 20 mbar) te postavke parametara (brzina peristaltičke pumpe za dovod uzorka 20%, snaga ultrazvučne sapnice 97%, brzina ulaznog zraka za sušenje 0,25 m³/min, temperatura ulaznog zraka 120 °C za alginatne i 150 °C za PVA 18-88), rezultirali su nedovoljnim sušenjem uzoraka, što je potrebno uzeti u obzir u sljedećim fazama razvoja.
- Iskorištenja pripreme mikročestica sušenjem raspršivanjem polimernih otopina iznosila su: 55,27% za Manucol[®] LKX, 24,69% za Protanal[®] CR 8133, 50,27% za Protanal[®] CR 8223 te 30,67% za PVA 18-88.
- Sadržaj vlage u alginatnim mikročesticama kretao se između 10,66 i 11,95% te je odgovarao količini adsorbirane/apsorbirane vlage na ishodne polimere pri temperaturi od 25 °C i RH 40%. Relativno velik sadržaj vlage alginatnih mikročestica posljedica je nakupljanja atmosfere vlage pri skupljanju suhog produkta iz prihvatne posudice. Sadržaj vlage u mikročesticama pripremljenim od PVA 18-88 iznosio je 2,52%.
- Sušenje raspršivanjem otopine polimera PVA 18-88 rezultiralo je njegovom amorfizacijom, dok su alginati bili amorfne strukture i prije sušenja raspršivanjem.
- Srednji promjer alginatnih mikročestica kretao se između 7,9±2,3 μm i 9,3±2,4 μm. U slučaju mikročestica pripremljenih od PVA 18-88, uočena je bimodalna raspodjela veličina čestica, sa srednjim promjerom od 15,6±8,1 μm.
- Alginatne mikročestice sferične su i uvrnute površine. Mikročestice pripravljene od PVA 18-88 imaju glatku površinu, ali su primijećene i one s rupturama i uvrnućima.
- Rezultati provedenih analiza korisni su za daljnje optimiranje procesa sušenja raspršivanjem i razvoj mikročestica kao terapijskih sustava temeljenih na alginatu.

6. LITERATURA

- Alamilla-Beltrán L, Chanona-Pérez JJ, Jiménez-Aparicio AR, Gutiérrez-Lopez GF. Description of morphological changes of particles along spray drying, *J Food Eng*, 2005, 67, 179–184.
- Al-Zoubi N, Odeh F, Nikolakakis I. Co-spray drying of metformin hydrochloride with polymers to improve compaction behavior. *Powder Technol*, 2017, 307, 163–174.
- Aundhia, CJ, Raval, JA, Patel MM, Shah NV, Chauhan SP, Sailor GU, Javia AR, Mahashwari, RA. Spray Drying in the Pharmaceutical Industry – A Review. *Indo Am j pharm res*, 2011, 2(1), 125–138.
- Borgogna M, Skjåk-Bræk G, Paoletti S, Donati I. On the Initial Binding of Alginate by Calcium Ions. The Tilted Egg-Box Hypothesis. *J Phys Chem B*, 2013, 117 (24), 7277–7282.
- Bouhadir KH, Alsberg E, Mooney DJ. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials*, 2001, 22, 2625–2633.
- Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: hardware and process parameters. *J Pharm Sci*, 2010, 99 (2), 575-586.
- Ceschan NE, Bucalá V, Ramírez-Rigo MV, Smyth HDC. Impact of feed counterion addition and cyclone type on aerodynamic behavior of alginic-atenolol microparticles produced by spray drying. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 109, 72–80.
- Chen KH, Di Sabatino M, Albertini B, Passerini N, Kett VL. The effect of polymer coatings on physicochemical properties of spray-dried liposomes for nasal delivery of BSA. *Int J Pharm*, 2013, 50, 312–322.
- Chiu CT, Hsu CM, Wang CC, Chang JJ, Sung CM, Lin CJ, Chen LW, Su MY, Chen TH. Randomised clinical trial: sodium alginate oral suspension is non-inferior to omeprazole in the treatment of patients with non-erosive gastroesophageal disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 38, 1054-1064.

- De Cicco F, Porta A, Sansone F, Aquino RP, Del Gaudio P. Nanospray technology for an in situ gelling nanoparticulate powder as a wound dressing. *Int J Pharm*, 2014, 473, 30–37.
- Donati I, Paoletti S. Material properties of alginates. U: *Alginates: biology and application*. Rehm BHA, London, Springer, 2009, str. 1-55.
- Draget KI. Alginates. *Woodhead Publ Ser Food Sci Technol Nutr*, 2009, 173, 807–828.
- Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from algae. U: *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents*. Steinbuchel A, Rhee SK, Weinheim, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, str. 1–30.
- Dumville JC, O'Meara S, Deshpande S, Speak K. Alginate dressings for healing diabetic foot ulcers (Protocol). *The Cochrane Library*, 2011, 5, 1-14.
- Ertesvåg H, Valla S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym Degrad Stab*, 1998, 59, 85–91.
- Estevinho BFN, Carlan I, Blaga A, Rocha. Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technol*, 2016, 289, 71–78.
- FMC Health and Nutrition Alginates Brochure, 2003, <http://www.fmcbiopolymer.com>, pristupljeno 1.6.2017.
- Gacesa P. Alginates. *Carbohydr Polym*, 1988, 8, 161–182.
- Gilman JW, VanderHart DL, Kashiwagi T. Thermal Decomposition Chemistry of Poly (vinyl alcohol). U: *Fire and Polymers II Materials and Test for Hazard Prevention ACS*. Nelson GL, Washington DC, American Chemical Society, 1995, str. 161-185.
- Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 16-23; 65-67.
- Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108, 308-328.

- Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV, Ziganshina OA. Physical-Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russ J Mar Biol*, 2001, 27, 53–64.
- Langrish TAG. Multi-scale mathematical modelling of spray dryers. *J Food Eng*, 2009, 93, 218-228.
- Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 2012, 37 (1), 106-126.
- Mahdavinia GR, Mousanezhad S, Hosseinzadeh H, Darvishi F, Sabzi M. Magnetic hydrogel beads based on PVA/sodium alginate/laponite RD and studying their BSA adsorption. *Carbohydr Polym*, 2016, 147, 379–391.
- Menczel JD, Judovits L, Prime RB, Bair HE, Reading M, Swier S. Differential scanning calorimetry (DSC). U: Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications. Menczel JD, Prime RB, New York, John Wiley & Sons, Inc., 2009, str. 1-233.
- Mishra M, Mishra B. Mucoadhesive Microparticles as Potential Carriers in Inhalation Delivery of Doxycycline Hyclate: A Comparative Study. *Acta Pharm Sin B*, 2012, 2, 518–526.
- Murillo-Álvarez JI, Hernández-Carmona G. Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico, *J Appl Phycol*, 2007, 19, 545-548.
- Möbus K, Siepmann J, Bodmeier R. Zinc-alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. *Int J Pharm*, 2012, 81, 121–130.
- Nagarajan A, Shanmugam A, Zackaria A. Mini review on alginate: Scope and future prospectives. *J Algal Biomass Utln*, 2016, 7 (1), 45-55.
- Nižić L. Utjecaj brzine dotoka uzorka i protoka medija za sušenje na svojstva alginatnih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, diplomski rad, 2017.
- Ohtake S, Shalaev E. Effect of Water on the Chemical Stability of Amorphous Pharmaceuticals: I. Small Molecules, *J Pharm Sci*, 2013, 102, 1139–1154.

- Panão MO, Moreira ALN, Vicente J, Costa E. Assessment of ultrasonic sprays for spray drying. International symposium on applications of laser techniques to fluid mechanics, Lisbon, 2014.
- ProCepT 4M8-TriX: installation and operation manual: fluid bed, pan coater, spray dryer, nitrogen unit. Zelzate, Belgija.
- Punčochová K, Heng JYY, Beránek J, Štěpánek F. Investigation of drug-polymer interaction in solid dispersions by vapour sorption methods. *Int J Pharm*, 2014, 469, 159–167.
- Razavi Rohani SS, Abnous K, Tafaghodi M. Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of Insulin with regard to the selection of excipients. *Int J Pharm*, 2014, 465, 464–478.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Chicago, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006, str. 21-23.
- RefluSTAT antirefluksna oralna suspenzija, 2016, <https://www.jgl.hr>, pristupljeno 20.7.2017.
- Sažetak opisa svojstava lijeka Gaviscon Original, 2013, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 20.7.2017.
- Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv. Drug Deliv Rev*, 2015, 100, 27-50.
- Skjåk-Bræk G, Draget KI. Alginates: Properties and Applications. U: Polymer Science: A Comprehensive Reference. Moeller M, Matyjaszewski K, Amsterdam, Elsevier Science, 2012, str. 213–220.
- Soares JP, Santos JE, Chierice GO, Cavalheiro ETG. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Ecl Quím*, 2004, 29, 53–56.
- Svetec M. Utjecaj protoka komprimiranog zraka i ulazne temperature na svojstva alginatnih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, diplomski rad, 2017.
- Szekalska M, Puciłowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Int J Polym Sci*, 2016, vol. 2016.

- Ting TY, Gonda I, Gipps EM. Microparticles of Polyvinyl Alcohol for Nasal Delivery. I. Generation by Spray-Drying and Spray-Desolvation. *AAPS J*, 1992, 9, 1330–1335.
- Training Papers Spray Drying, 2002., <https://www.buchi.com>, pristupljeno 28.7.2017.
- Vasishtha SG, Viswanathan G. Isolation and Characterization of Bromelain (BML) Proteases from *Ananas comosus* an asset to Cancer Chemotherapy. *Int j pharmacol toxicol*, 2013, 1 (2), 82-90.
- Vehring, R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharm Res*, 2008, 25 (5), 999-1022.
- Zain NAM, Suhaimi MS, Idris A. Development and modification of PVA-alginate as a suitable immobilization matrix. *Process Biochem*, 2011, 46, 2122–2129.
- Yang JM, Yang JH, Tsou SC, Ding CH, Hsu CC, Yang KC, Yang CC, Chen KS, Chen SW, Wang JS. Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly(γ -glutamic acid) electrospun fiber. *Mater Sci Eng C*, 2016, 66, 170–177.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Alginati su prirodni polimeri koji se zbog svojih poželjnih svojstava uvelike koriste u farmaceutskoj industriji. Novija istraživanja biofarmaceutske primjene alginata usmjerena su k razvoju alginatnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem djelatne tvari. Sušenje raspršivanjem jedna je od najčešće korištenih metoda u pripravi takvih terapijskih sustava jer optimiranje procesnih i formulacijskih parametara omogućuje dobivanje čestica željenih fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih svojstava.

Cilj ovog rada bio je provesti fizičko-kemijsku karakterizaciju triju različitih tipova alginata (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223) kao ishodnih polimera, i mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem polimernih otopina, a u svrhu optimiranja procesa sušenja i svojstava dobivenog suhog produkta. Uz alginat karakteriziran je i polivinilni alkohol PVA 18-88 (PVA) kao polimer koji se može kombinirati s alginatima u izradi mikročestica željenih biofarmaceutskih svojstava. Sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju ProCepT uz upotrebu ultrazvučne sapnice, konusne kolone za sušenje i srednjeg ciklona s padom tlaka od približno 20 mbar, pri brzini peristaltičke pumpe za dovod uzorka 20%, snazi ultrazvučne sapnice 97%, brzini ulaznog zraka za sušenje 0,25 m³/min i temperaturi ulaznog zraka 120 °C za alginat i 150 °C za PVA. Odabrana konfiguracija uređaja te postavke parametara rezultirali su nedovoljnim sušenjem produkta, što je potrebno uzeti u obzir u sljedećim fazama razvoja. Iskorištenja procesa sušenja bila su u rasponu od 24,69 do 55,27%. Sadržaj vlage u alginatnim mikročesticama kretao se između 10,66 i 11,95%, te je odgovarao količini adsorbirane/apsorbirane vlage na ishodne polimere pri temperaturi od 25 °C i relativnoj vlažnosti od 40%. Relativno velik sadržaj vlage alginatnih mikročestica posljedica je nakupljanja atmosfere vlage nakon sušenja raspršivanjem. Sadržaj vlage u PVA mikročesticama iznosio je 2,52%. Sušenje raspršivanjem otopine polimera PVA rezultiralo je njegovom amorfizacijom, dok su alginati bili amorfne strukture i prije sušenja raspršivanjem. Srednji promjer alginatnih mikročestica kretao se između 7,9±2,3 μm i 9,3±2,4 μm. U slučaju PVA mikročestica, uočena je bimodalna raspodjela veličina čestica, sa srednjim promjerom od 15,6±8,1 μm. Alginatne mikročestice sferičnog su oblika i uvrnute površine. PVA mikročestice imaju glatku i ravnu površinu, ali su primjećene i one s rupturama i uvrnućima. Rezultati provedenih analiza korisni su za daljnje optimiranje procesa sušenja raspršivanjem i razvoj mikročestica kao terapijskih sustava temeljenih na alginatu.

Alginate is a natural polymer that is widely used in pharmaceutical industry due to its favorable properties. Current research is directed towards the development of alginate based controlled-release drug delivery systems. Spray-drying is one of the most widely used methods for the preparation of such drug delivery systems since optimisation of the process and formulation parameters enables the preparation of particles with desirable physico-chemical and biopharmaceutical properties.

The aim of this work was to determine physico-chemical properties of three different alginates (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223), as well as alginate microparticles prepared by spray-drying of polymer solutions, with the aim to optimise the spray-drying process and the properties of the dry product. Besides alginates, another polymer, polyvinyl alcohol PVA 18-88 (PVA) was characterised since it can be combined with alginates in order to obtain microparticles with desired biopharmaceutical properties. Spray-drying was performed using the ProCepT spray-dryer with the ultrasonic nozzle, standard conical process column and medium cyclone with pressure fall of 20 mbar, at peristaltic pump speed of 20%, ultrasonic nozzle power of 97%, inlet air flow of 0,25 m³/min, inlet air temperature of 120 °C for alginate samples and 150 °C for PVA sample. The spray-dryer configuration and the process parameters employed resulted in insufficient drying of the product, which should be considered in the following stages of the formulation development. Process yield was in range from 24,69 to 55,27%. The moisture content of the spray-dried alginate microparticles was in range from 10,66 to 11,95% and it was consistent with vapour sorption on constitutive polymers at temperature of 25 °C and 40% of relative humidity. Relatively high moisture content of alginate microparticles was a result of the sorption of atmospheric moisture after the spray-drying process. The moisture content in PVA microparticles was 2,52%. Spray-drying of PVA solution resulted in amorphisation of the polymer material while alginates had an amorphous structure even before spray-drying. The mean diameter of alginate microparticles was in the range from 7,9±2,3 µm to 9,3±2,4 µm. For PVA microparticles bimodal size distribution was observed. The mean diameter of PVA microparticles was 15,6±8,1 µm. Alginate microparticles were spherical in shape with buckled surface. Most of PVA microparticles had smooth surface but those with ruptures and pores were also observed. The results of these analyses are useful for the further optimisation of the spray-drying process and the development of alginate-based microparticles as drug delivery systems.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PREFORMULACIJSKA ISPITIVANJA U RAZVOJU ALGINATNIH MIKROČESTICA PRIPRAVLJENIH METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Jelena Mišić

SAŽETAK

Alginati su prirodni polimeri koji se zbog svojih poželjnih svojstava uvelike koriste u farmaceutskoj industriji. Novija istraživanja biofarmaceutске primjene alginata usmjerena su k razvoju alginatnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem djelatne tvari. Sušenje raspršivanjem jedna je od najčešće korištenih metoda u pripravi takvih terapijskih sustava jer optimiranje procesnih i formulacijskih parametara omogućuje dobivanje čestica željenih fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih svojstava.

Cilj ovog rada bio je provesti fizičko-kemijsku karakterizaciju triju različitih tipova alginata (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223) kao ishodnih polimera, i mikročestica pripremljenih sušenjem raspršivanjem polimernih otopina, a u svrhu optimiranja procesa sušenja i svojstava dobivenog suhog produkta. Uz alginatne karakteriziran je i polivinilni alkohol PVA 18-88 (PVA) kao polimer koji se može kombinirati s alginatima u izradi mikročestica željenih biofarmaceutskih svojstava. Sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju ProCepT uz upotrebu ultrazvučne sapnice, konusne kolone za sušenje i srednjeg ciklona s padom tlaka od približno 20 mbar, pri brzini peristaltičke pumpe za dovod uzorka 20%, snazi ultrazvučne sapnice 97%, brzini ulaznog zraka za sušenje 0,25 m³/min i temperaturi ulaznog zraka 120 °C za alginatne i 150 °C za PVA. Odabrana konfiguracija uređaja te postavke parametara rezultirali su nedovoljnim sušenjem produkta, što je potrebno uzeti u obzir u sljedećim fazama razvoja. Iskorištenja procesa sušenja bila su u rasponu od 24,69 do 55,27%. Sadržaj vlage u alginatnim mikročesticama kretao se između 10,66 i 11,95%, te je odgovarao količini adsorbirane/apsorbirane vlage na ishodne polimere pri temperaturi od 25 °C i relativnoj vlažnosti od 40%. Relativno velik sadržaj vlage alginatnih mikročestica posljedica je nakupljanja atmosferske vlage nakon sušenja raspršivanjem. Sadržaj vlage u PVA mikročesticama iznosio je 2,52%. Sušenje raspršivanjem otopine polimera PVA rezultiralo je njegovom amorfizacijom, dok su alginati bili amorfne strukture i prije sušenja raspršivanjem. Srednji promjer alginatnih mikročestica kretao se između 7,9±2,3 μm i 9,3±2,4 μm. U slučaju PVA mikročestica, uočena je bimodalna raspodjela veličina čestica, sa srednjim promjerom od 15,6±8,1 μm. Alginatne mikročestice sferičnog su oblika i uvrnute površine. PVA mikročestice imaju glatku i ravnu površinu, ali su primjećene i one s rupturama i uvrnućima. Rezultati provedenih analiza korisni su za daljnje optimiranje procesa sušenja raspršivanjem i razvoj mikročestica kao terapijskih sustava temeljenih na alginatu. Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 16 grafičkih prikaza, 6 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sušenje raspršivanjem; Alginatne mikročestice; Polivinilni alkohol; 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 ALGINATE MICROPARTICLES PREPARED BY SPRAY-DRYING METHOD

Jelena Mišić

SUMMARY

Alginate is a natural polymer that is widely used in pharmaceutical industry due to its favorable properties. Current research is directed towards the development of alginate based controlled-release drug delivery systems. Spray-drying is one of the most widely used methods for the preparation of such drug delivery systems since optimisation of the process and formulation parameters enables the preparation of particles with desirable physico-chemical and biopharmaceutical properties.

The aim of this work was to determine physico-chemical properties of three different alginates (Manucol[®] LKX, Protanal[®] CR 8133 i Protanal[®] CR 8223), as well as alginate microparticles prepared by spray-drying of polymer solutions, with the aim to optimise the spray-drying process and the properties of the dry product. Besides alginates, another polymer, polyvinyl alcohol PVA 18-88 (PVA) was characterised since it can be combined with alginates in order to obtain microparticles with desired biopharmaceutical properties. Spray-drying was performed using the ProCepT spray-dryer with the ultrasonic nozzle, standard conical process column and medium cyclone with pressure fall of 20 mbar, at peristaltic pump speed of 20%, ultrasonic nozzle power of 97%, inlet air flow of 0,25 m³/min, inlet air temperature of 120 °C for alginate samples and 150 °C for PVA sample. The spray-dryer configuration and the process parameters employed resulted in insufficient drying of the product, which should be considered in the following stages of the formulation development. Process yield was in range from 24,69 to 55,27%. The moisture content of the spray-dried alginate microparticles was in range from 10,66 to 11,95% and it was consistent with vapour sorption on constitutive polymers at temperature of 25 °C and 40% of relative humidity. Relatively high moisture content of alginate microparticles was a result of the sorption of atmospheric moisture after the spray-drying process. The moisture content in PVA microparticles was 2,52%. Spray-drying of PVA solution resulted in amorphisation of the polymer material while alginates had an amorphous structure even before spray-drying. The mean diameter of alginate microparticles was in the range from 7,9±2,3 µm to 9,3±2,4 µm. For PVA microparticles bimodal size distribution was observed. The mean diameter of PVA microparticles was 15,6±8,1 µm. Alginate microparticles were spherical in shape with buckled surface. Most of PVA microparticles had smooth surface but those with ruptures and pores were also observed. The results of these analyses are useful for the further optimisation of the spray-drying process and the development of alginate-based microparticles as drug delivery systems.

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

Thesis includes: 48 pages, 16 figures, 6 tables and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Spray-drying; Alginate microparticles; PVA 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.