

**Univerzitet u Beogradu**  
**Farmaceutski fakultet**

**Mladen R. Milović**

**RAZVOJ, IZRADA I KARAKTERIZACIJA**  
**ČVRSTIH SAMODISPERGUJUĆIH**  
**FORMULACIJA ZA ORALNU PRIMENU**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2015

**University of Belgrade**  
**Faculty of Pharmacy**

**Mladen R. Milović**

**DEVELOPMENT, PREPARATION AND  
CHARACTERIZATION OF SOLID  
SELFDISPERSING FORMULATIONS FOR  
ORAL APPLICATION**

**Doctoral dissertation**

Belgrade, 2015.

**Mentor**

.....  
Prof. Dr Svetlana Ibrić,  
Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije**

.....  
Prof. Dr Zorica Đurić.  
Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

.....  
Doc. Dr Ljiljana Đekić  
Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

.....  
Doc. Dr Dragana Vasiljević  
Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

Kandidat:  
Mladen R. Milović, dipl.farm .  
Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

.....  
Dr Branka Grujić,  
naučni saradnik,  
Galenika a.d.

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutski tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i u Laboratoriji za industrijsku farmaciju, Katedre za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutskog fakulteta, Freie Univerziteteta u Berlinu, Nemačka.*

*Želim posebno da se zahvalim prof. dr Svetlani Ibrić, na nesebičnoj pomoći, ohrabrenjima i savetima koje mi je pružila u svim fazama izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Roland Bodmeier - u na pruženoj prilici da deo eksperimentalnog rada ove disertacije obavim u Laboratoriji za industrijsku farmaciju Katedre za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutskog fakulteta Freie Univerziteteta u Berlinu. Veliku zahvalnost dugujem i dr Andrei Dashevsky, na korisnim savetima i pomoći prilikom realizacije eksperimenata kao i nesebičnom angažovanju prilikom tumačenja rezultata.*

*Zahvaljujem se dr Ljiljani Đekić na pomoći i angažovanju pri reološkom ispitivanju u fazi istraživanja samomikroemulgujućih sistema kao i na kontinuiranoj saradnji i korisnim sugestijama prilikom obrade rezultata.*

*Zahvaljujem se se dr Jeleni Đuriš na angažovanju i nesebičnoj pomoći u fazi istraživanja čvrstih samomikroemulgujućih sistema.*

*Zahvaljujem se prof. dr Zorici Đurić na korisnim sugestijama i pruženoj podršci prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Dragani Vasiljević na korisnim savetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na kolegijalnoj podršci i razumevanju.*

*Motivaciju i inspiraciju za izradu ove disertacije mi je pružila moja porodica, roditelji i supruga, dajući mi beskrajnu ljubav i podršku na čemu sam im neizmerno zahvalan.*

# Lista skraćena

C – cosurfaktant – kosurfaktant

CBZ – carbamazepine - karbamazepin

CFR – Code of Federal Regulations

CIR – The Cosmetics Ingredient Rewiev

DSC – Differential Scanning Calorimetry – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

FT-IR – Fourier Transform Infrared spectroscopy – IR spektroskopija sa Furijevom transformacijom

GRAS – Generally Recognized As Safe

GI – gastro-intestinalno

HLB – hidrofilno-lipofilni balans

K<sub>m</sub> – surfaktant/kosurfaktant odnos

LADMER – liberation, absorption, distribution, metabolism, elimination. responce – oslobađanje, apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, odgovor

O – oil - ulje

PAM – površinski aktivna materija

PCS – Photon Correlation Spectroscopy – Fotonska korelaciona spektroskopija

PEG - polietilenglikol

Ph. Eur. – European Pharmacopeia

Psi – porozni silika materijali

S - surfaktant

SC/O – surfactant-cosurfactant/oil ratio – surfaktant-kosurfaktant/ulje odnos

SEDDS – Self-emulsifying drug delivery system - samoemulgujući sistem

SEPS – Self-emulsifying phospholipid ssuspension - samoemulgjuća fosfolipidna suspenzija

SSEPS – Solid Self-emulsifying phospholipid ssuspension – čvrsta samoemulgjuća fosfolipidna suspenzija

SMEDDS – Self-microemulsifying drug delivery system - samomikroemulgjući sistem

SSEDDS – Solid Self-emulsifying drug delivery system - čvrsti samoemulgjući sistem

SSMEDDS – Solid Self-microemulsifying drug delivery system – čvrsti samomikroemulgjući sistem

U – ulje

U/V – ulje-u-vodi

V – voda

V/U – voda-u-ulju

## Kratak sadržaj

U radu su formulisane i ispitane i formulisane različiti čvrsti samodispergujući sistemi kao potencijalni nosači za teško rastvorljivu model lekovitu supstancu karbamazepin (CBZ). Ispitivani su: čvrsti samomikroemulgujući sistem (*eng.* Solid Self-microemulsifying drug delivery system, skr. SSMEDDS), čvrsta samomulgujuća fosfolipidna suspenzija (*eng.* Solid Self-emulsifying phospholipid suspension, skr. SSEPS) kao i samoemulgujuće pelete. **Samomikroemulgujući sistem** (*eng.* Self-microemulsifying drug delivery system - SMEDDS) je formulisan korišćenjem surfaktanta (Polisorbat 80 (S)), kosurfaktanta (PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)) i uljane faze (trigliceridi srednje dužine lanca (O)). Prilikom izrade SSMEDDS sistema korišćena su četiri različita adsorbensa velike specifične aktivne površine, pri čemu su dva bila tipa magnezijum-aluminometasilikata (Neusilin<sup>®</sup> UFL2 i Neusilin<sup>®</sup> FL2) i dva tipa silicijum-dioksida (Sylsya<sup>®</sup> 320 i Sylsya<sup>®</sup> 350). Ispitana je mikroemulziona oblast sistema pri odnosu surfaktanta i kosurfaktanta (Km) 1:1 i SMEDDS formulacija sa surfaktant-kosurfaktant/ulje odnosom (*eng.* surfactant-cosurfactant/oil ratio - SC/O) 8/2 je izabrana za dalja istraživanja. Kapacitet solubilizacije odabrane SMEDDS formulacije za CBZ iznosio je  $33771 \pm 41 \mu\text{g/ml}$ . Reološka merenja SMEDDS formulacije sa i bez CBZ, pri sadržaju vode od 10 do 60 % (m/m), su pokazala da nakon razblaženja sa vodom CBZ ima znatan uticaj na reološko ponašanje ispitivanih sistema. Fotonska korelaciona spektroskopija je pokazala sposobnost formulacije da, nakon razblaženja sa vodom, formira kapi čiji prečnik odgovara mikroemulzijama. SSMEDDS formulacije su znatno poboljšale brzinu rastvaranja CBZ, pri čemu je pokazano da vrsta adsorbensa znatno utiče na brzinu rastvaranja. Kod formulacija sa adsorbensom tipa magnezijum-aluminometasilikata brzina rastvaranja CBZ opada sa porastom specifične aktivne površine, usled zadržavanja dela tečne SMEDDS unutar pora sistema i njegovom postepenom izlaganju spoljašnjem medijumu. SSMEDDS formulacije sa adsorbensima na bazi silicijum-dioksida nisu pokazale značajnu razliku u odnosu na odgovarajuće fizičke smeše. Prisustvo amorfne oblike CBZ u fizičkim smešama je razlog primećene velike brzine rastvaranja. Takođe je formulisana **samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija** (*eng.* Self-emulsifying phospholipid suspension, skr. SEPS) korišćenjem PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/(lecitin/propilen-glikol) (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) samoemulgujućeg sistema kao disperznog medijuma. Km odnos 3:2 je ispitan i SC/O odnos 8:2 je uzet za dalja istraživanja. Fotonska korelaciona spektroskopija je pokazala sposobnost supernatanta SEPS da nakon razblaženja sa vodom formira kapi prečnika koji odgovara emulzijama. Dijatomitne mikrokapsule, koje predstavljaju fosilizovane skelete fotosintetičkih algi za kompleksnom trodimenzionalnom (3D) strukturom, porozne strukture, koje se sastoje od amorfne silika materijala i koje se dobijaju prečišćavanjem dijatomejske zemlje, su korišćene kao adsorbensi za SEPS prilikom formulisanja SSEPS. Različiti čvrsti uzorci SSEPS su pripremljeni korišćenjem dve metode: adsorpcija disperzije CBZ u SEDDS na dijatomitne mikrokapsule blagim mešanjem u tarioniku sa pistilom (Metoda A); disperzijom dijatomitnih mikrokapsula u etanolnom rastvoru CBZ i SEDDS, nakon čega je etanol uparen (Metoda B). Brzina rastvaranja CBZ iz izrađenih SSEPS formulacija je bila znatno veća u poređenju sa čistim CBZ, ali i fizičkom smešom i odgovarajućom čvrstom disperzijom dobijenom uparavanjem etanolnog rastvora CBZ iz disperzije dijatomitnih mikrokapsula. Brzina rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacije pripremljene metodom B je veća u poređenju sa brzinom rastvaranja CBZ iz SSEPS pripremljene metodom A. Razlog za ovo je verovatno parcijalna adsorpcija SSEPS

formulacije pripremljene metodom *B* unutar pora diјatomitnih mikrokapsula. U toku studija stabilnosti, pod uslovima ubrzane studije, (40°C i 70% RH), u toku 10 nedelja, nisu primećene značajne promene u kristaličnosti CBZ kao ni u njegovoj brzini rastvaranja kod SSEPS formulacija, za razliku od čvrste disperzije, kod koje je uočen značajan porast kristaličnosti. Ovo implicira, da nakon adsorbovanja tečne SEPS, diјatomitne mikrokapsule mogu da održe inicijalne karakteristike. **Samoemulgujuće pelete** su izrađene oblaganjem šećernih peleta, veličine 710 - 825 μm, tečnom SEPS formulacijom, korišćenjem komore sa fluidizirajućim protokom vazduha, i etanol/voda (odnos 9/1) disperznog medijuma. Optimizovana je količina koloidnog silicijum-dioksida kao sredstva protiv lepljenja kao i hidroksipropilmetilceluloze, kao sredstva za vezivaje. Prilikom karakterizacije samoemulgujućih peleta nađeno je da je CBZ prisutan na površini peleta i to najvećim delom u P – monokliničkom obliku. Brzina rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta je znatno veća u odnosu na brzinu rastvaranja čistog CBZ. Veća brzina rastvaranja se može objasniti prisustvom SEDDS koja je bogata surfaktantima kao i velikoj površini lako rastvorljivih šećernih peleta. **Dinamički in vitro test lipolize SSMEDDS** formulacija je vršen korišćenjem pankreatina svinjskog porekla uz kontinuirano dodavanje jona kalcijuma. Nađeno je da je brzina lipolize značajno veća kod SSMEDDS formulacija sa poroznim adsorbensima na bazi silicijum-dioksida nego kod formulacija sa adsorbensima na bazi magnezijum-aluminometasilikat. Takođe, brzina lipolize kod SSMEDDS formulacija sa magnezijum-aluminometasilikat zavisi od specifične aktivne površine adsorbensa, pri čemu veće vrednosti dovode do manje brzine lipolize. Sve formulacije su pokazale mali porast količine CBZ u fazi pelete (1 – 7 %) tokom trajanja testa ukazujući da lipoliza ne utiče značajno na kapacitet solubilizacije formulacija za CBZ. Količina CBZ u fazi pelete takođe zavisi i od tipa adsorbensa, pri čemu adsorbensi na bazi magnezijum-aluminometasilikata pokazuju niže vrednosti porasta CBZ u fazi pelete. Takođe, veći SMEDDS/adsorbens odnos dovodi do smanjenja količine CBZ u fazi pelete.

*Ključne reči: čvrsti samomikroemulgujući sistem, čvrsta samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija, samoemulgujuće pelete, magnezijum-aluminometasilikat, porozni silicijum-dioksid, diјatomitne mikrokapsule, povećanje brzine rastvaranja, dinamička in vitro lipoliza, karbamazepin*

**UDK broj:** 615.453.2:[001.891.53:615.011(043.3)  
615.1.213:615.453(043.3)

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

## Summary

The purpose of this study was to investigate different solid self-dispersing formulations as potential drug delivery system for poorly soluble carbamazepine (CBZ). Solid self-microemulsifying drug delivery system (SSMEDDS), solid self-emulsifying phospholipid suspension (SSEPS) and self-emulsifying pellet formulations were investigated. **Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)** was formulated using the surfactant polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (S), the cosurfactant PEG-40 hydrogenated castor oil (C) and the oil caprylic/capric triglycerides (O). Four different adsorbents with high specific surface area were used: Neusilin<sup>®</sup> UFL2, Neusilin<sup>®</sup> FL2 (magnesium aluminometasilicate), Sylysia<sup>®</sup> 320 and Sylysia<sup>®</sup> 350 (porous silica). Microemulsion area at the surfactant to co-surfactant ratio (Km) 1:1 was evaluated and for further investigation SMEDDS with SC/O ratio 8:2 was selected. Solubilization capacity of selected SMEDDS for CBZ was  $33771 \pm 41 \mu\text{g/ml}$ . Rheological measurements of unloaded and CBZ-loaded SMEDDS system at water content varied from 10 to 60 % (w/w) were conducted. It has been found that CBZ has great influence on rheological behaviour of investigated system upon water dilution. Photon correlation spectroscopy has shown ability of CBZ-loaded SMEDDS system to produce microemulsion droplet size. SSMEDDS improved release rate of CBZ, but type of adsorbent significantly affects release rate of CBZ. For SSMEDDS with different magnesium aluminometasilicate adsorbents, release rate of CBZ decreased with increasing specific surface area due to entrapment of liquid SMEDDS inside the pores and its gradual exposure to dissolution medium. With porous silica adsorbents no difference in release rate was found in comparison to physical mixtures. In physical mixtures presence of amorphous CBZ led to high dissolution rate. **Self-emulsifying phospholipid suspension (SEPS)** was formulated using caprylocaproyl macrogol-8 glycerides (S)/ (lecithin/ propylene glycol) (Cs)/ caprylic/capric triglyceride (O) self-emulsifying system. Km 3:2 was evaluated and for further investigation SEDDS with SCs/O ratio 8:2 was selected. Photon correlation spectroscopy has shown ability of SEPS supernatant to produce emulsion droplet size Diatoms, which represent fossilized skeletons of photosynthetic algae with complex 3 – dimensional (3D), porous structure consisting of amorphous silica, obtained by purification of diatomaceous earth, was used as solid carrier. Different solid samples of CBZ suspension in SEDDS, called solid self – emulsifying phospholipid suspension (SSEPS), were prepared using two methods: adsorption of CBZ dispersion in SEDDS by gentle mixing with diatoms in mortar with pestle (Method A) or dispersion of diatoms in ethanol solution of CBZ and SEDDS components, followed by ethanol evaporation (Method B). Release rate of CBZ from SSEPS was significantly higher in comparison to pure drug, physical mixture of diatoms and CBZ as well as solid dispersion of pure CBZ and diatoms obtained by ethanol evaporation. The dissolution of CBZ from SSEPS sample prepared using method B was faster than from the sample prepared by the method A. Higher dissolution for sample prepared by the method B can be attributed to the partial adsorption (deeper localization) of liquid material inside the pores of diatoms. Upon storage of the samples under accelerated conditions (40°C and 70% RH) for 10 weeks no significant changes in CBZ crystallinity and dissolution was in case of SSEPS, contrary to solid dispersion with increased crystallinity, indicating that diatoms with adsorbed liquid CBZ – loaded SEPS can maintain initial CBZ characteristics. **Self-emulsifying pellets** were formulated by layering SEPS formulation on the surface of sugar pellets, 710- 825  $\mu\text{m}$  i size, using fluid-bed coater and ethanol/water 9/1 dispersion medium. Optimized amounts of



colloidal silica (anti-tacky agent) as well as hydroxypropylmethylcellulose (as binder) were used. During characterization of self-emulsifying pellets it was found that CBZ is mostly present in P-monoclinic form. Dissolution of CBZ from self-emulsifying pellets was faster in comparison to pure CBZ. Higher dissolution rate can be attributed to presence of SEDDS system, rich with surfactants, as well as high surface area of water soluble sugar beads. **Dynamic *in vitro* lipolysis** of solid self-microemulsifying formulations was conducted using porcine pancreatin as lipase source and continuous addition of calcium ion. It was found that rate of lipolysis depends from type of adsorbent leading that silica based adsorbents generated higher lipolysis rate in comparison to magnesium-aluminometasilicate adsorbents. Also, rate of lipolysis in SSMEDDS formulations with magnesium-aluminometasilicate adsorbents depends from specific surface area where higher values led to slower lipolysis rate. All formulations have show slight increase (1 – 7%) in CBZ content in pellet phase during the lipolysis indicating that there is no significant effect of lipolysis on solubilization capacity of formulations. Amount of CBZ present in pellet phase also depended from type of adsorbent where magnesium-aluminometasilicate adsorbents show slightly lower CBZ amount. Also amount of CBZ in pellet phase depended from SMEDDS/adsorbent ratio where higher ratio led to lower CBZ content in pellet phase.

*Keywords: Solid self- microemulsifying drug delivery systems, solid self - emulsifying phospholipid suspension, self-emulsifying pellet, magnesium aluminometasilicate, porous silica, diatom, dissolution rate improvement, dynamic in vitro lipolysis, lecithin carbamazepine.*

**UDK number:** 615.453.2:[001.891.53:615.011(043.3)  
615.1.213:615.453(043.3)

**Field of research:** Pharmacy

**Specific field of research:** Pharmaceutical technology

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>OPŠTI DEO</b> .....	4
<b>1. Lipidne formulacije za oralnu primenu</b> .....	5
<b>2. Lipidni ekscipijensi</b> .....	12
<b>3. Studije faznog ponašanja</b> .....	18
<b>4. Čvrsti samodispergujući sistemi (eng. Solid Self(Micro)Emulsifying Drug Delivery Systems) – SS(M)EDDS</b> .....	21
<b>5. Savremeni porozni adsorbensi</b> .....	24
<b>6. In vitro model lipolize</b> .....	35
<b>7. Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina</b> .....	41
<b>8. Tehnike karakterizacije čvrstih samodispergujućih sistema</b> .....	43
<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	45
<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	47
<b>9. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTOG SAMOMIKRO-EMULGUJUĆEG SISTEMA</b> .....	48
<b>9.1. Materijali i metode</b> .....	48
<b>9.1.1. Materijali</b> .....	48
<b>9.1.2. Metode</b> .....	48
9.1.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti karbamazepina .....	48
9.1.2.2. Priprema SMEDDS - Konstrukcija pseudoternernog faznog dijagrama .....	49
9.1.2.3. Odabir SMEDDS za dalja ispitivanja .....	50
9.1.2.4. Reološka karakterizacija SMEDDS formulacije .....	50

9.1.2.5. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije .....	52
9.1.2.6. Priprema čvrstog SMEDDS sistema (SSMEDDS) .....	52
9.1.2.7. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije .....	53
9.1.2.8. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom .....	54
9.1.2.9. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina (CBZ) iz SSMEDDS formulacija.....	54
<b>9.2. Rezultati i diskusija .....</b>	<b>55</b>
9.2.1. Fazno ponašanje pseudoternernog sistema i odabir SMEDDS formulacije .....	55
9.2.2. Rastvorljivost CBZ .....	57
9.2.3. Reološka karakterizacija SMEDDS formulacije .....	57
9.2.4. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije .....	63
9.2.5. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom .....	66
9.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje brzina rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS formulacija .....	72

## **10. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTE**

### **SAMOEMULGUJUĆE FOSFOLIPIDNE SUSPENZIJE (SSEPS) .....**

#### **10.1. Materijali i metode .....**

##### **10.1.1. Materijali .....**

##### **10.1.2. Metode .....**

10.1.2.1. Priprema tečne samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SEPS) .....	76
10.1.2.2. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije .....	77
10.1.2.3. Optička mikroskopija SEPS formulacije .....	77
10.1.2.4. Priprema čvrste SEPS (SSEPS) formulacije .....	78
10.1.2.5. Karakterizacija SSEPS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije .....	80
10.1.2.6. Karakterizacija SSEPS formulacija primenom difrakcije X-zraka .....	80
10.1.2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje brzina rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacija.....	80
10.1.2.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija SSEPS .....	81
10.1.2.9. Ubrzana studija stabilnosti SSEPS formulacija .....	81
<b>10.2. Rezultati i diskusija</b> .....	<b>82</b>
10.2.1. Odabir odgovarajuće samoemulgujuće formulacije kao disperznog medijuma za SEPS.....	82
10.2.2. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi SEPS primenom fotonske korelacione spektroskopije .....	85
10.2.3. Određivanje veličine čestica karbamazepina u tečnoj SEPS pomoću optičke mikroskopije .....	88
10.2.4. Karakterizacija čvrste samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SSEPS) primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, difrakcije X-zraka i skenirajuće elektronske mikroskopije .....	89
10.2.5 <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacija .....	95
10.2.6 – Rezultati ubrzane studije stabilnosti SSEPS formulacija .....	97

## **11. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA SAMOEMULGUJUĆIH PELETA 101**

### **11.1. Materijali i metode ..... 101**

#### **11.1.1. Materijali ..... 101**

#### **11.1.2. Metode ..... 101**

##### 11.1.2.1. Izrada samoemulgujućih peleta karbamazepina ..... 101

##### 11.1.2.2. Optička mikroskopija samoemulgujućih peleta ..... 104

##### 11.1.2.3. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije ..... 104

##### 11.1.2.4. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije ..... 105

##### 11.1.2.5. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom difrakcije X - zraka ..... 105

##### 11.1.2.6. *In vitro* ispitivanje brzina rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta ..... 105

### **11.2. Rezultati i diskusija ..... 106**

#### 11.2.1. Oblaganje samoemulgujućih peleta ..... 106

#### 11.2.2. Optička mikroskopija samoemulgujućih peleta ..... 107

#### 11.2.3. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije (PCS) ..... 109

#### 11.2.4. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i difrakcije X - zraka (XRD) .. 112

#### 11.2.5. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta ..... 115

## **12. IN VITRO DINAMIČKA LIPOLIZA ČVRSTIH**

### **SAMOMIKROEMULGUJUĆIH SISTEMA (SSMEDDS)**

<b>ZA ORALNU PRIMENU</b> .....	117
<b>12.1. Materijali i metode</b> .....	117
12.1.1. Materijali .....	117
12.1.2. Metode .....	118
12.1.2.1. Dinamički <i>in vitro</i> model lipolize .....	118
12.1.2.2. Stepen lipolize i određivanje sadržaja CBZ iz čvrstih SSMEDDS u toku <i>in vitro</i> dinamičke lipolize .....	120
<b>12.2. Rezultati i diskusija</b> .....	121
<b>ZAKLUČAK</b> .....	132
<b>LITERATURA</b> .....	139
<b>BIOGRAFIJA</b> .....	156
<b>PRILOZI</b> .....	157
<b>Prilog A – Karakteristike surfaktanata koji se koriste prilikom izrade samodispergujućih formulacija</b> .....	157
1. PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi .....	157
2. PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje .....	159
3. Polisorbat – 80 .....	161
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorata .....	164
Izjava o autorstvu .....	165
Izjava o korišćenju .....	166

# UVOD

Tokom poslednje dve decenije intenzivno se istražuje razvoj lipidnih formulacija sa lipofilnim lekovitim supstancama, pri čemu su se istraživanja uglavnom fokusirala na izradu različitih samoemulgujućih (*eng.* Self-emulsifying drug delivery system - SEDDS) i samomikroemulgujućih (*eng.* Self-microemulsifying drug delivery system - SMEDDS) sistema koji se objedinjeno mogu zvati samodispergujući sistemi (Kuentz, 2012). Najnovija istraživanja ispituju podobnost samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (*eng.* Self-emulsifying phospholipid suspension - SEPS), novog člana grupe samodispergujućih sistema, kao nosača teško rastvorljivih lekovitim supstanci (Shanmugam i sar., 2011). Lipidne formulacije za oralnu (peroralnu) primenu se uobičajeno pripremaju kao tečni preparati. Međutim, brojne prednosti čvrstih farmaceutskih oblika kao što su niska cena proizvodnje, lakoća procesne kontrole, dobra reproducibilnost i mnoge druge, dovele su do usmeravanja razvoja lipidnih formulacija ka čvrstim lipidnim sistemima, posebno čvrstim samodispergujućim sistemima. Ovi terapijski sistemi potencijalno mogu da poseduju sve prednosti lipidnih formulacija kao i prednosti savremenih poroznih adsorbenasa, na koje se lipidne formulacije adsorbuju i koji vrlo često imaju sinergistički efekat na brzinu rastvaranja lekovite supstance. Takođe, čvrste lipidne formulacije se određenim farmaceutsko-tehnološkim operacijama lako mogu prevesti u različite farmaceutske oblike kao što su tablete, kapsule, pelete punjene u tvrde kapsule i drugi (Uchida i sar., 2012; Kallakunta i sar., 2012).

Razvoj čvrstih samodispergujućih formulacija, u cilju poboljšanja efikasnosti postojećih lekovitim supstanci, predstavlja jedan od novijih pristupa farmaceutske tehnologije. Oko 70 – 80 % postojećih i oko 40 % novosintetisanih lekovitim supstanci predstavljaju teško rastvorljiva jedinjenja (Lipinski, 2002; Palmer, 2003). Shodno LADMER sistemu, kako bi se lekovita supstanca nakon peroralne primene resorbovala, mora se predhodno osloboditi iz sistema i rastvoriti u GI tečnosti (Ritschel, 1992). Iz tog razloga veliki istraživački naponi se ulažu u cilju poboljšanja brzine i rastvorljivost teško rastvorljivih lekovitim

supstanci, prilikom čega čvrsti samodispergujući sistemi predstavljaju perspektivne nosače pomoću kojih se potencijalno može postići poboljšanje biološke raspoloživosti teško rastvorljivih jedinjenja (Gursoy i Benita, 2004). Prilikom razvoja novih formulacija, cilj je da se dobiju sistemi sa optimalnom distribucijom lekovite supstance, dobrim liberacionim profilom, što dužim rokom trajanja i sa niskim toksičnim potencijalom. Pošto u sastav čvrstih samodispergujućih sistema ulaze surfaktantna faza (surfaktant i/ili kosurfaktant), uljana faza, lekovita supstanca koja može biti rastvorena i/ili dispergovana u smeši ove dve faze i adsorbens, koji obično predstavlja prašak odgovarajućih fizičko-hemijskih karakteristika, i obzirom da je neophodno koristiti visoke koncentracije PAM, pitanje biološke prihvatljivosti i ekonomičnosti ovih sistema je od velikog značaja. Iz tog razloga noviji pristup prilikom razvoja čvrstih samodispergujućih sistema jeste upotreba niskih koncentracija nejonskih PAM, koje predstavljaju relativno bezbedne tenzide sa malim iritabilnim potencijalom kao i prirodnih adsorbenasa odgovarajućih fizičko-hemijskih karakteristika, čija je proizvodnja znatno jeftinija u odnosu na sintetske nosače sličnih karakteristika (Melo i sar., 1999).

Zbog kompleksnog sastava čvrstih samodispergujućih sistema vrlo je teško predvideti ponašanje sistema nakon peroralne primene. Različita struktura i sadržaj surfaktanta, kosurfaktanta i ulja, različiti odnos tečnog samodispergujućeg sistema sa nosačem kao i fizičko-hemijske osobine samog nosača mogu dovesti do veoma različitih rezultata u pogledu brzine i obima oslobađanja lekovite supstance. Takođe usled amfifilne strukture mnogih aktivnih komponenti, i udeo lekovite supstance može imati znatni efekat na sopstvenu brzinu rastvaranja kod samodispergujućih formulacija (Pouton, 1997; Tang i sar., 2008). Iz tog razloga korišćenjem uobičajenog postupka ispitivanja brzine rastvaranja, često se ne može adekvatno i tačno predvideti ponašanje ispitivanih samodispergujućih formulacija *in vivo*. Postoji velika zainteresovanost istraživača za razvoj biorelevantnih medijuma kao i različitih statičkih ili dinamičkih modela lipolize u cilju preciznijeg predviđanja ponašanja samodispergujućih formulacija *in vivo* (Sasseine i sar., 2010; Wagner i sar., 2012).

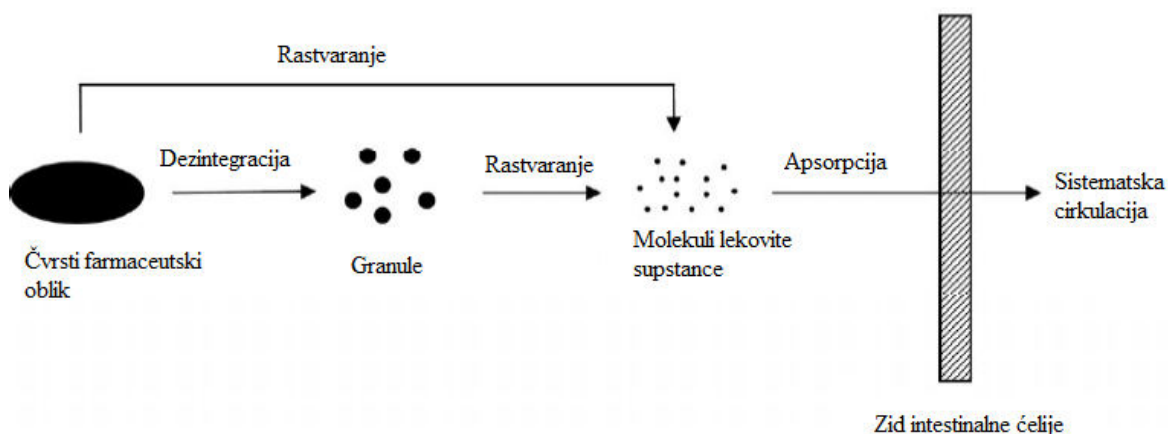


Brojne studije su potvrdile da čvrste samodispergujuće formulacije mogu znatno da poboljšaju oslobađanje i rastvaranje teško rastvorljivih lekovitih supstanci nakon peroralne primene. Međutim, pošto su razvijene i sintetisane brojne PAM, rastvarači i ulja različitih osobina, nije moguće davati opšte zaključke u pogledu izbora vrste i koncentracije tenzida i uljane faze, već je neophodno ispitati svaki sistem ponaosob. Odabir odgovarajućeg adsorbensa je takođe od velikog značaja usled uticaja nosača na fizičku stabilnost lekovite supstance (precipitacija na površini adsorbensa, polimorfni prelaz i drugi vidovi interakcija), prilikom čega može doći do promene brzine rastvaranja (Nazzal i Khan, 2006; Kallakunta i sar., 2012). Samim tim brzina rastvaranja lekovite supstance iz čvrstog samodispergujućeg sistema se može znatno razlikovati u zavisnosti od korišćenih ekscipijenasa, a može u velikoj meri zavisiti od fizičko-hemijskih karakteristika same lekovite supstance (Agarwal i sar., 2009).

# **OPŠTI DEO**

## 1. Lipidne formulacije za oralnu primenu

Resorpcija lekovite supstance nakon oralne (peroralne) primene zavisi pre svega od njene rastvorljivosti i permeabilnosti. U cilju postizanja zadovoljavajuće efikasnosti terapije peroralnom primenom lekovitog oblika, lekovita supstanca mora prvo da se rastvori u gastrointestinalnim tečnostima i nakon toga da permeira kroz zid intestinuma (Slika 1.1) (Aulton, 2002).



Slika 1.1 - Shematski prikaz oslobađanja i rastvaranja lekovite supstance iz čvrstog farmaceutskog oblika za peroralnu primenu neophodnih za resorpciju iz GIT – a u sistemsku cirkulaciju

Karakteristike lekovitih supstanci koje imaju najveći uticaj na apsorpciju nakon peroralne primene (rastvorljivost i permeabilnost) su poslužile za njihovu klasifikaciju 1995. godine uvođenjem Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BSK)<sup>1</sup> u kome su sve lekovite supstance klasifikovane prema njihovoj rastvorljivosti u vodi i permeabilnosti kroz intestinalnu membranu (Amidon i sar., 1995; Ritschel, 1992). BSK klasifikacija se

<sup>1</sup> Biofarmaceutski Sistem Klasifikacije (BSK) – predstavlja sistem klasifikacije lekovitih supstanci na osnovu njihove rastvorljivosti i permeabilnosti. Prema FDA smernicama predstavlja validan vodič za predviđanje intestinalne resorpcije lekovite supstance. Osnove ovog sistema klasifikacije je postavio Gordon Amidon za šta je avgusta 2006 godine na FIP – ovom (*eng.* International Pharmaceutical Federation) kongresu održanom u Salvadoru, Brazil, dobio nagradu za istaknuti naučni rad (*eng.* Distinguished Science Award).

široko koristi prilikom evaluacije razvoja različitih farmaceutskih preparata u farmaceutskoj industriji kao i razvoja brojnih zahteva regulativnih tela (*CDER/FDA, U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, 2000*; *EMA, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010*). Uzimajući u obzir da oko 70 – 80 % postojećih lekovitih supstanci predstavlja teško rastvorljiva jedinjenja (Porter i sar., 2008), sve učestalije se javlja problem nepredvidive, neregularne i nepotpune resorpcije aktivne komponente čvrstog farmaceutskog oblika. Problem sa biološkom raspoloživošću se može prevazići poboljšanjem intestinalne permeabilnosti kao i rastvorljivosti lekovite supstance.

Lekovita supstanca permeira kroz intestinum, trancelularnim putem, ili pak između ćelija, paracelularnim putem (Hämäläinen i Frostell-Karlsson, 2004). Permeacija trancelularnim putem najvećim delom zavisi od lipofilnih karakteristika molekula i upravo iz tog razloga se tim karakteristikama pridaje veliki značaj prilikom optimizacije faze razvoja nove lekovite supstance (Kerns i Di, 2003). Najveći deo farmaceutskih istraživanja, u cilju poboljšanja biološke raspoloživosti, se fokusira na postizanje bolje rastvorljivosti lekovite supstance i iz tog razloga prve kandidate prilikom odabira lekovite model supstance predstavljaju jedinjenja iz BSK grupe 2 (niska rastvorljivost; visoka permeabilnost) (Fahr i Liu, 2007).

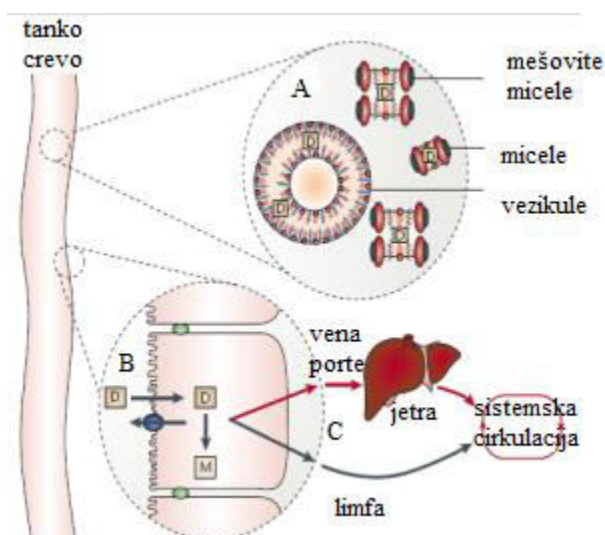
Uobičajeni pristupi u cilju poboljšanja brzine rastvaranja teško rastvorljivih supstanci u vodi su redukcija veličine čestica i formiranje lako rastvorljivih soli. Međutim, u određenim slučajevima ovi pristupi ne daju zadovoljavajuće rezultate u poboljšanju bioraspoloživosti. Postoje praktična ograničenja u smanjenju veličine čestica koje se može postići konvencionalnim metodama. Takođe za formiranje soli mora postojati jedna slabo kisela ili slabo bazna farmakofora, što često nije slučaj. Ako se odgovarajuća so i formira može se pokazati kao neefikasna u poboljšanju bioraspoloživosti zbog pH posredovane precipitacije u GIT-u nakon inicijalnog rastvaranja. Poboljšanje bioraspoloživosti, u tim

slučajevima, može se postići upotrebom lipidnih ekscipijena, i formulisanjem lipidnih formulacija, mada ove formulacije mogu pokazati određena ograničenja.

Uprkos svemu upotreba prirodnih i/ili sintetskih lipida radi poboljšanja biološke raspoloživosti lipofilnih, u vodi teško rastvorljivih lekovitih supstanci, pokazuje porast poslednjih godina. Smatra se da lipidi poboljšavaju biološku raspoloživost teško rastvorljivih supstanci tako što se njihovom upotrebom prevazilaze ograničenja, nastala zbog spore i nekompletne solubilizacije leka u organizmu, na taj način što podstiču stvaranje micela unutar intestinuma koje sadrže teško rastvorljivu supstancu. Ubrzavanje stvaranja micela nije toliko posledica direktnog delovanja lipida, koji ulaze u sastav formulacije, koliko proizvoda njihovog varenja (Pouton, 2000; 2006). Poboljšanju biološke raspoloživosti doprinosi i to što visoko lipofilne lekovite supstance, koje ulaze u sastav micela i resorbuju se od strane intestinuma, ulaze u sastav hilomikrona, koji se formiraju u enterocitima, i tako odlaze u sistem limfnih sudova zaobilazeći portalni krvotok i efekat prvog prolaza kroz jetru (Porter i Charman, 2001). Takođe novija istraživanja pokazuju da određeni lipidni ekscipijenci polioksietilovanog tipa poboljšavaju biološku raspoloživost inhibicijom P glikoproteina, proizvoda MDR1 gena, koji predstavlja glavni proteinski nosač, odgovoran za efluks ksenobiotika (Hugger i sar., 2002).

Sumarno gledano mehanizmi kojima lipidni ekscipijensi povećavaju resorpciju su:

- Solubilizacija leka u intestinalnoj tečnosti (Slika 1.2 A),
- Izmena transportnih mehanizama u enterocitima (Slika 1.2 B),
- Izmena puta leka u sistemsku cirkulaciju (portalni krvotok vs. limfni sudovi) (Slika 1.2 C).



Slika 1.2 - Shematski prikaz osnovnih mehanizama poboljšanja resorpcije lekovite supstance korišćenjem lipidnih ekscipijenasa (Porter i sar., 2007)

Lipidni sistemi za peroralnu primenu obuhvataju veliki broj različitih tipova formulacija, od jednostavnih uljanih rastvora pa sve do kompleksnih smeša ulja, surfaktanta, kosurfaktanta i korastvarača. Novije formulacije iz ove grupe predstavljaju tipične samodispergujuće sisteme koji se uobičajeno nazivaju samoemulgujući, SEDDS (*eng.* Self Emulsifying Drug Delivery Systems) ili samomikroemulgujući, SMEDDS (*eng.* Self Micro-Emulsifying Drug Delivery Systems) sistemi (Pouton, 2006). Od skora uveden je novi tip samodispergujućeg sistema, samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije, SEPS (*eng.* Self Emulsifying Phospholipid Suspensions) u kome je lekovita supstanca dispergovana, a ne rastvorena u samodispergujućem matriksu (Shanmugam, 2011). U cilju boljeg definisanja i eventualne kategorizacije različitih lipidnih formulacija koje su od značaja za istraživanja na polju savremenih nosača lekovitih supstanci, uveden je sistem klasifikacije lipidnih formulacija (Tabela 1.1) (Pouton, 2000, 2006).

**Tabela 1.1 – Sistem klasifikacije lipidnih formulacija (Pouton, 2000; 2006)**

Pomoćne materije u formulaciji	Sastav formulacije (% m/m)				
	Tip I	Tip II	Tip IIIA	Tip IIIB	Tip IV
Ulje: trigliceridi ili mešani mono i digliceridi	100	40–80	40–80	< 20	–
Surfaktanti sa HLB* < 12	–	20–60	–	–	0–20
Surfaktanti sa HLB* > 12	–	–	20–40	20–50	30–80
Hidrofilni korastvarači (npr. PEG, propilenglikol, dietilenglikol-monoetiletar)	–	–	0–40	20–50	0–50

\* HLB – Hidrofilno-lipofilni balans

Lipidne formulacije tipa I predstavljaju rastvore lekovite supstance u određenim uljima, dok lipidne formulacije tipa II sadrže dodatno i surfaktant niske HLB vrednosti. Međutim najviše se istražuju lipidne formulacije tipa III što je dovelo do komercijalizacije nekoliko proizvoda ovog tipa kao što su: *Neoral*<sup>®</sup> (ciklosporin) i *Sandoimmune*<sup>®</sup> (ciklosporin) (Novartis Pharmaceuticals UK Ltd, Frimley, Camberley, Velika Britanija), *Gengraf*<sup>®</sup> (ciklosporin), *Kaletra*<sup>®</sup> (lopinavir i ritonavir) i *Norvir*<sup>®</sup> (ritonavir) (Abbott Laboratories, Illinois, SAD), *Rapamune*<sup>®</sup> (sirolimus) (Wyeth-Ayerst, parent Pfizer, Njujork, SAD), *Aptivus*<sup>®</sup> (tipranavir) (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Nemačka) i drugi (Strickley, 2007). Ipak iz razloga što lipidne formulacije tipa III mogu da sadrže 3-5 različitih ekscipijenasu, uključujući surfaktante i visoke i niske HLB vrednosti, ove formulacije mogu da poseduju različite karakteristike. Stoga je ovaj tip lipidnih formulacija dodatno podeljen na tip IIIA i IIIB, prilikom čega lipidne formulacije tipa IIIA sadrže značajan udeo ulja dok su lipidne formulacije tipa IIIB predominantno rastvorljive u vodi i sadrže manji udeo uljane faze (Tabela 1.1). Takođe lipidne formulacije tipa IIIB pokazuju veću incidencu precipitacije lekovite supstance nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi u odnosu na lipidne formulacije tipa IIIA, što ukazuje da ove formulacije imaju značajan uticaj na fizičko stanje lekovite supstance u intestinumu, što može negativno uticati na brzinu resorpcije. Lipidne

formulacije tipa IV, uvedene u system klasifikacije lipidnih formulacija 2006 godine, sadrže samo surfaktante u svom sastavu i predstavljaju tzv surfaktantne sisteme (Pouton, 2006). Nekoliko proizvoda tipa surfaktnatnog sistema se nalazi već na tržištu: *Agenerase*<sup>®</sup> (Amprenavir) sa D-alfa-tokoferil-PEG-1000-sukcinatom (skr. TPGS) (GlaxoSmithKline, Brentford, London, Velika Britanija), *Ketas*<sup>®</sup> (Ibudilast) sa Cremophor<sup>®</sup> – om RH 60 (Kyorin Pharmaceutical, Tokio, Japan), *Infree*<sup>®</sup> (Indometacin) sa Cremophor<sup>®</sup> – om RH 60 (Eisai Co, Tokio, Japan), *Fenogal*<sup>®</sup> (Fenofibrat) sa Gelucir<sup>®</sup> - om 44/14 (Genus, London, UK) i drugi (Strickley, 2007).

Disperzije lipidnih sistema u vodi se mogu klasifikovati u tri velike kategorije (Razdan i Devarajan, 2003):

- Micelarni rastvor,
- Mikroemulzije,
- Konvencionalne emulzije odnosno makroemulzije.

Samodispergujuće formulacije koje nakon dispergovanja u medijumu formiraju stabilne, transparentne, homogene, niskoviskozne i termodinamički stabilne koloidne sisteme, mikroemulzije, veličine prečnika kapi manje od 50 nm su SMEDDS tipa (Gursoy i Benita, 2004). Međutim prema radu Schott – a, mikroemulzije poseduju kapi veličine prečnika od 10 – 100 nm (Schott, 2000). Formulacije SEDDS tipa nakon dispergovanja u medijumu formiraju belo obojene, termodinamički nestabilne sisteme. Generalno kod ovih formulacija, nakon dispergovanja, veličina formiranih kapi je veća nego kod formulacija SMEDDS tipa. Opšte karakteristike SEDDS i SMEDDS sistema predstavljene su u Tabeli 1.2. Micelarni rastvori poseduju micide veličine od 2-5 nm i najčešće se formiraju dispergovanjem surfaktantnih sistema. Prilikom formulisanja samodispergujućih sistema veličina prečnika kapi nakon dispergovanja ne treba da bude ograničavajući faktor iz razloga što mala veličina prečnika kapi ne ukazuje uvek na bržu resorpciju, niti na bolju solubilizaciju teško rastvorljive lekovite supstance (Schott, 2000).



**Tabela 1.2 - Opšte karakteristike SEDDS i SMEDDS sistema nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi (Patel i sar., 2007)**

<p style="text-align: center;"><b>SEDDS</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>SMEDDS</b></p> 
<p>nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi formira emulzije koje se sastoje od kapi jedne faze dispergovane u drugoj</p>	<p>nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi formira mikroemulzioni sistem</p>
<p>nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi veličina kapi je preko 200 nm</p>	<p>nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi veličina kapi je od 10 – 100 nm</p>
<p>nastale emulzije su bele boje zbog toga što je prečnik formiranih kapi veći od talasne dužine svetlosti i poseduju više vrednosti indeksa refrakcije u odnosu na vodu</p>	<p>nastale mikroemulzije su transparentne i prozirne, prečnik kapi je manji od ¼ talasne dužine svetlosti i u odnosu na vodu vrlo malo skreću ravan polarizovane svetlosti (vrednost indeksa refrakcije je jako slična vrednosti indeksa refrakcije vode)</p>
<p>formirane emulzije poseduju kapi kao pojedinačne entitete sve dok se ne desi koalescencija (Ostvaldovo spajanje) sitnijih kapi u unutrašnje faze u krupnije</p>	<p>„kapi“ mikroemulzije u deliću sekunde mogu da se raspadnu na jednom mestu u sistemu i da se formiraju na drugom</p>
<p>formirane emulzije su liofobne</p>	<p>formirane mikroemulzije su na granici između liofobnih i liofilnih koloida</p>
<p>zahtevaju intenzivniju agitaciju za formiranje emulzije</p>	<p>mikroemulzija se formira blagim mešanjem sa spoljašnjom fazom</p>
<p>međupovršinski napon <math>\sim 10^{-2} - 10^{-3}</math> mN/m</p>	<p><math>\sim 1 - 50</math> mN/m</p>
<p>stabilnost nakon dispergovanja – Termodinamički nestabilni sistemi, faze teže da se razdvoje kako bi se postigao minimum slobodne energije</p>	<p>Termodinamički stabilni sistemi, ukoliko ne dolazi do promene u sastavu, temperaturi ili pritisku potencijalno poseduju neograničeno vreme trajanja</p>
<p>međupovršina <math>\sim 200</math> m<sup>2</sup>/g</p>	<p><math>\sim 15</math> m<sup>2</sup>/g</p>

Proces samodispergovanja još uvek nije dovoljno istražen. Smatra se da se proces samodispergovanja dešava onda kada je promena entropije sistema veća nego energija koja je neophodna za povećanje površine unutrašnje faze (Reiss, 1975). Slobodna energija konvencionalne emulzije predstavlja direktnu funkciju energije neophodne za formiranje nove površine između uljane i vodene faze. Ove dve faze vremenom teže da se razvoje sa ciljem smanjenja dodirne površine i posledično slobodne energije sistema. Dodatkom surfaktanta, koji formira međupovršinski film, smanjuje se međupovršinski napon i samim tim slobodna energija sistema, formiranjem barijere koja sprečava koalescenciju uljanih kapi u U/V sistemu. Kod SEDDS i SMEDDS sistema emulgovanje se dešava spontano, jer slobodna energija koja je neophodna da bi se formirala emulzija, odnosno mikroemulzija, je niska i pozitivna ili čak negativna (Constantinides, 1995). Međupovršinska struktura ne sme da pokazuje otpor ka smicanju površine kako bi se formirala emulzija (Dabros i sar., 1999). Lakoća samoemulgovanja se dovodi u korelaciju sa lakoćom penetracije vode u fazu tečnih kristala ili gel fazu formiranu na površini uljanih kapi (Rang i Miller, 1999; Wakerly i sar., 1986). Dodatkom samodispergujuće formulacije spoljašnjoj fazi dolazi do formiranja međupovršinskog filma na površini uljanih kapi. Penetracija vode kroz međupovršinski film dovodi do solubilizacije vode u uljanoj fazi koja se dešava dok se ne postigne određeni limit. Daljom penetracijom vode kroz međupovršinski film dolazi do formiranja dispergovane faze tečnih kristala. Na kraju procesa sve što je u neposrednoj blizini međupovršine predstavlja tečni kristal. Udeo faze tečnog kristala zavisi od vrste i koncentracije surfaktanta. Formiranjem faze tečnih kristala na površini kapi one postaju otpornije na koalescenciju (Rang i Miller, 1999).

## **2. Ekscipijensi koji ulaze u sastav lipidnih formulacija**

Lipidne formulacije predstavljaju veliki broj različitih sistema u čiji sastav ulaze brojni ekscipijensi različitih karakteristika: surfaktanti, kosurfaktanti, korastavarači, različita ulja kao i čvrsti lipidi. Najčešće korišćeni ekscipijensi prilikom formulisanja samodispergujućih sistema su predstavljeni u Tabeli 2.1.

**Tabela 2.1 - Najčešće korišćeni ekscipijensi prilikom formulisanja samodispergujućih sistema (Strickley, 2007)**

<b>Ekscipijensi nerastvorljivi u vodi</b>	<b>Triacilgliceroli</b>	<b>Surfaktanti</b>
Pčelinji vosak	<i>Dugolančani triacilgliceroli</i>	Gliceril-monooleat
Oleinska kiselina	Kukuruzno ulje	PEG-35 ricinusovo ulje (Cremophor® EL)
Masne kiseline soje	Maslinovo ulje	PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor® RH40)
d- $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E)	kikirikijevo ulje	PEG-60 hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor® RH60)
mono-di-triacilgliceroli ulja kukuruza	Susamovo ulje	Polisorbat 20 (Tween® 20)
Srednjelančani (C <sub>8</sub> – C <sub>10</sub> ) mono-di-acilgliceroli	Repičino ulje	Polisorbat 80 (Tween® 80)
Estri propilen-glikola i masnih kiselina	Sojino ulje	d- $\alpha$ -tokoferil-polietilenglikol-1000 sukcinat (TPGS)
	Hidrogenizovano sojino ulje	sorbitan-monolaurat (Span 20)
	Ostala hidrogenizovana biljna ulja	PEG-300 gliceridi oleinske kiseline (Labrafil® M-1944 CS)
	<i>Srednjelančani triacilgliceroli</i>	PEG-300 gliceridi linoleinske kiseline (Labrafil® M-2125CS)
	trigliceridi srednje dužine lanca dobijeni iz kokosovog ulja ili ulja palminog semena	PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (Labrasol®)
		PEG-1500 digliceridi laurinske kiseline (Gelucire® 44/14)

Na konačan odabir lipidnih ekscipijenasa koji će ući u sastav lipidne formulacije može uticati više faktora. Osnovni faktor odabira je bezbednost primene ekscipijensa. Surfaktanti

nerastvorljivi u vodi teže da penetriraju i fluidiziraju biološke membrane, dok surfaktanti rastvorljivi u vodi poseduju mogućnost solubilizacije komponenti membrane. Iz tog razloga svi surfaktanti, nezavisno od tipa, poseduju mogućnost iritacije i posledične niske tolerancije, pa je od značaja dobro razmotriti ne samo vrstu surfaktanta, već i njegov udeo u konačnoj formulaciji (Attwood i Florence, 1983). Prilikom formulacije lipidnih sistema najviše se koriste nejonski surfaktanti tipa polisorbata ili polioksietilovana jestiva ulja koja imaju bolji bezbedonosni profil u odnosu na jednolančane surfaktante. Takođe nejonski surfaktanti tipa estra imaju bolji bezbedonosni profil u odnosu na nejonske surfaktante tipa etra koji su pritom i nesvarljivi. Na tržištu postoji veliki broj nejonskih surfaktanata (Strickley, 2007). Većina nejonskih surfaktanata poseduje peroralnu  $LD_{50}^2$  vrednost od 50 g/kg tako da se 1 g surfaktanta u formulaciji namenjenoj za jednokratnu peroralnu primenu dobro podnosi (Attwood i Florence, 1983). Za lipidne formulacije namenjene za lečenje hroničnih poremećaja izbegava se upotreba nejonskih surfaktanata zbog nedostatka podataka o njihovoj toksičnosti nakon peroralne primene u toku dužeg vremenskog perioda (Strickley, 2007). Prilikom odabira adekvatnog surfaktanta za samodispergujuću formulaciju često se koriste ispitane supstance koje su već prisutni u nekom od komercijalnih proizvoda. Pogodan izvor informacija predstavlja baza podataka *US FDA Center for Drug Evaluation and Research "Inactive Ingredients Database"*, koji navodi masu i koncentraciju komponenata korišćenih u komercijalnim proizvodima.

Drugi važan faktor koji treba razmotriti je kompleksnost hemijskog sastava lipidnih ekscipijenas. Ukoliko se prilikom formulisanja lipidnog sistema koriste različita biljna ulja, moraju se uzeti u obzir eventualne razlike između lipidnih ekscipijenas koje postoje kod različitih proizvodnih serija. Pritom su razlike izraženije ukoliko su biljna ulja hemijski derivatizovana procesom hidrolize ili esterifikacije. Nejonski surfaktanti, koji su najčešće estri polietilen-oksida ili poliglicerola sa komponentama različitih biljnih ulja, predstavljaju smeše različitih hemijskih entiteta u različitim odnosima. Međutim, jedinstven hemijski naziv koji im se pridodaje, predstavlja njihov prosečni sastav zbog

---

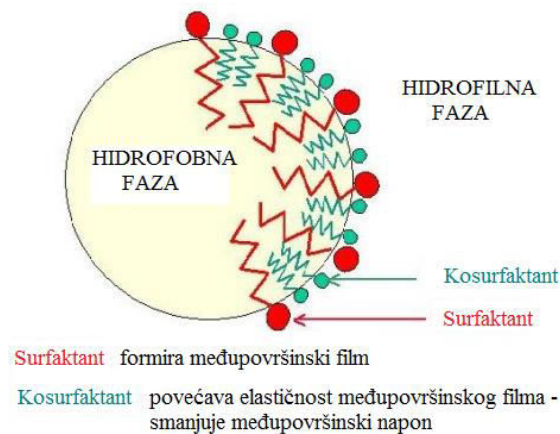
<sup>2</sup>  $LD_{50}$  (eng. Lethal Dose, 50 %) – Doza ispitivanog jedinjenja dovoljna da izazove smrt kod 50 % ispitivanih subjekata.

čega nejonski surfaktanti koji poseduju isti hemijski naziv mogu posedovati drugačiji odnos komponenti u svom sastavu, a potencijalno i različite hemijske entitete (Meyer i sar., 2002). Lipidna formulacija koja poseduje ove ekscipijense mora biti robustna, kako se eventualne razlike između proizvodnih serija ne bi drastično odrazile na karakteristike finalnog proizvoda. Lipidni ekscipijensi moraju biti visoko prečišćeni, sa niskim sadržajem peroksida, aldehida, metala i drugih nečistoća koje mogu posedovati potencijalni negativni uticaj na stabilnost lekovite supstance.

Prilikom formulacije samodispergujućeg sistema sa lipofilnim lekovitim supstancama, najbitnija komponenta svakako je uljana, ne samo zato što ova komponenta može da rastvori visoku količinu lipofilne lekovite supstance i ubrza proces dispergovanja, već što sastav i priroda triacilglicerola uljane faze u velikoj meri utiče na udeo leka koji će se nakon intestinalne resorpcije naći u sistemske cirkulaciji putem limfatičnog sistema (Gershanik i Benita, 2000; Lindmark i sar., 1995; Charman i sar., 1991; Holm i sar., 2002). Najčešće se koriste triacilgliceroli dugačke i srednje dužine lanaca. Iako predstavljaju logičan izbor, jestiva ulja se retko koriste prilikom formulisanja samodispergujućih sistema, zato što često poseduju nizak stepen solubilizacije lipofilnih lekovitih supstanci. Međutim, za razliku od njih, hemijski modifikovana prirodna ulja se široko koriste zbog boljih samodispergujućih osobina i većeg stepena solubilizacije lipofilnih lekovitih supstanci (Constantinides, 1995; Kimura i sar., 1994). Polusintetski derivati srednjelančanih triacilglicerola koji istovremeno poseduju i amfifilne karakteristike se takođe sve više koriste prilikom formulisanja samodispergujućih sistema. Nakon intestinalne resorpcije lipofilne komponente se transportuju do sistemske cirkulacije putem limfe, kao sastojak lipidnog jezgra formiranih hilomikrona (Pocock i Vost, 1974). Peroralna primena lipida stimuliše formiranje hilomikrona prilikom čega lipidi sa masnim kiselinama dugog lanca ( $C_{12}$  i duže) intenzivnije stimulišu formiranje hilomikrona i posledično limfatični transport lipofilne lekovite supstance (Caliph i sar., 2000). Žučne soli, monogliceridi, holesterol, lecitin i lizolecitin dodatno potpomažu emulgovanje lipida u intestinumu formirajući sitne kapi. Proces varenja ovih kapi se dešava pod dejstvom pankreasne lipaze (Craig, 1993; Charman, 1992) nakon čega ove kapi postepeno prelaze u

mešovite micelle sa žučnim solima. Nakon penetracije kroz sloj mucina, ove mešovite micelle se resorbuju pinocitozom, difuzijom ili endocitozom (Georgakopoulos i sar., 1992).

Prilikom formulisanja samodispergujućih sistema najčešće se koriste surfaktanti sa visokom HLB (eng. *Hydrophilic-Lipophilic Balance* – Hidrofilni-lipofilni balans) vrednošću. HLB vrednost predstavlja odnos hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu PAM i ne uzima u obzir njegove interakcije sa uljem i vodom (Griffin, 1949). Surfaktanti sa visokom HLB vrednošću brže formiraju U/V kapi, nakon kontakta sa vodenim medijumom, i poseduju visoku sposobnost samoemulgovanja, koja se karakteriše brzim širenjem sistema kroz vodenu fazu. Takođe, prilikom odabira surfaktanta koji ulazi u sastav samodispergujuće formulacije potencijalna toksičnost predstavlja bitan faktor. Prednost imaju surfaktanti prirodnog porekla (Constantinides, 1995; Holm i sar., 2002; Hauss i sar., 1998), međutim ova jedinjenja često poseduju nizak stepen solubilizacije lipofilne lekovite supstance. Kako bi se postigla efikasna resorpcija, neophodno je da se spreči precipitacija lekovite supstance u GI lumenu održavajući je u solubilizovanom obliku na mestu resorpcije (Shah i sar., 1994). Vrlo često u sastav samodispergujuće formulacije, pored surfaktanta, ulazi i tzv kosurfaktant koji takođe poseduje amfifilne karakteristike. Kosurfaktant povećava elastičnost međupovršinskog na granici između faza koji formira surfaktant i smanjuje međupovršinski napon dovodeći do smanjenja prečnika kapi i povećanja solubilizacije za lekovitu supstancu u odnosu na čist surfaktant (Patel i sar., 2007; Biradar i sar., 2009; Parmar i sar., 2011) (Slika 2.1). Efekat kosurfaktanta je najizraženiji kad je odnos surfaktant/kosurfaktant ( $K_m$ ) optimalan.



Slika 2.1 - Shematski prikaz efekta kosurfaktanta na elastičnost međupovršinskog filma  
(Patel i sar., 2007)

Više koncentracije surfaktanta u samodispergujućoj formulaciji ne dovode uvek do smanjenja veličine formiranih kapi, već mogu dovesti čak i do povećanja (Kommuru i sar., 2001; Craig i sar., 1995). Povećanje veličine kapi se dešava usled povećanja penetracije vode i posledičnog narušavanja međupovršinskog filma, što dovodi do izbacivanja uljanih kapi u spoljašnju vodenu fazu (Pouton, 1997).

Pored kosurfaktanta u sastav samodispergujućih sistema mogu ući i različiti korastvarači. Prisustvo korastvarača u samodispergujućoj formulaciji omogućava rastvaranje velikih količina hidrofилnog surfaktanta i/ili lekovite supstance u odgovarajućem lipidu. Najčešće se koriste organski rastvarači kao što su etanol, propilen-glikol ili različiti makrogoli (polietileglikoli, skr. PEG) pogodni za peroralnu primenu. Ipak prilikom formulacije samodispergujućeg sistema koji sadrži određeni udeo korastvarača treba razmotriti činjenicu da alkoholi i drugi isparljivi korastarači mogu da ispare iz formulacije kroz i/ili u zidove meke ili tvrde želatinske kapsule što može dovesti do precipitacije lekovite supstance. Iz tog razloga teži se formiranju samodispergujućih formulacija bez alkohola (*eng. Alcohol free*) (Constantinides, 1995).

### 3. Studije faznog ponašanja

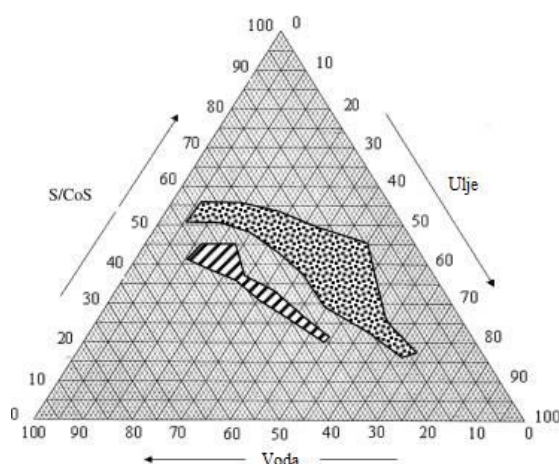
Opšti zaključak je da izbor surfaktanta, kosurfaktanta, korastvarača i uljane faze koji ulaze u sastav samodispergujuće formulacije predstavlja izuzetno složen zadatak, budući da su osobine sastojaka od presudnog značaja za mikrostrukturu i stabilnost formulacije kao i njen potencijal kao nosača lekovite supstance. Izuzetna složenost fizičko-hemijskih interakcija otežava eventualno koncipiranje opštih smernica za odabir odgovarajućeg ekscipijensa. Isti ekscipijensi pomešani u različitim odnosima mogu da pokažu znatno drugačije fazno ponašanje. Iz tog razloga bitno je da odnos komponenti samodispergujućeg sistema bude optimalan. Koji tip faznog ponašanja pokazuje ispitivana samodispergujuća formulacija, prilikom razblaživanja sa spoljašnjom vodenom fazom, utvrđuje se studijama faznog ponašanja (Alany i sar., 2009). U studijama faznog ponašanja identifikuju se različite termodinamički ravnotežne faze u funkciji molarnih, zapreminskih ili težinskih frakcija sastojaka, na određenoj temperaturi. Ove studije, iako poseduju empirijski karakter, su neophodne za sagledavanje i razumevanje značaja i uticaja određenog sastojka formulacije. Temelje opšteg pristupa u proučavanju faznog ponašanja postavili su Shinoda i saradnici (LJ. Đekić, Doktorska disertacija; Shinoda i Kunieda, 1973).

Usled kompleksnosti sastava fazno ponašanje surfaktant/kosurfaktant/ulje samodispergujućih sistema je izuzetno složeno i na njega utiče veliki broj faktora. U toku istraživanja neophodno je uzeti u obzir da su komercijalno dostupni surfaktanti zapravo smeše srodnih jedinjenja sa različitom dužinom hidrofobnog lanca i različitim stepenom polimerizacije u hidrofilnom delu što dodatno doprinosi raznovrsnosti faznog ponašanja samodispergujućeg sistema, prilikom postepenog razblaženja sa vodom i otežanosti donošenja konkretnih zaključaka o eventualnom uticaju pojedinog sastojka formulacije. Fazno ponašanje mešavine dve PAM je znatno kompleksnije u odnosu na fazno ponašanje pojedinačne PAM, jer se površinska aktivnost smeše tenzida znatno razlikuje u odnosu na površinsku aktivnost pojedinačnog surfaktanta (Arai i Shinoda, 1967). Ipak samodispergujuće formulacije u kojima postoje dve različite PAM su česte, pri čemu se jedna označava kao *primarni surfaktant* ili *surfaktant*, a druga *sekundarni surfaktant* ili *kosurfaktant*. Odnos surfaktanta i kosurfaktanta ( $K_m$ ) mora da bude optimalan. Prilikom



karakterizacije određene samodispergujuće formulacije u prvi plan se stavljaju odnos surfaktanta i kosurfaktanta, koji zajedno predstavljaju surfaktantnu fazu, i odnos uljane i surfaktantne faze.

Radi grafičkog predstavljanja faznog ponašanja samodispergujuće formulacije koriste se različiti tipovi faznog dijagrama: faznog trougla, faznog tetraedra ili fazne prizme, u čijoj osnovi je Gibbs – ov jednakostraničan trougao. Ipak najšire se koristi dijagram faznog trougla (Slika 3.1).



Slika 3.1 - Shematski prikaz faznog ponašanja samodispergujućeg sistema korišćenjem pseudo-faznog trougla

Stranice trougla predstavljaju nezavisno promenljive parametar, najčešće koncentraciju. Svaka tačka unutar dijagrama predstavlja rezultat rezultujuće termodinamičke ravnotežne faze na određenoj temperaturi. Iako temperatura može imati značajan uticaj na fazno ponašanje sistema, uobičajeno je da se ona ispituje u uskom opsegu vrednosti ili na konstantnoj temperaturi koja je relativna za namenjeni način primene sistema. Opseg koncentracija sastojaka u okviru kojih se formiraju različite termodinamički ravnotežne faze (*oblasti faza*) je specifičan za svaki sistem, pa se fazni dijagrami smatraju „*fingerprint*“ – otiskom prsta datog sistema. Ipak ispitivanje faznog ponašanja kompleksnog samodispergujućeg sistema je jako dugotrajan i naporan posao. Iz tog razloga se često prilikom ispitivanja faznog ponašanja određenog sistema koristi fazni

dijagram tipa trougla, u kome su dve komponente, u određenom fiksnom odnosu, predstavljene kao jedna komponenta (tzv *pseudo-komponenta*). Shodno tome takav fazni dijagram se naziva *pseudo-dijagram* (Lj. Đekić, Doktorska disertacija 2011; Kahlweit, 1999; Schelly, 1997). Najčešće je pseudo-komponenta smeša surfaktanta i kosurfaktanta, mada može biti i smeša ulja i kosurfaktanta (*Ekwall-Gillberg-ov pristup*). Ovim pristupom se može povećati broj ispitivanih promenjivih sa tri na šest i više (Friberg i Aikens, 2009).

Konstrukcija faznih dijagrama, odnosno fazno mapiranje, obuhvata eksperimentalno određivanje položaja i veličine oblasti različitih faza u faznom dijagramu (Lj. Đekić, Doktorska disertacija 2011). Pomenuto fazno mapiranje vrši se titracionom metodom ili metodom uzorka. Prvi eksperimentalni pristup obuhvata detektovanje transformacija, odnosno faznih prelaza, jedne faze u drugu tokom sukcesivnog dodavanja malih porcija (5 – 10 % u svakom koraku) jedne komponente ili pseudo-komponente smeši ostalih sastojaka. Kod drugog eksperimentalnog pristupa priprema se kolekcija uzoraka različitog sastava (50 – 100 uzoraka po faznom dijagramu) i identifikuje termodinamički ravnotežna faza u svakom uzorku. Za ovaj pristup potrebne su velike količine ekscipijena. Homogene transparentne termodinamički ravnotežne faze, kao što su micelle, mikroemuzije i tečni kristali, se vizuelno razlikuju od dvofaznih, trofaznih sistema i emulzija. Uobičajen način diferenciranja mikroemulzione faze od faze tečnih kristala je na osnovu reoloških karakteristika, pri čemu mikroemuzije pokazuju niži viskozitet u odnosu na fazu tečnih kristala (Lj. Đekić, Doktorska disertacija 2011; Alany i sar., 2009).

U cilju prevazilaženja manuelne pripreme velikog broja uzoraka, kao i smanjenja troškova razvoja formulacije pogodnog samodispergujućeg sistema, razvijeni su softverski pristupi na bazi neuronskih mreža (Đekić i sar., 2008), kao i pristupi na osnovu eksperimentalnog dizajna i hemometrije (Jeirani i sar., 2012) u cilju tačnog predviđanja granica fazne oblasti od interesa na osnovu lako dostupnih ulaznih parametara kao što su: koncentracija surfaktanta, koncentracija ulja,  $K_m$  vrednost i drugi. Određivanje faznih oblasti je još više otežano kod sistema kod kojih se sporo uspostavlja termodinamička ravnoteža (npr. nakon nekoliko sati), gde vrlo često dolazi do greške usled zamene stabilnog stanja sistema sa metastabilnim prelaznim stanjem. Kod ovih sistema pogodnija

je metoda pripreme uzoraka u odnosu na titracionu metodu zbog brze i lako ponovljive pripreme uzorka. Vreme neophodno za uspostavljanje termodinamičke ravnoteže se može skratiti mešanjem ili primenom ultrazvuka (Kahlweit, 1999).

#### **4. Čvrsti samodispergujući sistemi (*eng. Solid Self(Micro)Emulsifying Drug Delivery Systems – SS(M)EDDS*)**

Samodispergujuće formulacije se uobičajeno formulišu kao tečni farmaceutki oblici. Međutim, tečni farmaceutski oblici poseduju određene nedostatke, posebno ukoliko se koriste tečni lipidni ekscipijensi, kao što su: visoki troškovi proizvodnje, niska stabilnost, otežan i zahtevan transport i relativno nizak stepen reproducibilnosti i dr. (Tang i sar., 2008). Takođe u tečnim lipidnim sistemima može doći do ireverzibilne precipitacije lekovite supstance (Prajapati i Patel, 2007).

Značajan problem u samodispergujućim formulacijama predstavlja i visok sadržaj surfaktanata (30 – 60 %), koji može dovesti do GI iritacije prilikom kontinuirane peroralne primene. Alternativu, u cilju prevazilaženja i/ili smanjenja predhodno pomenutih nedostataka, predstavljaju čvrsti samodispergujući sistemi. Ovi sistemi se formulišu tako što se tečni samodispergujući sistem adsorbuje na čvrst nosač ili se prevede u čvrsto stanje korišćenjem drugih tehnika (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1 - Tehnike prevođenja tečnih samodispergujućih formulacija u čvrste (Tang i sar., 2008)**

<i>Metode topljenja</i>	<i>Metode u kojima se koristi rastvarač</i>	<i>Druge metode</i>
Brzim hlađenjem otopljenog materijala	Sušenje raspršivanjem	Istovremeno usitnjavanje
Ekstruzija topljenjem	Sušenje smrzavanjem	Direktna adsorpcija na čvrste nosače
Granulacija topljenjem	Metoda superkritičnih fluida	Elektrostatička metoda upređanja
Zamrzavanje/hlađenje raspršivanjem	Sušenje raspršivanjem u hladnom vazduhu	
Metoda kapanja	Oblaganje u komori sa fluidizirajućim vazduhom	
Direktno punjenje u kapsule	Precipitacija na adsorbensu pomoću evaporacije	

Primenom farmaceutsko-tehnoloških operacija ovi sistemi se mogu prevesti u konačan farmaceutski oblik tipa tableta (Attama i sar., 2003; Nazzal i sar., 2006), peleta (Abdalla i Mader, 2007; Franceschinis i sar., 2005) i drugih. Samim tim SS(M)EDDS sistemi objedinjuju prednosti samodispergujućih sistema (povećana rastvorljivost i resorpcija lekovite supstance) sa prednostima čvrstih farmaceutskih oblika kao što su: niski troškovi proizvodnje, visoka stabilnost i dobra reproducibilnost, laka procesna kontrola, bolja komplijansa od strane pacijenta-korisnika i drugi.

Najčešće korišćene tehnike dobijanja SS(M)EDDS sistema su: direktno punjenje u kapsule, sušenje raspršivanjem, adsorbovanje na čvrste nosače, granulacija topljenjem i ekstruzija topljenjem (Tang i sar., 2008).

Prednosti punjenja samodispergujućih sistema u kapsule su: lakoća proizvodnje i lako doziranje jednostavnom promenom volumena punjenja. Punjenje polučvrste samodispergujuće formulacije u kapsule se vrši u četiri koraka: zagrevanje smeše lipidnih ekscipijenasu 20°C iznad temperature topljenja, rastvaranje ili suspendovanje lekovite

supstance u otopini (npr. mešanjem), punjenje kapsula sa otopinom i naknadno hlađenje na sobnoj temperaturi. Ukoliko je samodispergujuća formulacija tečna, proces punjenja kapsula je dvostepen i uključuje punjenje i zaptivanje kapsula bilo dodatnom zaštitom na spoju dva dela tvrde želatinske kapsule ili mikrosprej zaptivanjem (oblaganje kapsula zaštitnim omotačem korišćenjem mikrospreja) (Jannin i sar., 2008). Prilikom odabira lipidnih ekscipijenasa neophodno je uzeti u obzir njihovu kompatibilnost sa omotačem kapsule. Listu kompatibilnih tečnih i polučvrstih lipidnih ekscipijenasa sa omotačem tvrdih kapsula navede Cole i saradnici (Cole i sar., 2008).

Sušenje raspršivanjem uključuje: pripremu uzorka mešanjem lipidnih ekscipijenasa, lekovite supstance i čvrstog nosača, raspršivanje smeše u komori za sušenje, isparavanje lako isparljivih sastojaka (npr. organski rastvarač) pod kontrolisanim uslovima temperature i protoka vazduha. Dobijeni prašak se kasnije može tabletirati ili puniti u kapsule.

Korišćenjem novijih sintetskih i prirodnih adsorbenasa, sa posebnim fizičko-hemijskim karakteristikama (specifična površina, porozitet, hemijska obrada površine i druge.) kao nosača tečne samodispergujuće formulacije otvara se veliki broj mogućnosti poboljšanja i modifikovanja oslobađanja lekovite supstance i konačnog efekta terapijskog sistema. Adsorbovanje tečne samodispergujuće formulacije na određeni adsorbens predstavlja jednostavan postupak koji uključuje mešanje ove dve komponente korišćenjem različitih tehnika mešanja. Prednost ove metode je dobra uniformnost sadržaja i visoki stepen adsorbovanja, čak i 70 % (m/m) (Ito i sar., 2005).

Granulacija topljenjem predstavlja proces u kome se granulacija određenog praška postiže dodatkom sredstva za vezivanje koje omekšava ili se topi na relativno niskoj temperaturi. Prednosti ove tehnike su jednostepeni postupak i izbegavanje upotrebe rastvarača. Glavni parametri koji se kontrolišu su: brzina mešanja, vreme mešanja, veličina čestica sredstva za vezivanje i viskozitet otopljenog sredstva za vezivanje. Veliki broj lipidnih ekscipijenasa može da se koristi kao sredsivo za vezivanje prilikom granulacije topljenjem. Najčešće se koriste lipidi iz grupe Gelucire<sup>®</sup>, prvenstveno zbog svoje

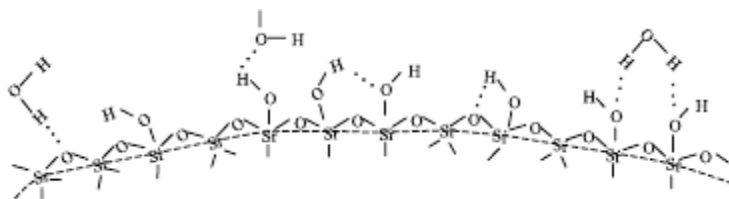
samodispergujuće sposobnosti (Seo i sar., 2003). Ostali ekscipijensi, koji se koriste kao sredstva za vezivanje prilikom granulacije topljenjem su lecitin, parcijalni gliceridi, polisorbati, dok se kao adsorbensi najčešće koriste različiti materijali na bazi silicijum-dioksida ili magnezijum-aluminometasilikata (Gupta i sar., 2001; 2002).

Ekstruzija topljenjem predstavlja tehniku u kojoj se ne koriste rastvarači, a potencijalno mogu da se dobiju sistemi sa visokim sadržajem lekovite supstance (do 60 % m/m) (Jannin i sar., 2008). Ekstruzija predstavlja proces prevođenja polaznih materijala sa plastičnim osobinama u proizvod uniformnog oblika i gustine, propuštanjem materijala kroz cev određenog promera pod kontrolisanim uslovima temperature i potisnog pritiska (Verreck i Brewster, 2004). Ova tehnika se vrlo često kombinuje sa procesom sferonizacije pri kome se ekstrudovani materijal prevodi u uniformne sferoide (pelete).

## **5. Savremeni porozni adsorbensi**

Upotreba adsorbenasa različitih fizičko-hemijskih karakteristika u cilju poboljšanja, kontrolisanja i modifikovanja brzine rastvaranja lekovite supstance je sve šira. Dugogodišnja istraživanja na polju novih savremenih adsorbenasa, sa prihvatljivim biološkim, toksikološkim i mehanističkim karakteristikama, dovela su do razvoja velikog broja prirodnih, ali i sintetskih adsorbenasa sa potencijalnom primenom u farmaceutskoj praksi. Pomenuti materijali kao što su na primer amorfnj silicijum-dioksid, magnezijum-aluminometasilikat, kalcijum-difosfat i drugi, mogu da se znatno razlikuju između sebe po fizičkim karakteristikama. Date karakteristike su: porozna ili neporozna struktura, specifična površina, veličina, volumen i oblik pora kao i mogućnost funkcionalizacije površine. Različite karakteristike otvaraju mogućnosti potencijalne kontrole količine adsorbovane lekovite supstance i brzine oslobađanja, prilikom čega se generalno više koriste porozni materijali u odnosu na neporozne, zbog šire mogućnosti modifikacije fizičkih karakteristika poroznih materijala kao potencijalnih adsorbenasa lekovite supstance. Najčešće se formulišu i ispituju različite čvrste disperzije lekovite supstance i poroznog adsorbensa ili pak, u novije vreme, čvrste lipidne formulacije, adsorpcijom

lipidnog sistema na površinu adsorbensa. Adsorbovani molekuli lekovite supstance mogu potencijalno da reaguju sa slobodnim grupama na površini adsorbensa čime se može značajno uticati na stepen i brzinu oslobađanja lekovite supstance (Slika 5.1) (Pan, 2002).



Slika 5.1 - Potencijalne interakcije tipa vodoničnih veza na površini čestica adsorbensa između slobodnih SiOH grupa adsorbensa i -OH grupa lekovite supstance (Pan, 2002)

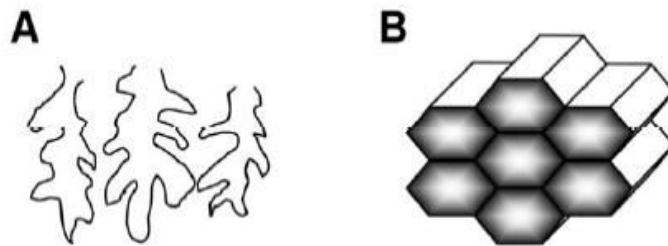
Postoje dva osnovna tipa poroznih nosača: prirodni i sintetski. Prirodni porozni nosači se dobijaju prečišćavanjem uzoraka iz prirode koji sadrže određeni udeo karakterističnog nosača od standardnih nečistoća kao što su glina, vulkansko staklo, organske materije, šljunak, voda i druge. Prednosti prirodnih nosača u odnosu na sintetske su jeftina proizvodnja, koja uključuje samo proces prečišćavanja, i izostanak upotrebe toksičnih pomoćnih supstanci (npr. organski rastvarači) (Melo i sar., 1999).

Sintetski porozni materijali se generalno proizvode koristeći dva principa: princip „odozgo na dole“, prilikom koga se polazni materijal usitnjava u sitnije frakcije pomoću različitih tehnika, najčešće mlevenjem i princip „odozdo na gore“ koji podrazumeva građenje kompleksnih struktura polazeći od molekula (rastvor lekovite supstance) (Shegokar i Müller, 2010).

Primer proizvodnje poroznih nosača korišćenjem principa „odozgo na dole“ su porozni silika materijali (Psi) (Anglin i sar., 2008). Ovi materijali se uobičajeno proizvode koristeći elektrohemijsku anodizaciju. U ovoj metodi ploča od silicijuma predstavlja anodu u sistemu i uronjena je u rastvor fluorovodonične kiseline (HF) zajedno sa pločom od platine, koja služi kao katoda. Stvaranje pora se dešava delovanjem struje. Karakteristike pora u velikoj meri zavise od radnih uslova, kao što su sastav elektrolita i gustina

primenjene struje (Salonen i sar., 2000), koji se mogu modifikovati kako bi dobili konačan proizvod željenih karakteristika. Ostale metode koje se mogu koristiti su fotosinteza, gde se u proizvodnji Psi koristi vidljiva svetlost zajedno sa rastvorom fluorovodonične kiseline (Noguchi i Suemune, 1993), metoda čvrstog plamena, gde Psi se proizvodi tako što silicijum-dioksid ( $\text{SiO}_2$ ) reaguje sa magnezijumom (Mg) u komori za sagorevanje nakon čega se proizvod tretira sa kiselinom (Won i sar., 2009), kao i metoda usitnjavanjem korišćenjem kugličnog mlina u kombinaciji sa metodom presovanja i sinterovanja (Jakubowicz i sar., 2007).

Primer proizvodnje poroznih nosača koristeći se principom „odozdo na gore“ su porozni silika materijali ( $\text{PSiO}_2$ ). U zavisnosti od vrste polaznih komponenti kao i procesnih parametara konačan proizvod može biti ili silika gel, koji poseduje neuređenu poroznu strukturu, ili materijal sa uređenim poroznom strukturom (Slika 5.2).



Slika 5.2 - Shematski prikaz neuređenog (A) i uređenog (B) poroznog sistema (Kresge i sar., 1992; Lehmann i sar., 2000).

Silika gel se najčešće formira procesom polimerizacije alkoksidnih prekursora kao što je na primer tetraetoksisilan. U vodenoj sredini alkoksidi podležu hidrolizi koju prati kondenzacija formiranjem  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$  veze. Na taj način se formira silika mreža. Proces sinteze počinje polimerizacijom monomer, čime se formiraju primarne čestice. U skladu sa principima Ostvaldovog sazrevanja manje čestice se rastvaraju i njihovi molekuli se vezuju za površinu većih čestica. Posledično ove čestice počinju da rastu i u jednom trenutku počinju da se vezuju između sebe formirajući trodimenzionalnu 3D mrežu. Brzina rasta čestica kao i broj veza koje se formiraju između čestica zavisi od pH medijuma i molarnog odnosa korišćenih alkoksida i vode (Hench i West, 1990). Prilikom proizvodnje materijala



sa uređenom poroznom strukturom koristi se drugačija metoda u kojoj senmolekuli SiO<sub>2</sub> uređuju u uređenu mrežu koja pritom poseduje amorfnu strukturu. Jedan od najviše ispitivanih uređenih poroznih materijala kao nosača lekovitih supstanci jeste MCM – 41 (*eng.* Mobil Composition of Matter) iz grupe M41S materijala (Vallet-Regi i sar., 2004) (Tabela 5.1). Prilikom proizvodnje MCM – 41, jonski surfaktant alkiltrimetilamonijum se koristi da omogući sintezu heksagonalne silika mreže, prilikom čega se veličina pora može modifikovati promenom veličine alkil lanca. Takođe dodatak amfifilnih blok kopolimera deluje na smer sinteze utičući na prostornu orijentaciju molekula. SBA – 15 (Tabela 5.1) predstavlja prvi heksagonalni materijal koji je sintetisan korišćenjem polimera. Veličina pora se može modifikovati variranjem temperature, količine korastvarača ili pak vremena sinteze. Maksimalna veličina pore koja se može postići korišćenjem polimera je veća u odnosu na veličinu pora koja se može postići korišćenjem površinskih aktivnih materija relativno male veličine molekula (Zhao i sar., 1998).

**Tabela 5.1 - Karakteristike sintetskih mezoporoznih adsorbenasa (Taguchi i Schuth, 2005)**

<i>Mezoporozni adsorbens</i>	<i>Prostorno uređenje</i>	<i>Dijametar pore (nm)</i>	<i>Struktura</i>
MCM ( <u>M</u> obil <u>C</u> omposition of <u>M</u> atter)-41	P6mm	2–5	Heksagonalni 1D kanal
MCM-48	Ia3d	2–5	Bikontinualna 3D
SBA ( <u>S</u> anta <u>B</u> arbara <u>A</u> dsorbent)-15	P6mm	5–10	Heksagonalni 1D kanal
SBA-16	Im3m	min 1–6; max 4–9	Unutrašnje centrirana rešetka
SBA-1	Pm3n	2–4	Kubna 3D
SBA-3	P6mm	2–4	2D heksagonalna
MSU ( <u>M</u> ichigan <u>S</u> tate <u>U</u> niversity)	P6mm	2–5	2D heksagonalna
HMS ( <u>H</u> ollow <u>M</u> esoporous <u>S</u> spheres)	P6mm	2–5	Heksagonalna

Količina i udeo određenog tipa pora u česticama adsorbensa, kao i njihov dijametar i morfologija su odgovorni za njegove jedinstvene karakteristike kao nosača lekovite

supstance. Postoji četiri tipa pora. „Otvorena“ pora je u kontaktu sa spoljašnjom površinom čestice adsorbensa dok „zatvorena“ pora nije. Samim tim „zatvorena“ pora je izolovana i ne učestvuje u procesu adsorpcije. „Transportna“ pora povezuje spoljašnju površinu čestice adsorbensa sa poroznim strukturama unutar čestice adsorbensa. Pore koje su u kontaktu sa „transportnim“ porama, ali se dalje ne povezuju sa poroznim sistemom, se nazivaju „slepe“ pore (Ahuja i Pathak, 2009). Na osnovu veličine pora porozni adsorbensi se mogu podeliti na mikro-, mezo-, i makroporozne sisteme (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2 - Podela poroznih adsorbenasa (Ahuja i Pathak, 2009)**

<b>Naziv sistema</b>	<b>Veličina pora (nm)</b>
Mikroporozni sistem	<i>do 2</i>
Mezoporozni sistem	<i>2 – 50</i>
Makroporozni sistem	<i>50 – 2-3x10<sup>6</sup></i>

Mikroporozni sistem se dalje može podeliti na ultramikroporozni sistem, semimikroporozni i supermikroporozni sistem. Ultramikroporozni sistem poseduje veličinu pora manju od 0,5 nm. Dijametar pore se može uporediti sa dijametrom molekula leka koji je adsorbovan. Semimikroporozan sistem poseduje veličinu pora od 0,5 do 1,4 nm. Adsorpcija lekovite supstance na i u pore mikroporoznog sistema se dešava relativno brzo, u prvim minutima procesa adsorpcije. Pri veličini pora od 1,4 do 2 nm, kod supermikroporoznog sistema, adsorpcija prvog sloja leka dovodi do smanjenja dijametara pore, prilikom čega se poboljšava njen adsorpcioni potencijal i posledično ubrzava punjenje pora. Adsorpcija u mezoporoznim sistemima se odvija stvaranjem višeslojnog filma od adsorbovanog materijala unutar pora sistema (Ahuja i Pathak, 2009). Godine 1990 prvi put su sintetisani uređeni mezoporozni silikati. Ovi materijali zbog velike veličine pora, dobro uređene strukture i velike specifične površine se široko koriste u procesima separacije, katalitičkim procesima kao i u senzornim uređajima (Taguchi i Schuth, 2005). Stabina mezoporozna struktura kao i dobro definisane karakteristike adsorptivne površine čine mezoporozne silikate idealnim kandidatima za nosače lekovitih supstanci, proteina i drugih biogenih molekula. Rađena su brojna istraživanja i razvijeni su

brojni tipovi mezoporoznih materijala koji se međusobno razlikuju po poroznoj strukturi, mogućnosti postizanja modifikovanog oslobađanja lekovite supstance kao i oslobađanja lekovite supstance dejstvom stimulansa (Tabela 5.1).

Noviji sintetski, amorfni porozni nosači koji strukturno predstavljaju magnezijum-aluminometasilikat, poznatiji pod komercijalnim nazivom *Neusilin*<sup>®3</sup>, kao i silicijum-dioksid, poznatiji pod komercijalnim nazivom *Sylsilia*<sup>®4</sup> od skora predstavljaju predmet brojnih istraživanja kao potencijalni nosači prilikom formulisanja čvrstih SEDDS i SMEDDS sistema (Agarwal i sar., 2009; Agarwal i sar., 2013; Beg i sar., 2013; Bhagwat i D'Souza, 2012; Hentzschel i sar., 2012; Ito i sar., 2006; Kallakunta i sar., 2012; Kanuganti i sar., 2012; Khansil i Bajpai, 2013; Sander i Holm, 2009). *Neusilin*<sup>®</sup> predstavlja multifunkcionalni ekscipijens koji se može koristiti za poboljšanje tehnoloških karakteristika tableta, praškova, granula i kapsula. Prilikom adsorpcije lekovite supstance na različite *Neusilin*<sup>®</sup> nosače korišćenjem različitih disperznih medijuma pokazano je stvaranje vodoničnih veza između silanolnih grupa nosača i različitih proton-donorskih grupa lekovite supstance (Pan, 2002). Kada je lekovita supstanca koja se adsorbuje lako rastvorljiva u disperznom medijumu (rastvaraču), pomoću koga se nanosi na površinu adsorbensa, rastvorena (molekularno dispergovana) lekovita supstanca će nakon adsorpcije u značajnoj meri difundovati na površinu *Neusilin*<sup>®</sup> nosača prilikom čega će se formirati veliki broj vodoničnih veza. Ako se lekovita supstanca nanosi na površinu *Neusilin*<sup>®</sup> nosača, korišćenjem disperznog medijuma u kome se lekovita supstanca slabo rastvara, dispergovana lekovita supstanca ne može lako da difunduje do površine adsorbensa, pri čemu se stvara znatno manji broj vodoničnih veza. Zbog toga prilikom adsorbovanja lekovitih supstanci uz pomoć medijuma u kome je supstanca slabo rastvorljiva, kristalizacija će biti dominantni mehanizam koji dovodi do smanjenja brzine rastvaranja leka odmah nakon adsorpcije ili tokom čuvanja (Gupta i sar., 2002a). Karakteristike određenih komercijalno dostupnih adsorbenasa iz grupe *Neusilin*<sup>®</sup> predstavljene su u Tabeli 5.3 (Agarwal i sar., 2009; Kumar, 2007).

---

<sup>3</sup><http://www.neusilin.com/>

<sup>4</sup>[http://www.fuji-silysia.co.jp/english/product/micronized\\_silica/sylsilia.html](http://www.fuji-silysia.co.jp/english/product/micronized_silica/sylsilia.html)

**Tabela 5.3 - Karakteristike najčešće ispitivanih poroznih adsorbenasa iz grupe Neusilin<sup>®</sup> i Sylaysia<sup>®</sup>**

<i>Komercijalni naziv</i>	<i>Prosečna veličina čestica (μm)</i>	<i>Specifična površina (m<sup>2</sup>/g)</i>	<i>Veličina pore (nm)</i>	<i>Zapremina pore (ml/g)</i>
Neusilin <sup>®</sup> UFL2	5	310	n.a.*.	n.a.
Neusilin <sup>®</sup> FL2	5	150	n.a.	n.a.
Neusilin <sup>®</sup> US2	80	300	5 – 6	n.a.
Sylaysia <sup>®</sup> 350	3.9	300	21	1.6
Sylaysia <sup>®</sup> 470	14.1	300	17	1.25
Sylaysia <sup>®</sup> 440	6.2	300	17	1.25
Sylaysia <sup>®</sup> 740	5.0	700	2.5	0.44

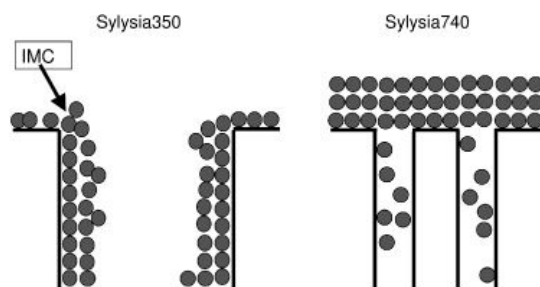
\* podaci nisu dostupni u literaturi

Sylaysia<sup>®</sup> nosači predstavljaju amorfnu silika prašak visokog stepena čistoće i visokog poroziteta koji se široko koristi u farmaceutskoj, prehrambenoj kao i kozmetičkoj industriji. Koristi se kao sredstvo za sušenje, dopunjavanje, sredstvo za klizanje, adsorbens i kao sredstvo za sprečavanje stvaranja tzv. „kolača“ kod suspenzija. Karakteristike određenih komercijalno dostupnih nosača iz grupe Sylaysia<sup>®</sup> predstavljene su u Tabeli 5.3.

Pokazano je da porozni adsorbensi mogu poslužiti kao nosači brojnih teško rastvorljivih lekovitih supstanci omogućavajući brzo ili modifikovano oslobađanje. Istraživanja su vršena sa silika nosačima (Beg i sar., 2013; Ito i sar., 2006; Planinsek i sar., 2011; Sander i Holm, 2009; Takeuchi i sar., 2005), uređenim mezoporoznim silikatima (Vallet-Regi i sar., 2004; Zhao i sar., 1998) kao i poroznim nosačima od magnezijum-aluminometasilikata (Agarwal i sar., 2009; Agarwal i sar., 2013; Bhagwat i D'Souza, 2012; Gupta i sar., 2003; Hentzschel i sar., 2012; Kallakunta i sar., 2012; Kanuganti i sar., 2012; Krupa i sar., 2010). Brzina rastvaranja slabo rastvorljivih lekovitih supstanci adsorbovanih na pomenute adsorbense je obično veća u odnosu na samu supstancu. Veća specifična površina adsorbenasa ukazuje na veću kontaktnu površinu između adsorbovane lekovite supstance i medijuma u kome se vrši ispitivanje, što bi trebalo da vodi većoj brzini rastvaranja, međutim to nije uvek slučaj. Hidrofobne interakcije lekovite supstance sa adsorbensom kao i postojanje vodoničnih veza obično dovode do prelaza iz kristalnog u amorfnu oblik lekovite supstance koji skoro uvek pokazuje brže rastvaranje u odnosu na kristalni oblik

(Salonen i sar., 2005). Takođe nemogućnost obrazovanja kristalne rešetke unutar pora adsorbensa usled malog prostora i jakih interakcija dovodi do stvaranja molekularne disperzije unutar pora koja je dostupna za brzo ispiranje medijumom. Međutim, ukoliko dođe do hemijske adsorpcije, stvaranjem hemijskih veza između lekovite supstance i adsorbensa, kao i naknadne kristalizacije na površini adsorbensa brzina i stepen rastvaranja mogu biti znatno smanjeni (Gupta i sar., 2002a).

Kod adsorbenasa velike specifične površine, koji poseduje veliki broj pora malog dijametra, postoji verovatnoća da se pri visokom opterećenju sa lekovitom supstancom pore malog dijametra zatvore slojem od adsorbovanog materijala prilikom čega se specifična površina znatno smanjuje, što posledično vodi sporijem oslobađanju lekovite supstance i značajnom smanjenju kapaciteta adsorpcije. Primera radi specifična površina poroznih silika nosača Sylysia<sup>®</sup> 350 i Sylysia<sup>®</sup> 740 se pri indometacin/nosač opterećenju 1:1 smanjuje sa 300 odnosno 700 m<sup>2</sup>/g na 99.5 odnosno 7.4 m<sup>2</sup>/g (Slika 5.3) (Takeuchi i sar., 2005).



Slika 5.3 - Shematski prikaz lokalizacije indometacina u porama Sylysia<sup>®</sup> 740 i Sylysia<sup>®</sup> 350 u čvrstim disperzijama nosač/lekovita supstanca 1/1 (Takeuchi i sar., 2005).

Amorfni porozni magnezijum-aluminometasilikat, poznatiji pod komercijalnim nazivom *Neusilin*<sup>®</sup> je takođe korišćen u cilju poboljšanja brzine rastvaranja slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Pokazano je da se interakcija putem vodoničnih veza između ibuprofena i *Neusilin*<sup>®</sup> - a US2 javlja čak i pri jednostavnom mešanju komponenti u tarioniku sa pistilom prilikom čega ibuprofen prelazi iz kristalnog u amorfni oblik (Krupa i sar., 2010). Takođe je pokazan prelazak u amorfni oblik ketoprofena, naproksena

i indometacina pomoću vodoničnih veza, pri zajedničkom usitnjavanju lekovite supstance sa *Neusilin*<sup>®</sup> - *om* US2 pomoću mlina, ali i progesterona kod koga se stvaranje amorfne oblike ostvaruje drugim mehanizmom, jer supstanca nema proton-donorsku grupu (Gupta i sar., 2003). Veličina čestica adsorbensa kao i vrednost specifične površine mogu znatno uticati na brzinu i stepen rastvaranja lekovite supstance. Agarwal i saradnici su ispitivali uticaj specifične površine kao i veličine čestica amorfne magnezijum-aluminometasilikata na brzinu i stepen rastvaranja grizeofulvina iz čvrstog samoemulgujućeg sistema prilikom čega su došli do zaključka da interakcija lekovite supstance sa spoljašnjom površinom adsorbensa dovodi do posledične kristalizacije grizeofulvina i naknadnog smanjenja brzine rastvaranja, dok u delu formulacije koji je adsorbovan u pore adsorbensa grizeofulvin ostaje u rastvorenom obliku i odmah je dostupan za rastvaranje u medijumu (Agarwal i sar., 2009). Na količinu formulacije koja će se naći u porama adsorbensa utiče dijametar i volumen pora, prilikom čega *Neusilin*<sup>®</sup> US2, sa specifičnom površinom 300 m<sup>2</sup>/g i veličinom čestica oko 80 µm, nasuprot *Neusilin*<sup>®</sup> - *u* UFL2 iste specifične površine, ali veličine čestica 5 µm (Tabela 5.3), poseduje znatno uže i duže pore prilikom čega veliki deo adsorbovane formulacije ostaje na spoljašnjoj površini adsorbensa. Zbog toga prilikom upotrebe *Neusilin*<sup>®</sup> - *a* US2 kao adsorbensa veći udeo grizeofulvina kristališe, što ima za posledicu smanjenu brzinu i stepen rastvaranja leka u odnosu na formulaciju sa *Neusilin*<sup>®</sup> - *om* UFL2 kao adsorbensom (Agarwal i sar., 2009).

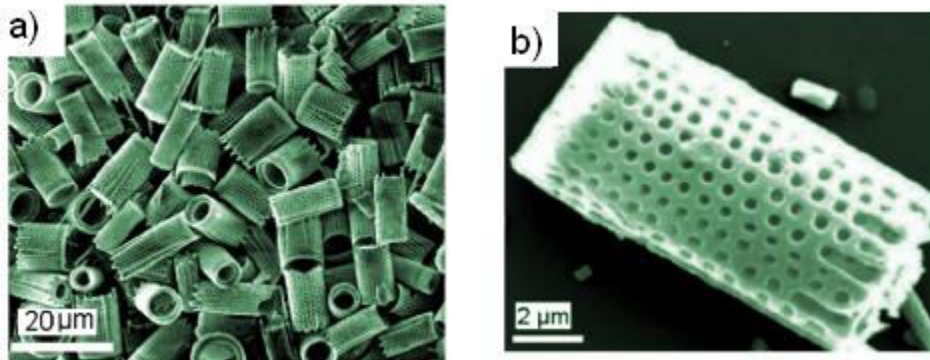
Nakon istraživanja Vallet Regi i saradnika, gde je pokazana upotreba sintetskog mezoporoznog MCM – 41 kao potencijalnog nosača model lekovite supstance, ibuprofena, razvijen je veliki broj drugih mezoporoznih nosača sa različitim veličinom i strukturom pora kao i sa različitim funkcionalizacijom površine u cilju postizanja modifikovanog oslobađanja lekovite supstance (Vallet-Regi i sar., 2004). Istraživanja su pokazala da profil brzine rastvaranja ibuprofena iz formulacije u kojoj je MCM – 41 korišćen kao nosač zavisi od metode koja je korišćena za nanošenje lekovite supstance. Ukoliko se brzina rastvaranja lekovite supstance ispituje pod statičnim uslovima, bez mešanja medijuma, oslobađanje lekovite supstance ne zavisi od veličine pora nosača. Međutim ispitivanjem brzine rastvaranja pod dinamičnim uslovima, korišćenjem medijuma koji predstavlja simuliranu telesnu tečnost, pokazano je da se brzina rastvaranja ibuprofena smanjuje

ukoliko se veličina pora nosača smanjuje od 3,6 do 2,5 nm (Horcajada i sar., 2004). Brzina rastvaranja određene lekovite supstance uvek zavisi od kombinacije karakteristika i nosača i lekovite supstance (Kinnari i sar., 2011). Oslobođanje molekula različite veličine iz pora iste veličine određenog nosača je takođe različito. Iz tog razloga su predložene granice veličine pora za određeni molekul nakon koje se daljim povećanjem veličine ne utiče značajno na brzinu rastvaranja lekovite supstance (Miura i sar., 2011). Pored veličine, i morfologija pora može takođe uticati na brzinu rastvaranja lekovite supstance. Pokazano je da difuzija vankomicina unutar sfernih čestica mezoporoznog silikata SBA-15 je manje ograničena u odnosu na odgovarajući vlaknast materijal (Cauda i sar., 2008). Razlog je manji broj otvora na površini vlaknastog adsorbensa u odnosu na sferan. Takođe je pokazano da postojanje velikog broja vijugavih pora dovodi do niskog kapaciteta adsorpcije usled lošeg prolaska lekovite supstance u dublje delove čestice kao i delimičnog „zarobljavanja“ supstance (Cauda i sar., 2009).

Mogućnost funkcionalizacije površine adsorbensa pomoću različitih funkcionalnih grupa otvara nova polja njihove potencijalne primene. Sa jedne strane funkcionalizacija površine može dovesti do smanjenja kapaciteta adsorbensa za lekovitu supstancu, ali sa druge strane nudi brojne mogućnosti kontrolisanog oslobođanja. Prilikom funkcionalizacije dolazi do promene niza elektrostatičkih, hidrofobnih/hidrofilnih i brojnih drugih adhezivnih interakcija lekovite supstance i adsorbensa koje utiču na kapacitet adsorbovanja i brzinu rastvaranja lekovite supstance iz lek/nosač matriksa.

U novije vreme se sve više razmatra upotreba dijatomitnih mikrolapsula ili dijatomita kao prirodnih poroznih nosača za različite lekovite supstance (Aw i sar., 2011). Dijatomiti predstavljaju skelet jednoćelijskih fotosintetičkih algi sa kompleksnom 3D mikrostrukturom i multifunkcionalnim karakteristikama. Sastoje se od 92 % amornog silicijum-dioksida ( $\text{SiO}_2$ ), 1–3 % aluminijum-oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), 0,5–1 % gvožđe(III)-oksida ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), 0,1–0,3 % magnezijum-oksida ( $\text{MgO}$ ), 0,2–0,5 % kalcijum-oksida ( $\text{CaO}$ ), 0,07–0,1 % kalijum-oksida ( $\text{K}_2\text{O}$ ), sa tragovima titan-dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) i fosfor(V)-oksida ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) (Yu i sar., 2009). Dobijaju se prečišćavanjem dijatomejske zemlje. Prečišćene dijatomitne silika mikrokapsule poseduju kombinaciju strukturnih, mehaničkih i hemijskih karakteristika koje mogu da posluže za prevazilaženje uobičajenih prepreka na koje se

nailazi formulisanjem konvecionalnih terapijskih sistema (Aw i sar., 2012). Prečišćavanje sirovog materijala koji sadrži dijaminomitne silika mikrokapsule ukljućuje sledeće procese: usitnjavanje kamenja, uklanjanje velikih agregata dijaminomita, uklanjanje oksidiranih nećistoća tretiranjem uzorka kiselinom (1 M sumporna kiselina), razdvajanje ćestica po velićini pomoću filtracione ili sedimentacione metode (Yu i sar., 2010).



Slika 5.4 - Prećišćene dijaminomitne silika mikrokapsule (Aw i sar., 2012).

Prirodni dijaminomiti poseduju nekoliko prednosti u odnosu na sintetske nosaće: karakteristićnu strukturu sa šupljom i velikom sredinom i prisustvo mikro- i makroporoziteta (Slika 5.4), dobru biokompatibilnost, posedovanje površine koja se lako moće modifikovati, netoksićnost, visoku permeabilnost, nisku gustinu i karakteristike koje oponašaju prirodne konstituentne kostiju kao i medicinskog implanta (Aw i sar., 2012). Specifićna površina prećišćenih dijaminomitnih silika mikrokapsula je 30,9 m<sup>2</sup>/g, volumen pora 0,052 ml/g dok je prosećan dijaminetar pore oko 13,6 nm (Aw i sar., 2011).

Noviji adsorbensi prirodnog ili sintetskog porekla treba da pokažu veći kapacitet adsorbovanja kao i brojne mogućnosti kontrolisanog, usporenog ili signal iniciranog oslobađanja lekovite supstance u odnosu na konvencionalne adsorbense. Signal za iniciranje oslobađanja lekovite supstance moće biti: promena pH, promena temperatura, svetlost, hemijski ili magnetni stimulans (Taguchi i Schuth, 2005).

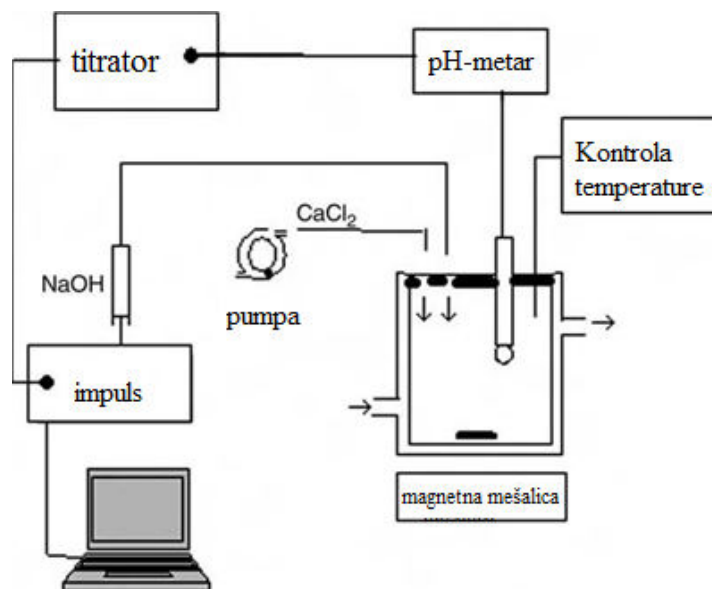


## 6. *In vitro* model lipolize

Sa razvojem različitih lipidnih formulacija teško rastvorljivih lekovitih supstanci razvijaju se i metode ispitivanja i karakterizacije ovih sistema. Pošto ove formulacije sadrže lipide, koji nakon peroralne primene podležu procesu lipolize, u cilju što tačnijeg predviđanja ponašanja sistema *in vivo* kao i uticaja procesa lipolize na brzinu oslobađanja i rastvaranja lekovite supstance iz lipidnog sistema, neophodno je bilo razviti adekvatnu metodu ispitivanja pomoću koje bi se takva ispitivanja mogla izvršiti. Ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz lipidnih formulacija korišćenjem tipične aparature sa lopaticama ili aparature sa korpicama često su davala rezultate koji se nisu mogli dovesti u korelaciju sa rezultatima *in vivo* ispitivanja. Takođe, korišćenjem konvencionalnih metoda ispitivanja brzine rastvaranja nije se mogao predvideti uticaj hrane kao i procesa lipolize na sistem tokom tranzita duž gastrointestinalnog trakta. Kako bi se simulirali uslovi GIT – a u stanju gladovanja ili u stanju sitosti, razvijeni su brojni kompleksni medijumi, tzv. biorelevantni medijumi, za ispitivanje brzine rastvaranja (Dressman i sar., 1998; Dressman i Reppas, 2000; Pederson i sar., 2000). Predloženi biorelevantni medijumi sadrže surfaktante i puferske komponente koje su normalno prisutne u gastrointestinalnoj tečnosti. Medijumi sadrže žučne kiseline (glukoholate i tauroholate), masne kiseline i fosfolipide, obično fosfatidilholin u odgovarajućem odnosu. U cilju tačnijeg predviđanja uticaja pojedinih komponenti medijuma na brzinu oslobađanja lekovite supstance, prilikom izrade ovih medijuma moraju se koristiti materijali visokog stepena čistoće. Međutim, korišćenjem biorelevantnih medijuma ne može se ispitati uticaj lipolize pojedinih komponenti lipidnog sistema na sposobnost formulacije da održi lekovitu supstancu u solubilizovanom obliku tokom tranzita duž gastrointestinalnog trakta i time omogući veći stepen resorpcije i posledično višu biološku raspoloživost. Prilikom lipolize komponenti lipidnog sistema (Cuine i sar., 2008; Fernandez i sar., 2009; Larsen i sar., 2008) može doći do pada solubilizacionog kapaciteta lipidnog sistema za lekovitu supstancu, što može dovesti do naknadne precipitacije i posledičnog smanjenja biološke raspoloživosti (Sassene i sar., 2010). Pored lipida koji se koriste prilikom izrade lipidnih formulacija, mnogi surfaktanti takođe mogu biti supstrati lipaze, kao što su Labrasol<sup>®</sup> (Fernandez i sar., 2009),

Cremophor<sup>®</sup> EL (Cuine i sar., 2008) i mnogi drugi. Lipoliza polietilenglikol-estara u Labrasol<sup>®</sup> - u se vrši uglavnom pomoću holesterol-esteraze i srodnog proteina 2 pankreasne lipaze (Fernandez i sar., 2007).

Lipoliza predstavlja izuzetno komplikovan proces koji je vrlo teško imitirati. Međutim, kako bi se dobile korisne i što tačnije informacije neophodno je da eksperimentalni uslovi budu što sličniji fiziološkim uslovima. Većina *in vitro* modela lipolize simulira uslove u tankom crevu, međutim u novije vreme uviđen je značaj lipolize katalizovane gastričnom lipazom, prilikom čega su razvijeni modeli koji obuhvataju lipolizu i u intestinumu i u želucu (Fernandez i sar., 2009). Prilikom lipolize lipidnih komponenti oslobađaju se masne kiseline koje dovode do smanjenja pH vrednosti medijuma. Korišćenjem tzv. pH-stat aparature pH se održava konstantnim, titiranjem medijuma sa rastvorom NaOH. Stepem lipolize, koji se određuje na osnovu količine oslobođenih masnih kiselina, se određuje indirektno preko utroška NaOH (Slika 6.1).



Slika 6.1 - Shematski prikaz aparature za *in vitro* ispitivanje lipolize (Fatouros i sar., 2007a)

U cilju tačnijeg simuliranja *in vivo* uslova lipolize *in vitro* lipoliza se vrši u medijumu koji sadrži žučne soli i fosfolipide na temperaturi od 37°C i pri konstantnoj brzini mešanja.

Žučne soli i fosfolipidi značajno utiču na aktivnost pankreasne lipaze. Imajući u vidu da koncentracija ovih supstanci u gastrointestinalnoj tečnosti varira u zavisnosti od stanja sitosti, kao i da fosfolipidi mogu da potiču iz žučne kese i iz hrane dok žučne soli mogu da potiču samo iz žučne kese, njihov odnos u medijumu za lipolizu može jako da varira (Kleberg i sar., 2010). Komercijalno dostupne žučne soli mogu biti svinjskog ili goveđeg porekla. Iako literatura ne daje tačne informacije o sastavu žučnih soli u žuči različitih vrsta životinja, smatra se da je sastav žučnih soli svinjskog ili goveđeg porekla sličan sastavu žučnih soli kod čoveka i samim tim prihvatljiv za upotrebu u *in vitro* modelu lipolize (Gillin i sar., 1989). Koncentracije žučnih soli u *in vitro* modelu lipolize se kreću od 5 – 20 mM, prilikom čega niski nivoi simuliraju uslove u stanju gladovanja, a visoki u stanju sitosti. Povećanje koncentracije žučnih soli, pri konstantnoj koncentraciji fosfolipida dovodi do povećanja stepena lipolize (MacGregor i sar., 1997). Iako se *in vivo* koncentracija fosfolipida kreće od 0,1 – 0,6 mM u stanju gladovanja i od 0,1 – 4,8 mM u stanju sitosti, ispitivani su različiti odnosi žučnih soli i fosfolipida u medijumu za lipolizu, od 1 – 38,9. Međutim najviše studija je rađeno sa odnosom žučnih soli i fosfolipida od 2 – 6 (Kleberg i sar., 2010). Fosfolipidi mogu da inhibiraju aktivnost kompleksa pankreasna lipaza-kolipaza u prisustvu mešovutih micela koje se sastoje od žučnih soli i fosfatidilholina, dok se inhibicija poništava u prisustvu fosfolipaze A<sub>2</sub>, koja hidrolizuje fosfatidilholin u lizofosfatidilholin, koji zajedno sa žučnim solima ne inhibira pomenuti kompleks (Blackberg i sar., 1979). Visoki nivoi slobodnih masnih kiselina koji se stvaraju prilikom *in vitro* lipolize mogu da inhibišu dalji proces lipolize (Borel i sar., 1994). Samim tim ukljanjanje jonizovanih masnih kiselina titracijom sa NaOH je vrlo značajno za tačnu procenu stepena lipolize ispitivane lipidne formulacije.

Aktivnost lipaze se može meriti različitim metodama. Najčešća metoda obuhvata korišćenje tributirina, kao supstrata, prilikom čega se aktivnost lipaze izražava u TBU jedinicama. Druga metoda je propisana u USP33/NF28 gde se kao supstrat koristi emulzija maslinovog ulja i arapske gume. Aktivnost se izražava u USP jedinicama prilikom čega jedna USP jedinica predstavlja aktivnost lipaze koja oslobađa 1 mol masnih kiselina po minutu iz supstrata.

Na osnovu ekperimentalnih uslova razlikuju se tri osnovna modela lipolize: model istraživačke grupe iz Kopenhagena, Monaša i Jerusalima (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1 - Eksperimentalni uslovi tri modela lipolize koji su korišćeni u Kopenhagenu, Monašu i Jerusalimu**

	<i>Kopenhagen</i> <sup>a</sup>	<i>Monaš</i> <sup>b</sup>	<i>Jerusalim</i> <sup>c</sup>
Izvor lipase	Svinjski pankreatin (3x USP)	Svinjski pankreatin (8x USP)	Svinjski pankreatin (8x USP)
Aktivnost lipase	300–800 USP units/ml	1000 tributirin jedinica/ml	1000 tributirin jedinica/ml
Vrsta žučnih soli	Ekstrahovane različite vrste žučnih kiselina iz svinjske žučne kese	Taurodeoksiholna kiselina	Tauroholna kiselina
Koncentracija žučnih soli	5 – 30 mM	5 – 20 mM	5 mM
Vrsta fosfolipida	Fosfatidilholin	Lecitin (60 % fosfatidilholin)	L - $\alpha$ fosfatidilholin
Odnos žučnih soli i lipida	4	4	4
Način dodavanja $Ca^{2+}$	Konstantno dodavanje $Ca^{2+}$ 0,045 – 0,181 mmol/min	Inicijalno dodavanje od 5 mM $Ca^{2+}$	Inicijalno dodavanje 5 mM $Ca^{2+}$
Puferski pH	pH = 6.5 (2mM tris-maleat)	7,5 (50 mM tris-maleat)	6,8 – 7,4 (50 mM tris-maleat)
Inicijalni volumen medijuma za digestiju	300 ml	10 – 40 ml	40 ml

<sup>a</sup>Christensen i sar., 2004; Fatouros i sar., 2007; Larsen i sar., 2008; Zangenberg i sar., 2001a, 2001b.

<sup>b</sup>Cuine i sar., 2008; Kaukonen i sar., 2004; Porter i sar., 2004; Sek i sar., 2002.

<sup>c</sup>Dahan and Hoffman, 2006, 2007.

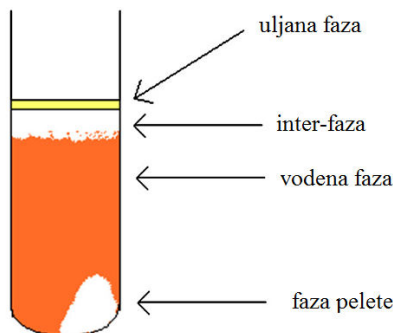
Visoka aktivnost enzima ima relativno mali uticaj na stepen lipolize u poređenju sa drugim faktorima kao što su žučne soli i  $Ca^{2+}$  jon (Zangenberg i sar., 2001a). Prisustvo  $Ca^{2+}$  je neophodno za formiranje kompleksa pankreasna lipaza-kolipaza, koji poseduje lipolitičku aktivnost. Kao što je ranije pomenuto slobodne masne kiseline inhibiraju aktivnost pankreasne lipaze. *In vivo* masne kiseline se apsorbuju tako da efekat inhibicije

izostaje. MacGregor i saradnici su pokazali da upotrebom visokih koncentracija žučnih soli inhibicija pankreasne lipaze izostaje, kao i da dodatkom  $\text{Ca}^{2+}$  upotreba visokih koncentracija žučnih soli za inhibiciju nije potrebna (MacGregor i sar., 1997). Zangenberg i saradnici su zaključili da se brzina lipolize može kontrolisati kontinualnim dodavanjem  $\text{Ca}^{2+}$  (Zangenberg i sar., 2001a) što je dovelo do razvoja dinamičkog modela lipolize koji se naziva još i Kopenhagenski model (Tabela 6.1).  $\text{Ca}^{2+}$  uklanja slobodne masne kiseline formiranjem kalcijumovih sapuna i na taj način simulira njihovu *in vivo* resorpciju. Monaški i Jerusalimski model lipolize koriste fiksnu količinu  $\text{Ca}^{2+}$  koja se dodaje na početku lipolize, što odgovara statičkom modelu lipolize (Tabela 6.1). Prilikom dodavanja fiksne količine  $\text{Ca}^{2+}$  na početku procesa *in vitro* lipolize primećena je veoma brza inicijalna lipoliza, prilikom čega skoro sav materijal podleže procesu lipolize u toku prvih 5 – 10 minuta (Cuine i sar., 2008; Zangenberg i sar., 2001a).

Aktivnost pankreasne lipaze zavisi od pH vrednosti medijuma. Optimalna pH vrednost medijuma je od 6,5 – 8,0 (Armand i sar., 1992). Da bi se masne kiseline oslobođene dejstvom pankreasne lipaze titrirale sa NaOH neophodno je da budu jonizovane. Vrednost pKa masnih kiselina dugog lanca je  $>8$  (Kanicky and Shah, 2002), mada se ona smanjuje u prisustvu žučnih soli i kalcijuma. Samim tim radna pH vrednost medijuma za lipolizu predstavlja kompromis koji omogućava adekvatnu aktivnost pankreasne lipaze i jonizaciju masnih kiselina.

Nakon uzorkovanja medijuma za lipolizu kome je dodata određena količina lipidne formulacije, dodaje se inhibitor lipaze, najčešće metanolni rastvor 4-bromfenilboronske kiseline (Zangenberg i sar., 2001b). Uzorci se centrifugiraju prilikom čega se formiraju 4 različite faze: uljana faza, inter-faza, vodena faza i faza pelete (Slika 6.2) (Larsen i sar., 2011; 2010). Uljana faza sadrži ulje koje se normalno odvaja iz emulzija, koje su termodinamički nestabilan sistem, ili iz mikroemulzija ukoliko je eventualno opao kapacitet solubilizacije sistema za uljanu fazu tokom lipolize. Inter-faza predstavlja mikroemulzioni deo. Koliki udeo inter-faze će biti zavisi od vrste lipidnog sistema na kome se vrši lipoliza, kao i od prirode surfaktanta. Vodena faza sadrži komponente rastvorene u vodi iz lipidnog sistema dok faza pelete sadrži kalcijumove sapune

masnih kiselina, nastalih tokom lipolize, eventualno precipitovanu lekovitu supstancu kao i deo formulacije koji se nije rastvorio ukoliko se radi o čvrstim lipidnim sistemima.



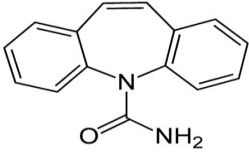
Slika 6.2 - Shematski prikaz 4 faze nakon centrifugiranja uzoraka lipolize (Larsen i sar., 2011).

Nakon centrifugiranja uzoraka lipolize lipidnih formulacije tipa SMEDDS neće se formirati uljana faza, kao ni inter-faza pod uslovom da kapacitet solubilizacije ispitivane formulacije ostane nepromenjen tokom lipolize. Inicijalno uljana faza može biti velika, ali kako lipoliza odmiče postoji verovatnoća da kasnije nestane. Nasuprot uljanoj fazi, faze pelete, koja sadrži kalcijumove sapune masnih kiselina je na početku lipolize mala, ali se tokom lipolize postepeno povećava. Vodena faza i inter-faza sadrže različite koloidne faze (Fatouros i sar., 2007). Ispitivanjem svake od ovih faza i određivanjem količine lekovite supstance prisutne u svakoj od njih, može se utvrditi stepen lipolize lipida iz ispitivane lipidne formulacije kao i potencijal ispitivane formulacije da održi lekovitu supstancu u solubilizovanom obliku i nakon peroralne primene duž GIT - a.

## 7. Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina

Karbamazepin je široko korišćeni antiepileptik (Macdonald i McLean, 1986). Koristi se prilikom lečenja sekundarnih generalnih tonično-kloničkih i parcijalnih napada kao i protiv trigeminalne neuralgije (Goodman i sar., 2001). Prema svojim osobinama karbamazepin se svrstava u drugu grupu BSK sistema klasifikacije u koju spadaju supstance koje karakterišu loša rastvorljivost i dobra permeabilnost (Amidon i sar., 1995; Lindenberg i sar., 2004). Ovakve supstance nemaju zadovoljavajuću rastvorljivost u vodenom medijumu, čime bi se omogućila njihova adekvatna resorpcija (Ritschel, 1992). Osnovne karakteristike karbamazepina date su u Tabeli 7.1 (Ph. Eur; Ph. Jug. V).

**Tabela 7.1 - Hemijska struktura i osobine karbamazepina (Ph. Eur; Ph. Jug. V)**

Strukturna formula	
Molekulska formula	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Hemijski naziv prema IUPAC <sup>5</sup> nomenklaturi	5 <i>H</i> -Dibenzo[ <i>b,f</i> ]azepine-5-carboxamide
CAS <sup>6</sup> broj	298-46-4
M <sub>r</sub>	235,3
Osobine	Beli ili skoro beli kristalni prašak, teško rastvorljiv u vodi, lako rastvorljiv u metilen-hloridu, umereno rastvorljiv u acetonu i etanolu (96 %)

Karbamazepin pokazuje polimorfizam i pseudopolimorfizam. Postoje najmanje četiri polimorfna oblika karbamazepina (dva monoklanična, jedan trigonalni ili  $\alpha$  - polimorfni oblik i triklinički ili  $\gamma$  – polimorfni oblik) i jedan dihidrat (McMahon i sar., 1996; Grzesiak

<sup>5</sup> *International Union of Pure and Applied Chemistry*

<sup>6</sup> *Chemicals Abstract Service*

i sar., 2003; Harris i sar., 2005). U literaturi su prisutne različite oznake za pojedinačne polimorfne oblike karbamazepina što vrlo često može dovesti do zabune (Tabela 7.2)

**Tabela 7.2 - Anhidrovani oblici karbamazepina (CBZ)**

Naziv oblika	CBZ (M)	CBZ (Trg)	CBZ (Trc)	CBZ (IV)	Izvor
<i>Kristalni sistem</i>	p- monokliničan	trigonalan	trikliničan	c-monokliničan	
$T_{top}$ (°C)	175-180 °C	192-194 °C	192-195 °C	188 °C	
Naziv	III		I		Krahn i Mielck, 1987; McMahon i sar., 1996; Behme i sar., 1991; Roberts i Rowe, 1996.
	I	II	III	IV	Grzesiak i sar., 2003; Kaneniwa i sar., 1987; Matsuda i sar., 1994; Kobayashi i sar., 2000.
	$\beta$	$\alpha$			Lefebvre i sar., 1986
	monoklinička	trigonalna			Lowes i sar., 1987
			triklinička		Ceoline i sar., 1997

Različiti polimorfni oblici pored različite kristalne strukture poseduju i različite temperature topljenja, hemijsku reaktivnost i rastvorljivost. Karbamazepin oblik III (p – monoklinični oblik) je termodinamički stabilan na sobnoj temperaturi (Krahn i Mielck, 1987). Ovaj oblik karbamazepina predstavlja polimorfni oblik karbamazepina koji poseduje farmakološki efekat, pa se samim tim koristi za izradu komercijalnih preparata karbamazepina (Sehić i sar., 2010).

Veliki broj ekscipijenasa utiče na polimorfni prelaz karbamazepina u toku izrade preparata, tako da bi prilikom formulisanja preparata trebalo uzeti u obzir uticaj ekscipijenasa na polimorfni prelaz karbamazepina bi trebalo uzeti u obzir. Poznato je da hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) inhibira stvaranje dihidratnog oblika karbamazepina



(koji ima najmanju rastvorljivost) i na taj način doprinosi boljem profilu oslobađanja lekovite supstance (Otsuka i sar., 1999). Prisustvo HPMC u formulacijama karbamazepina sa odloženim oslobađanjem takođe doprinosi smanjenom stvaranju dihidratnog oblika i posledično boljem profilu oslobađanja lekovite supstance. Takođe nađeno je da HPMC sprečava kristalizaciju trigonalne forme formiranjem vodoničnih veza (Katzhendler i sar., 1998). Treba obratiti pažnju na sredstva za vezivanje, koja se koriste prilikom izrade granulata, jer je pokazano da i ona velikim delom utiču na polimorfni prelaz karbamazepina. Poznato je ukoliko se koristi povidon, karbamazepin ostaje u amorfnom obliku, dok upotreba polietilen-glikola (PEG 4000 i PEG 6000) dovodi do stvaranja metastabilne forme I karbamazepina (triklinička forma), u vidu malih kristala dispergovanih u matriksu. Obe vrste sredstva za vezivanje dovode do povećanja rastvorljivosti karbamazepina (Nair i sar., 2002). Tehnološki procesi koji se primenjuju u toku izrade konačnog farmaceutskog oblika mogu da izazovu značajnu polimorfnu promenu karbamazepina. Poznato je da procesi usitnjavanja i kompresije izazivaju navedenu polimorfnu tranziciju. Najstabilniji oblik na proces kompresije je dihidratna forma karbamazepina. Najefikasniju stabilnost pokazuje trigonalna forma, međutim p – monoklinička forma ostaje stabilna u normalnim uslovima proizvodnje i čuvanja (Lefebvre i sar. 1986). Sušenje raspršivanjem, koje se koristi zbog sfernog oblika dobijenih čestica radi dobijanja lako protočnog praška, takođe može značajno da utiče na polimorfni prelaz karbamazepina. Ukoliko polazimo od p – monokliničke forme u najvećoj meri se dobija trigonalna forma karbamazepina. Promena rastvarača koji se uparava nema značajan uticaj na polimorni oblik karbamazepina (Gosselin i sar., 2003).

## **8. Tehnike karakterizacije čvrstih samodispergujućih sistema**

Raznovrsnost i dinamički karakter čvrstih samodispergujućih sistema za oralnu primenu otežavaju istraživanje i ispitivanje ovih sistema. Za potpunu karakterizaciju fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance inkorporirane u odgovarajući lipidni sistem, kao i fizičko-hemijskih osobina samog nosača, kao i adekvatniju procenu ponašanja ovih sistema nakon peroralne primene, neophodno je primeniti veliki broj tehnika koje moraju biti uzajamno komplementarne. U dosadašnjim istraživanjima najuspešnije su se pokazale

tehnike koje se zasnivaju na merenju električne provodljivosti, viskoziteta, refleksije fotona, refleksije x-zraka kao i termalne tehnike. Međutim, samodispergujuća osobina ovih sistema, kao i prisustvo ekscipijenasa koji nakon peroralne primene podležu procesu lipolize, koji može uticati na osobine sistema *in vivo*, ukazuju da za potpunu karakterizaciju ovih sistema nije dovoljno utvrditi fizičko stanje lekovite supstance u konačnom farmaceutskom obliku, već je neophodno dodatno ispitati sistem korišćenjem tehnika pomoću kojih se mogu simulirati *in vivo* uslovi nakon peroralne primene. Jedan od pristupa predstavlja *in vitro* model lipolize (Christensen i sar., 2004; Fatouros i sar., 2007; Larsen i sar., 2008; Zangenberg i sar., 2001a, 2001b). Primenom konduktometrijskih i reoloških merenja, pri postepenom dodavanju spoljašnje faze, obično vode, može se proceniti intenzitet interakcija između različitih struktura koje nastaju i steći uvid u prirodu tih interakcija (Zhao i sar., 2007; Antunes i sar., 2003; Graca i sar., 2009; Rojas i sar., 2010). Ispitivanje veličine prečnika kapi nakon dispergovanja ispitivanih formulacija vrši se tehnikama refleksije fotona, obično fotonska korelaciona spektroskopija (*eng.* Photon Correlation Spectroscopy, skr. PCS; *eng.* Dynamic Light Scattering, skr. DLS) ili laserske difrakcije (*eng.* Laser Diffraction, skr. LD). Pomoću ovih tehnika lako se utvrđuje veličina formiranih kapi, nakon dispergovanja samodispergujućeg sistema u spoljašnjoj fazi, kao i indeks polidisperznosti (*eng.* Polydispersity index, skr. PDI) (Goddereris i sar., 2006). Pored njih mogu se koristiti i druge, manje pouzdane tehnike, kao što su optička mikroskopija i Kulterov brojač čestica. U cilju određivanja fizičkog polimorfnog oblika lekovite supstance, kao i utvrđivanja stabilnosti u odgovarajućem farmaceutskom obliku, često se koriste tehnike diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (*eng.* Differential Scanning Calorimetry, skr. DSC), i tehnika difrakcije x-zraka na uzorcima u obliku praška (*eng.* Powdered X-Ray Diffraction, skr. PXRD) kao i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (*eng.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy, skr. FT-IR) (Kim i sar., 1985; Phadnis i sar., 1997). Često se koriste i metode transmisionne elektronske mikroskopije (*eng.* Transmission Electron Microscopy, skr. TEM) i skenirajuće elektronske mikroskopije (*eng.* Scanning Electron Microscopy, skr. SEM), gde se slika stvara usled interakcije elektrona sa tankom površinom uzorka.

# CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja obuhvataju formulaciju i sveobuhvatnu karakterizaciju različitih čvrstih samodispergujućih sistema.

- Prvi deo istraživanja obuhvata formulisanje, izradu i karakterizaciju čvrstog samomikroemulgujućeg sistema, korišćenjem karbamazepina kao model teško rastvorljive lekovite supstance. Karakterizacija samomikroemulgujućeg sistema obuhvata kreiranje pseudoternernog faznog dijagrama, određivanje adekvatnog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta ( $K_m$ ) kao i odnosa surfaktantne i uljane faze, reološku karakterizaciju, određivanje veličine formiranih kapi fotonskom korelacionom spektroskopijom kao i određivanje rastvorljivosti karbamazepina u samomikroemulgujućem sistemu adekvatnom HPLC metodom. Izrada čvrstih samomikroemulgujućih sistema je vršena direktnom adsorpcijom na sintetske porozne nosače. Čvrsti samomikroemulgujući sistemi su okarakterisani diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) radi utvrđivanja polimornog oblika karbamazepina i eventualne interakcije karbamazepina i adsorbensa. Ispitivanja brzine rastvaranja je vršeno iz kapsula punjenih ispitivanim čvrstim samomikroemulgujućim sistemom.
- Drugi deo istraživanja se odnosi na formulisanje i karakterizaciju čvrste samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SSEPS) sa karbamazepinom kao model supstancom. Ovaj deo istraživanja obuhvata pripremu adekvatne tečne samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SEPS) mešanjem surfaktanta kaprilokaproil-makrogol-8-glicerida, kosurfaktanta lecitina, korastvarača propilenglikola i ulja triglicerida srednje dužine lanca u odgovarajućem odnosu i karakterizaciju odabranog sistema korišćenjem fotonske korelacione spektroskopije. Tečna samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija (sadrži oko 40 % (m/m) karbamazepina) je dodatno okarakterisana optičkom mikroskopijom. Odgovarajući SSEPS sistemi su pripremljeni korišćenjem prirodnog poroznog

nosača, dijametrom mikrokapsule, direktnom adsorpcijom ili evaporacijom rastvarača. Karakterizacija čvrstih SEPS sistema kao i odgovarajuće čvrste disperzije je vršena pomoću diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), difrakcije x-zraka praškova (PXRD) kao i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrstih SEPS sistema, kao i iz odgovarajuće čvrste disperzije, vršeno je iz kapsula predhodno napunjenih ispitivanom formulacijom. Dodatno je vršen test ubrzanog starenja i uzorci su naknadno okarakterisani radi utvrđivanja eventualnih promena polimorfnog oblika karbamazepina.

- Treći deo istraživanja obuhvata procenu mogućnosti formulacije samoemulgujućih peleta kao i njihovu karakterizaciju. Formulacija i izrada samoemulgujućih peleta je vršena nanošenjem SEPS formulacije dobijene u drugom delu istraživanja na neutralne pelete veličine jezgra 710 – 825 µm, u uređaju sa fluizidirajućim protokom vazduha uz korišćenje pomoćnih supstanci. Karakterizacija peleta je vršena korišćenjem optičke mikroskopije, DSC i PXRD tehnike, u cilju tačnijeg utvrđivanja polimorfnog oblika karbamazepina. Ispitivanja brzine rastvaranja vršeno je korišćenjem aparature sa lopaticama.
- Četvrti deo istraživanja se odnosi na ispitivanje predhodno izrađenih čvrstih samodispergujućih formulacija metodom *in vitro* dinamičke lipolize. Dobijeni rezultati su upoređivani sa rezultatima koji su dobijeni konvencionalnim metodama *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina. U toku testa *in vitro* lipolize u određenim vremenskim intervalima uzeti su uzorci i vršeno je određivanje karbamazepina HPLC metodom u cilju utvrđivanja kapaciteta solubilizacije ispitivanih formulacija za karbamazepin u toku lipolize.

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

## 9. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTOG SAMOMIKROEMULGUJUĆEG SISTEMA

### 9.1. Materijali i metode

#### 9.1.1. Materijali

*Ekscipijensi koji se koriste za izradu samomikroemulgujućeg sistema: polisorbitat 80*, polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), je korišćen kao surfaktant (S); *Cremophor® RH 40*, PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (BASF, Nemačka), je korišćen kao kosurfaktant (C); *Mygliol® 812*, trigliceridi srednje dužine lanca (Sasol GmbH, Nemačka) je korišćen kao uljana faza (O).

*Porozni adsorbensi: magnezijum-aluminometasilikat (Neusilin® UFL2 (NUFL2), Neusilin® FL2 (NFL2)) (Fuji Chemical Industry, Japan) i porozni silicijum-dioksid (Sylsya® 320 (SYL320) i Sylsya® 350 (SYL350)) (Fuji Sylsya Chemical Japan).*

Ispitivani čvrsti samomikroemulgujući sistemi su punjeni u tvrde kapsule veličine 3 (Capsugel®, Francuska), radi testa ispitivanja brzine rastvaranja. Prilikom ispitivanja korišćena je dvostruko destilovana voda (V).

*Lekovita supstanca: Karbamazepin (CBZ) (Ph. Jug. V)*

#### 9.1.2. Metode

##### 9.1.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti karbamazepina

Rastvorljivost karbamazepina je određena u ulju, surfaktantu, tečnoj SMEDDS formulaciji ( $K_m$ 1:1, SC/O 8:2) i medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja (0.1 M HCl). U 10 ml svakog medijuma pojedinačno dodat je višak karbamazepina, smeša je prenetu u staklene epruvete sa zapašaćem i mešana 48 h na sobnoj temperaturi, pri brzini mešanja od 300 o/min korišćenjem mešalice Ika® KS 260 B (Staufen, Nemačka). Nakon toga, 2 ml svake smeše je centrifugirano 15 min na 4000 o/min korišćenjem centrifuge Tehtnica lc 320, (Zelezniki, Slovenija). Koncentracija karbamazepina je određena pomoću HPLC

analize. Korišćen je Waters Breeze system sa Waters 1525 binarnom HPLC pumpom, Waters 2487 UV/VIS detektorom i Breeze softverom za Windows XP. Korišćena je Terra<sup>®</sup>RP18 (3,5µm 4,6mm x 20mm IS) kolona pri UV detekciji na talasnoj dužini od 285 nm, radnoj temperaturi od 40°C i brzini protoka mobilne faze 1,2 ml/min. Sastav mobilne faze je metanol/voda/glacijalna sirćetna kiselina 35/64/1. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost i standardna devijacija (S.D.) tri uzastopna merenja tri posebno pripremljena uzorka.

### 9.1.2.2. Priprema SMEDDS - Konstrukcija pseudoternernog faznog dijagrama

Pseudoternerni fazni dijagram je konstruisan nakon titracije homogene smeše ulja, surfaktanta i kosurfaktanta na sobnoj temperaturi sa vodom (Gattefosse, 1994). Komponente surfaktantne faze, Polisorbat 80 kao surfaktant (S) i Cremophor<sup>®</sup> RH 40 kao kosurfaktant (C), su merene u istu staklenu čašu, S/C odnos ( $K_m$ ) 1:1 i mešane 30 minuta na magnetnoj mešalici na temperaturi od 40°C kako bi se Cremophor<sup>®</sup> RH otopio. Odnos surfaktanta i kosurfaktanta u surfaktantnoj fazi ( $K_m$ ) je određen pri *pre-screening* studijama na osnovu veličine prečnika kapi SMEDDS/voda, 5/95 sistema, pri čemu je odabran SMEDDS sistem koji je dao najmanju veličinu prečnika kapi. Smeša je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga surfaktanoj fazi je dodato ulje (O) i napravljene su SC/O smeše u odnosima od 9:1 do 1:9 (Tabela 9.1).

**Tabela 9.1 – Sastav formulacija za konstrukciju pseudoternernog dijagrama**

Naziv formulacije	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
S/C = 1:1 (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
O (g)	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Smeše surfaktantne i uljane faze su titrirane sa vodom kap po kap. Tokom dodavanja vode uzorci su mešani i ostavljeni da dostignu ravnotežno stanje. Uzorci su ispitivani

vizuelno radi utvrđivanja transparentnosti sistema. Mikroemulzijama su smatrane samo jednofazne, transparentne, nisko viskozne smeše.

### **9.1.2.3. Odabir SMEDDS za dalja ispitivanja**

Za dalja ispitivanja sa pseudoternernog dijagrama odabrana je formulacija F8 (Tabela 9.1) - SMEDDS sistem polisorbit 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O), SC/O 8/2. Odabran je sistem koji prilikom razblaživanja sa vodom formira mikroemulziju, a pritom sadrži najveći udeo ulja i najmanji udeo surfaktantne faze. SMEDDS formulacija sa karbamazepinom je pripremljena rastvaranjem odgovarajuće količine lekovite supstance u ispitivanom sistemu na 40°C kako bi se PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C) otopilo. Finalna koncentracija CBZ u SMEDDS formulaciji je 3.37 % (m/m). SMEDDS formulacije sa i bez CBZ su pripremljene 48 h pre daljeg ispitivanja i čuvane na sobnoj temperature (oko 25°C). Za vreme čuvanja nije primećena precipitacija CBZ.

### **9.1.2.4. Reološka karakterizacija SMEDDS formulacije**

Ispitivano je reološko ponašanje odabrane SMEDDS formulacije sa i bez lekovite supstance pri različitim udelima vode (10, 20, 30, 40, 50 i 60 % (m/m)), korišćenjem Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) rotacionog reometra sa Z3 DIN cilindrom za ispitivanje tečnih formulacija i MP 50 dodatkom (dijametar dodatka 12 mm, 1° ugao, ploča/ploča rastojanje 50 µm) za ispitivanje polučvrstih sistema. Udeli vode su odabrani na osnovu uočenih faznih prelaza sistema prilikom titracije sa vodom. Ispitivano je reološko ponašanje formiranih faza pri različitim udelima vode kao i uticaj karbamazepina na tačku prelaza i reološke karakteristike formiranih sistema. Ukupno je pripremljeno 12 različitih formulacija 24 h pre reološkog merenja (Tabela 9.2).



**Tabela 9.2 - Sastav uzoraka za reološku karakterizaciju SMEDDS formulacije bez i sa karbamazepinom u % (m/m)**

	Uzorci bez CBZ						Uzorci sa CBZ					
	A	B	C	D	E	F	A*	B*	C*	D*	E*	F*
Voda % (m/m)	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
Mygliol® 812 % (m/m)	18,0	16,0	14,0	12,0	10,0	8,0	17,4	15,5	13,5	11,6	9,7	7,7
Polysorbat 80/ Cremophor® RH 40 % (m/m)	72,0	64,0	56,0	48,0	40,0	32,0	69,6	61,8	54,1	46,4	38,6	30,9
CBZ % (m/m)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	2,7	2,4	2,0	1,7	1,3

\* SMEDDS sadrži rastvoreni CBZ 3,37 % (m/m)

Napon smicanja je meren u opsegu brzina smicanja od 0 do  $20 \text{ s}^{-1}$  i  $20$  do  $0 \text{ s}^{-1}$  na  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pri karakterizaciji uzoraka korišćene su vrednosti dinamičkog viskoziteta  $\eta$  ( $\text{Pa} \times \text{s}$ ). Dobijene krive zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja su fitovane prema Njutnovskom, Bingamovom i Ostvaldovom (*Power Law*) modelu proticanja, korišćenjem softvera US 200 koji je integralni deo reometra.

#### **9.1.2.5. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije**

Fotonska korelaciona spektroskopija služi za određivanje veličine prečnika kapi unutrašnje faze koje se formiraju prilikom razblaživanja SMEDDS sistema sa i bez CBZ, vodom (sadržaj vode 95 % (m/m)). Veličina prečnika kapi je određena korišćenjem Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija) uređaja sa He-Ne laserom na 633 nm pri temperaturi od  $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Merenje je izvršeno pod fiksnim uglom od  $90^\circ$ . Iz raspodele intenziteta, korišćenjem softvera za statističku analizu podataka, izračunata je prosečna vrednost prečnika kapi (*Z-Ave*), kao i indeks polidisperznosti (*PdI*). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost i standardna devijacija tri uzastopna merenja svakog uzorka.

#### **9.1.2.6. Priprema čvrstih SMEDDS sistema (SSMEDDS)**

Odgovarajući SMEDDS/adsorbens odnosi za izradu ispitivanih SSMEDDS sistema odabrani su na osnovu titracije adsorbensa sa tečnom SMEDDS formulacijom, pri čemu se tačka na kojoj sistem postaje intenzivno lepljiv i gubi karakteristike praška smatra krajnjom tačkom titracije. Za adsorbense Neusilin<sup>®</sup> FL2, Sylysia<sup>®</sup> 320 i Sylysia<sup>®</sup> 350 krajnja tačka titracije je iznosila malo više od 1g za 1 g adsorbensa, dok je za adsorbens Neusilin<sup>®</sup> UFL2 krajnja tačka titracije bila nešto više od 2 g tečne SMEDDS za 1 g praška.

SSMEDDS formulacije bez CBZ (M) kao i SSMEDDS formulacije sa CBZ (MC) izrađene su postupkom direktne adsorpcije. Odabrana tečna SMEDDS formulacija bez i sa CBZ je dodavana kap po kap na 1g svakog adsorbensa ponaosob (Neusilin<sup>®</sup> UFL2, Neusilin<sup>®</sup> FL2, Sylysia<sup>®</sup> 320 i Sylysia<sup>®</sup> 350), uz blago mešanje, dok nije postignut odnos

SMEDDS/adsorbens 1:1. Takođe izrađena je i SSMEDDS formulacija sa SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnosom 2:1. Sastav SSMEDDS formulacija sa CBZ prikazan je u Tabeli 9.3.

**Tabela 9.3 – Sastav čvrstih samomikroemulgujućih formulacija (SSMEDDS)**

<b>SMEDDS (CBZ 3,37 % (m/m))</b>	<b>Vrsta adsorbensa</b>	<b>Odnos adsorbens/SMEDDS</b>	<b>Oznaka uzorka</b>
polisorbat 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje	Neusilin <sup>®</sup> UFL2	1/1	MC NUFL2
		1/2	MC2 NUFL2
(C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O), SC/O odnos 8/2 sa CBZ rastvorenim u smeši	Neusilin <sup>®</sup> FL2	1/1	MC NFL2
	Sylsia <sup>®</sup> 320	1/1	MC SYL 320
	Sylsia <sup>®</sup> 350	1/1	MC SYL 350

Nakon izrade dobijeni praškovi su ostavljeni 24 h na sobnoj temperaturi (oko 25°C) pre daljeg ispitivanja. Izrađene su i fizičke smeše CBZ i adsorbenasa jednostavnim mešanjem karbamazepina i adsorbenasa u tarioniku pomoću pistila. Za ispitivanje brzine rastvaranja CBZ iz ispitivanih formulacija, dobijeni praškovi su punjeni u kapsule.

#### **9.1.2.7. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije**

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je sprovedena korišćenjem Shimadzu DSC-50 (Shimadzu Korporacija, Japan). Tačno odmerena količina ispitivanog uzorka (2 – 5 mg) je stavljena u perforirani aluminijumski lončić i skenirana u temperaturnom opsegu od 20 – 220 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min i brzini protoka azota od 50 ml/min,

praćenjem eventualnih termalnih promena u uzorku. Instrument je kalibrisan za temperaturu i energiju korišćenjem indijumskih standarda.

#### **9.1.2.8. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom**

Spektri infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) dobijeni su skeniranjem polaznih materijala i čvrstih formulacija u opsegu talasnog broja 600–4000  $\text{cm}^{-1}$  korišćenjem Shimadzu IR-Prestige-21 FT-IR spektrometra udruženog sa horizontalnim Golden Gate MKII ATR sistemom sa jednostrukom refleksijom (Specac, Velika Britanija) i Zn Se sočivom, nakon adekvatne supstrakcije šuma pozadine. Svaki spektar predstavlja prikaz srednjih vrednosti intenziteta od 32 skeniranja, pri rezoluciji snimanja od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **9.1.2.9. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina (CBZ) iz SSMEDDS formulacija**

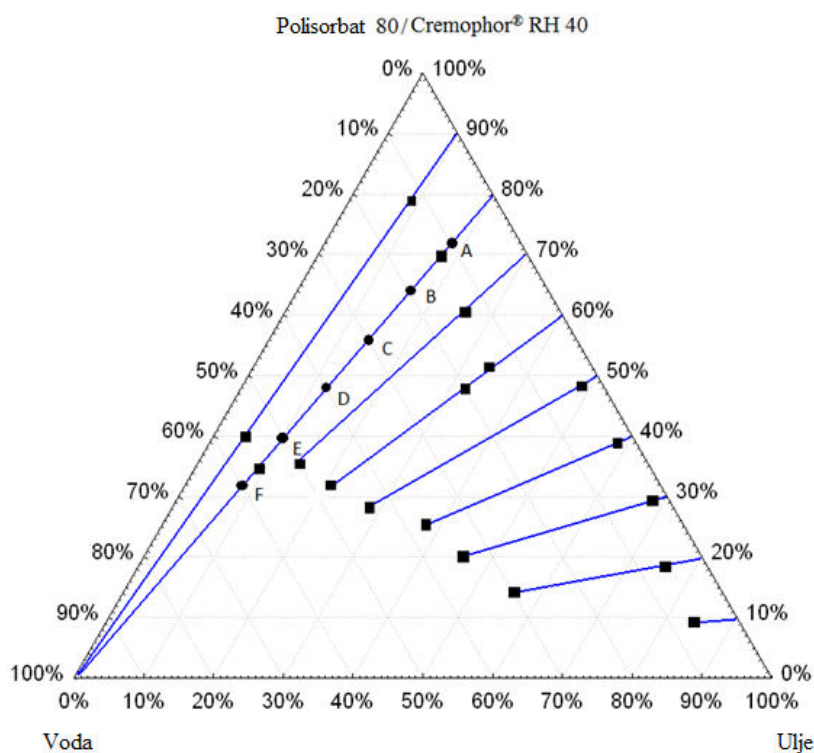
Profili brzine rastvaranja CBZ iz različitih SSMEDDS formulacija kao i fizičkih smeša i čistog karbamazepina su dobijeni korišćenjem Erweka DT70 (Hausenstamm, Nemačka) aparata sa rotirajućim korpicama i čašama malog volumena. Kao medijum je korišćena 0,1 M HCl. Uslovi rada su: temperatura medijuma  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , volumen medijuma 300 ml, brzina okretanja rotirajućeg elementa 100 o/min. Uzorci od 4 ml su uzimani su u tačno definisanim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta). Nakon uzorkovanja ista zapremina svežeg medijuma je vraćena u sistem. *Sink* uslovi su održavani svo vreme trajanja ispitivanja. Svi uzorci su filtrirani korišćenjem 0,45  $\mu\text{m}$  MF-Millipore® membranskog filtera (Millipore Corporation, SAD) pre daljeg analiziranja. Koncentracija CBZ je određena spektrofotometrijski na 285 nm korišćenjem spektrofotometra Evolution 300 (Termo Fisher Scientific, Engleska) spektrofotometra, prilikom čega su za izračunavanje procenta rastvorenog karbamazepina, u određenom vremenskom intervalu, kao slepa proba uzete u obzir vrednosti apsorbcije odgovarajućeg SSMEDDS sistema bez CBZ u tačno definisanom intervalu uzorkovanja, kao i količina CBZ koja je uklonjena iz sistema predhodnim uzorkovanjem. Ispitivanje brzine rastvaranja je vršeno u triplikatu i

vrednosti procenta rastvorenog karbamazepina u zavisnosti od vremena su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.

## 9.2. Rezultati i diskusija

### 9.2.1. Fazno ponašanje pseudoternernog sistema i odabir SMEDDS formulacije

Pseudoternerni fazni dijagram voda/polisorbat 80 (S)/Cremophor<sup>®</sup> RH 40 (C) /trigliceridi srednje dužine lanca (O) kvaternarnog sistema pri konstantnoj  $K_m$  vrednosti je prikazan na Slici 9.1.



Slika 9.1 - Pseudoternerni fazni dijagram sa mikroemulzionim regionom voda/polisorbat 80/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje/trigliceridi srednje dužine lanca sistema pri vrednosti  $K_m$  1:1. Prvi simbol duž linije razblaženja (■) označava tačku u kojoj prestaje da postoji V/U mikroemulzija. Poslednji simbol (■) duž linije razblaženja označava formiranje U/V mikroemulzije. Nepostojanje linije nakon simbola (■) ukazuje na formiranje mlečno bele emulzije. Simbol (●), A-F, predstavlja sastav sistema koji su odabrani za reološka merenja.

Li i saradnici su pokazali da prilikom formiranja mikroemulzija kombinacija dva nejonska surfaktanta pri  $K_m$  odnosu 1:1 može biti značajno efikasnija u odnosu na pojedinačan nejonski surfaktant (Li i sar., 2005). Ispitivanje faznog ponašanja smeša lipidnih ekscipijenasa sa SC/O odnosom od 9:1 do 1:9 titriranjem kap po kap sa vodom, može poslužiti za utvrđivanje koncentracija vode, ulja i surfaktant/kosurfaktant smeše pri kojima se formira stabilna, transparentna, nisko viskozna mikroemulzija. Za sisteme sa SC/O odnosom 9:1 i 8:2 nije primećena značajna razlika u faznim promenama. Sa dodatkom prvih kapi vode ovi sistemi formiraju transparentnu, nisko-viskoznu V/U mikroemulziju, sve dok sadržaj vode V % (m/m) nije 12,1 odnosno 12,5 za sisteme sa SC/O odnosom 9:1 odnosno 8:2 (Slika 9.1). Daljim dodavanjem vode, viskozitet ovih sistema naglo raste, ali ostaju transparentni. Ovo može da ukaže da pri ovim SC/O odnosima sadržaj ulja (% (m/m)) nema značajan uticaj na početak fazne promene sistema. Daljim dodavanjem vode formira se transparentna, jako viskozna gelska faza. Gelska faza postoji sve dok sadržaj vode ne bude V % (m/m) 54,41 odnosno 55,32 za sisteme sa SC/O odnosom 9:1 odnosno 8:2 (Slika 9.1) kada ovi sistemi vrlo brzo se transformišu u nisko viskozne, transparentne U/V mikroemulzije, što je potvrđeno centrifugiranjem uzoraka korišćenjem Tehnica lc 320, (Zelezniki, Slovenija) centrifuge na 4000 o/min tokom 15 min pri čemu nije došlo do razdvajanja faza.

Slične rezultate dobili su i Fehér i saradnici ispitivanjem sistema koji sadrži 80 % Cremophor® RH 40 i 20 % Mygliol® 810 (Fehér i sar., 2008). Ponašanje sistema sa SC/O odnosom 7:3 odnosno 6:4 prilikom kontinuiranog dodavanja vode je slično, ali glavna razlika u odnosu na predhodno pomenute sisteme je što se daljim dodavanjem vode gelska faza prelazi u belu U/V emulziju. Takođe sistem sa SC/O odnosom 6:4 počinje da formira belu gelsku fazu pri sadržaju vode od 18,65 % (m/m).

Glavni razlozi za odabir SMEDDS sistema sa SC/O odnosom 8:2 je viši sadržaj uljane i manji sadržaj surfaktant/kosurfaktant faze radi izbegavanja eventualne iritacije GIT zbog visoke koncentracije PAM.

### 9.2.2. Rastvorljivost CBZ

Rastvorljivost karbamazepina je predstavljena u Tabeli 9.4.

**Tabela 9.4 - Rastvorljivost karbamazepina u odabranim ekscipijensima i medijumima**

<i>Medijum</i>	0.1 M HCl	Mygliol <sup>®</sup> 812	Polisorbat 80	SMEDDS
<i>Rastvorljivost CBZ (µg/ml) ± S.D</i>	122,23 ± 1,90	2758 ± 21,03	40055 ± 32,11	33771 ± 41,05

Rastvorljivost CBZ je ispitivana u cilju utvrđivanja kapaciteta solubilizacije SMEDDS sistema, SC/O odnos 8:2, za CBZ. Samo SMEDDS formulacija sa maksimalnom količinom rastvorenog CBZ je dalje ispitivana. Rastvorljivost karbamazepina je ispitivana i u tečnim ekscipijensima kako bi se utvrdio njihov kapacitet solubilizacije. Prema podacima prikazanim u Tabeli 9.4 može se zaključiti da je rastvorljivost CBZ najveća u Polisorbatu 80, čak 328 puta veća nego u 0.1 M HCl i 14,52x veća nego u Mygliol<sup>®</sup> 812 ulju. Sličnu rastvorljivost karbamazepina u 0,1 M HCl su prijavili su i Bhise i Rajkumar, 115 ± 1,7 µg/ml (Bhise and Rajkumar, 2010). Niža rastvorljivost CBZ u Mygliol<sup>®</sup> 812 ulju u odnosu na rastvorljivost CBZ u polisorbatu 80 ukazuje da je za visok kapacitet solubilizacije tečne SMEDDS formulacije za CBZ najverovatnije odgovoran polisorbat 80. Rastvorljivost CBZ u Cremophor<sup>®</sup> RH 40 nije ispitana zbog polučvrste konzistencije ovog lipidnog ekscipijensa.

### 9.2.3. Reološka karakterizacija SMEDDS formulacije

U cilju definisanja faznih promena odabranog SMEDDS sistema (formulacija F8 Tabela 9.1, SC/O odnos 8:2), koje se dešavaju pri kontinuiranom dodavanju vode, kao i razumevanja uticaja CBZ na njih, ispitivano je reološko ponašanje šest različitih uzoraka bez CBZ (M), kao i šest različitih uzoraka sa CBZ (CM). Reološka merenja su vršena na ispitivanom SMEDDS sistemu bez i sa CBZ, pri čemu su ispitivani uzorci imali različiti

udeo vode, V % (m/m), od 10 do 60 % (m/m), sa delom od 10 % (m/m), što čini ukupno 12 različitih formulacija (formulacije A – F i A\* - F\* prikazane u Tabeli 9.2). Postepeno dodavanje vode odabranom SMEDDS sistemom dovodi do porasta viskoziteta i formiranja strukture slične gelu. Sadržaj vode nije dodavan preko 60 % (m/m) zato što sa dodavanjem vode preko 55 % (m/m) (Slika 9.1) dolazi do naglog pada viskoziteta, narušavanja predhodno formirane strukture i formiranja nisko viskoznih, transparentnih U/V mikroemulzija.

Sadržaj dodate vode je računat prema jednačini (Jednačina 9.1):

$$V \% (m/m) = (m_v / (m_v + m_o + m_s + m_{cos} + m_{cbz})) \times 100 \quad (\text{Jednačina 9.1})$$

gde  $m_v$ ,  $m_o$ ,  $m_s$ ,  $m_{cos}$  and  $m_{cbz}$  predstavljaju masu vode, surfaktanta, kosurfaktanta i CBZ.

Svi uzorci su ispitivani 24 h nakon pripreme kako bi se struktura stabilizovala. Zbog formiranja strukture slične gelu, pri sadržaju vode do oko 55 % (m/m), neophodno je ostaviti uzorke da odstoje kako bi se uspostavile i stabilizovale sve potencijalne interakcije. Reološko merenje uzoraka pokazalo je da dinamički viskozitet ispitivanih sistema  $\eta$  (Pa x s) u velikoj meri zavisi od udela vode V% (m/m). Formiranju viskozne gelske faze prilikom kontinuiranog dodavanja vode u velikoj meri doprinosi Cremophor<sup>®</sup> RH 40, što je takođe pokazano i u Labrasol<sup>®</sup>/Cremophor<sup>®</sup>RH 40/ulje/voda sistemima (Zhang i sar., 2004).

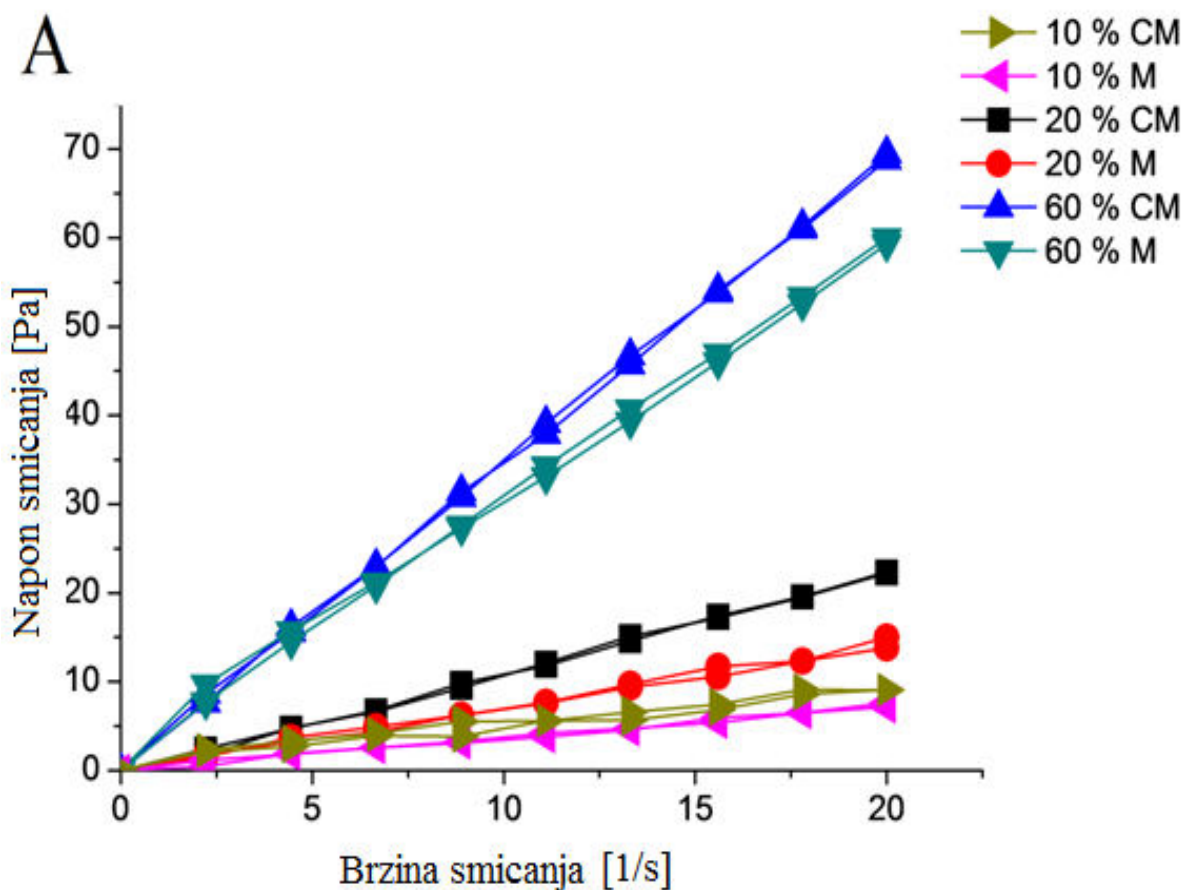
Tip proticanja, kao i vrednosti dinamičkog viskoziteta i koeficijenta korelacije za sisteme sa i bez CBZ sa 10, 20, 50 and 60 % V (m/m) su prikazani u Tabeli 9.5



**Tabela 9.5 - Viskozitet i tip proticanja formulacija za reološko karakterizaciju SMEDDS formulacije sa i bez CBZ sa sadržajem vode % V (m/m) = 10, 20, 50 i 60 %**

	Uzorci bez CBZ				Uzorci sa CBZ			
	M (A)	M (B)	M (E)	M (F)	CM (A)	CM (B)	CM (E)	CM (F)
Voda % (m/m)	10,0	20,0	50,0	60,0	10,0	20,0	50,0	60,0
$\eta$ (Pa*s)	0,697	3,122	2040	0,361	1,055	3,289	2050	0,390
			pri $\gamma = 2,22s^{-1}$				pri $\gamma = 2,22s^{-1}$	
R(x,y)	0,998	0,994	0,997	0,997	0,998	0,999	0,994	0,990
Jednačina	$\tau = \eta\gamma$	$\tau = \eta\gamma$	$y = a*x^b$ a=3732,3 b= 0,224	$\tau = \eta\gamma$	$\tau = \eta\gamma$	$\tau = \eta\gamma$	$y = a*x^b$ a=3862,6 b= 0,208	$y = a + b*x$ a = 1,5427 b = 0,39024
Tip proticanja	Njutnovski	Njutnovski	Ostvaldov	Njutnovski	Njutnovski	Njutnovski	Ostvaldov	Bingamov

Uzorci A, B i D bez CBZ sa 10, 20 i 60 % V (m/m), kao i uzorci A\* i B\* sa CBZ sa 10 i 20 % vode V (m/m) (Tabela 9.2) su pokazali tipičan Njutnovski tip proticanja, sa linearnim odnosom napona smicanja ( $\tau$ ) i brzine smicanja ( $\dot{\gamma}$ ), koji predstavlja najčešći tip proticanja za mikroemulzije (Kumar i Mittal, 1999; Poul i Moulik, 2000) (Slika 9.2A, Tabela 9.5).

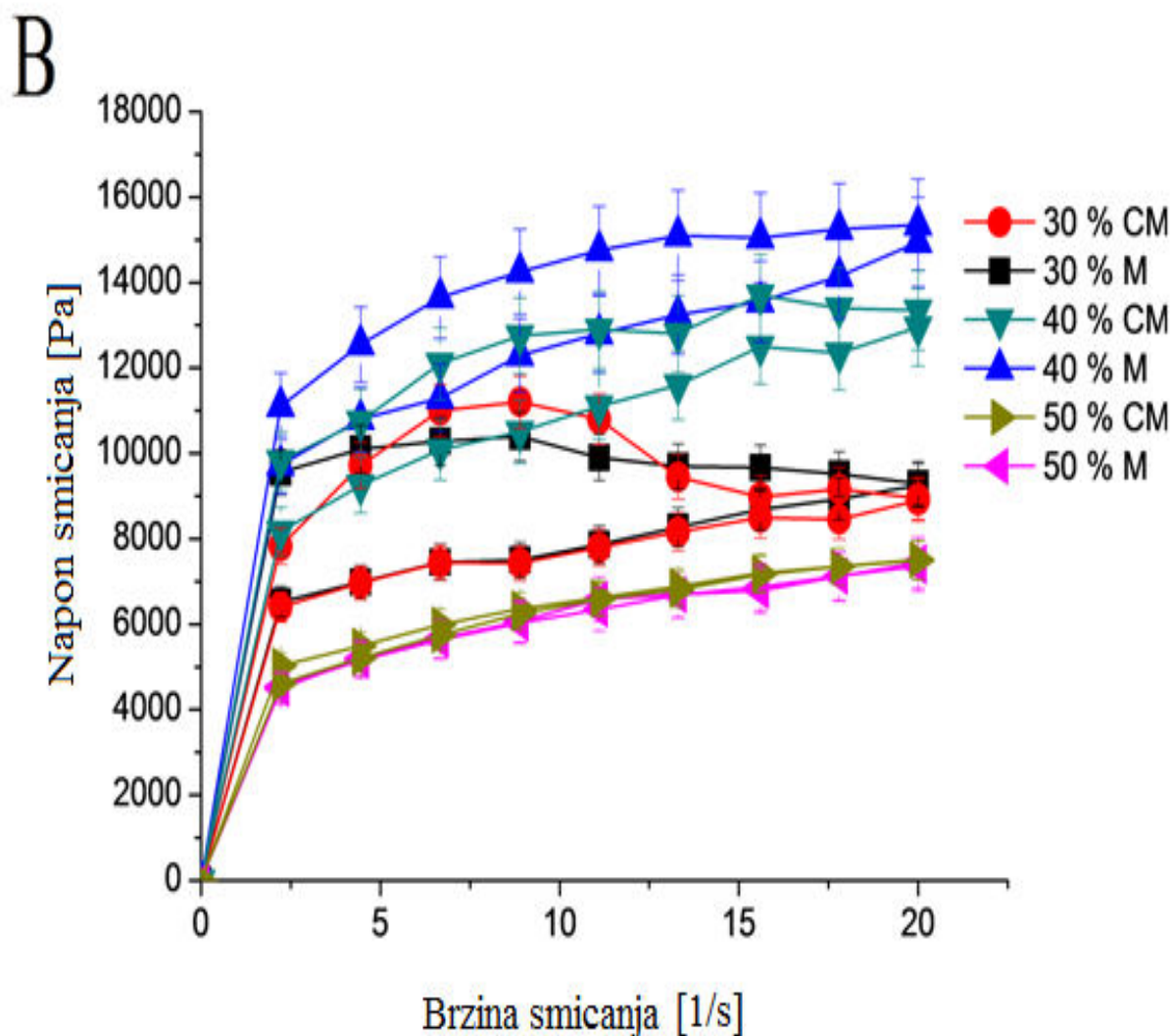


Slika 9.2A - Zavisnost napona smicanja ( $\tau$ ) od brzine smicanja ( $\dot{\gamma}$ ) za voda(V)/polisorbitat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednjeduzine lanca (O) sisteme, SC/O odnos 8:2,  $K_m$  1:1, sa 10, 20 i 60 % V (m/m). *M* – uzorak bez CBZ; *CM* - uzorak sa CBZ.

Uzorci A\* i B\* sa CBZ (Tabela 9.2) sa  $V \text{ \% (m/m)} = 10$  i  $20 \text{ \%}$  pokazuju nešto više vrednosti dinamičkog viskoziteta u odnosu na uzorke A i B koji su bez CBZ (Slika 9.2A, Tabela 9.5). Ova pojava se može objasniti time što su molekuli CBZ, koji poseduju malu hidrofilnu glavu i relativno veliki hidrofobni rep, u polarnom medijumu predominantno solubilizovani na ulje/voda međupovršini utičući na geometriju formiranih kapi. Takođe, molekuli CBZ verovatno povećavaju intenzitet interakcija među kapima što doprinosi povećanju viskoziteta. Ovaj zaključak podržavaju rezultati ranije studije u kojoj je pokazan pozitivan uticaj CBZ na viskozitet u [voda/PG]/[R-(+)-limonen/EtOH]/[Tween 60] sistemu do  $15 \text{ \% (m/m)}$  sadržaja vode (Kogan i sar., 2007).

Ispitivani uzorak F\* sa CBZ (Tabela 9.2) koji sadrži  $60 \text{ \% V (m/m)}$ , za razliku od odgovarajućeg uzorka bez CBZ, koji je pokazao Njutnovski tip proticanja, je pokazao Bingamov tip proticanja (Tabela 9.5). Bingamov tip proticanja karakteriše linearna zavisnost napona smicanja ( $\tau$ ) od brzine smicanja ( $\gamma$ ) nakon inicijalnog praga napona smicanja (napon popuštanja) ( $\tau_0$ ) (Tabela 9.5). Primećena razlika u reološkom ponašanju uzoraka sa i bez CBZ pri  $60 \text{ \% V (m/m)}$  može se objasniti postojanjem privlačnih interaktivnih sila između polioksietilenskih lanaca polisorbata 80, Cremophor<sup>®</sup> - a RH 40 i hidrofilne glave molekula CBZ.

Uzorci sa  $30$  i  $40 \text{ \% V (m/m)}$  su pokazali tiksotropno ponašanje (Slika 9.2B)



Slika 9.2B - Zavisnost napona smicanja ( $\tau$ ) od brzine smicanja ( $\dot{\gamma}$ ) za voda(V)/polisorbit 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) sisteme, SC/O odnos 8:2,  $K_m$  1:1, sa 30, 40 i 50 % V (m/m). *M* – uzorak bez CBZ; *CM* – uzorak sa CBZ.

Uzorci sa i bez CBZ sa 30 i 40 % V (m/m) formiraju viskoznu gelsku fazu koja pokazuje tiksotropiju (Slika 9.2B). Ipak uzorci sa CBZ pokazuju niže vrednosti dinamičkog viskoziteta (Tabela 9.5). Najverovatniji razlog nastanka primećene pojave je da se pri ovim koncentracijama CBZ ponaša kao kosurfaktant i „povlači“ molekule

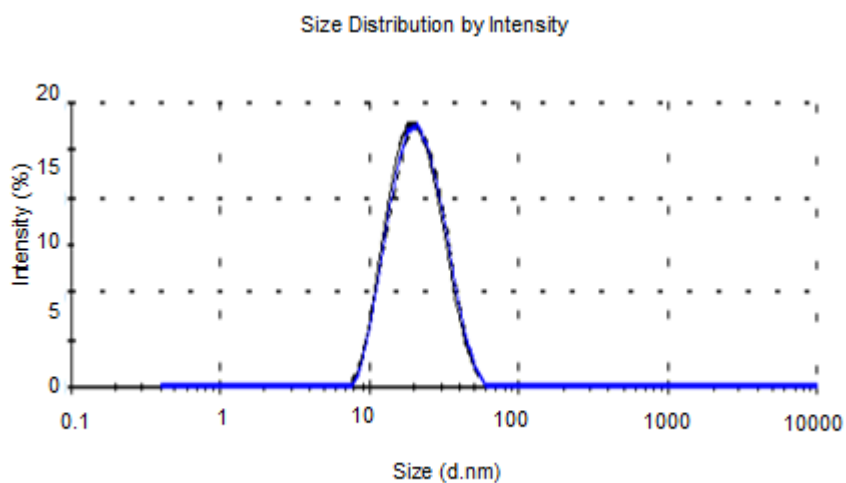
surfaktanta prema međupovršini, pritom uzorkujući blagi disbalans u gelskoj mreži, što za posledicu ima manji viskozitet. U poređenju sa uzorcima sa 30 i 40 % V (m/m), u opsegu brzina smicanja od 0 – 20 s<sup>-1</sup>, uzorci bez i sa CBZ sa 50 % V % (m/m) pokazuju oštar pad viskoziteta i Ostvaldov tip proticanja (Tabela 9.5). Ovo ukazuje da su kapi unutrašnje faze asimetričnog oblika i da se prilikom izlaganja većem naponu smicanja, ove kapi orijentišu na način koji dovodi do smanjenja viskoziteta. Predhodno objavljeni rezultati studije (Zhang i sar., 2004) u kojoj je pokazano formiranje mikroemuzije iz izotropne gelske faze u sistemu voda/Cremophor<sup>®</sup> RH 40/Mygliol<sup>®</sup> 810, pri dodatku vode iznad 50 % (m/m), pokazuju sličnost sa dobijenim rezultatima.

#### 9.2.4. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije

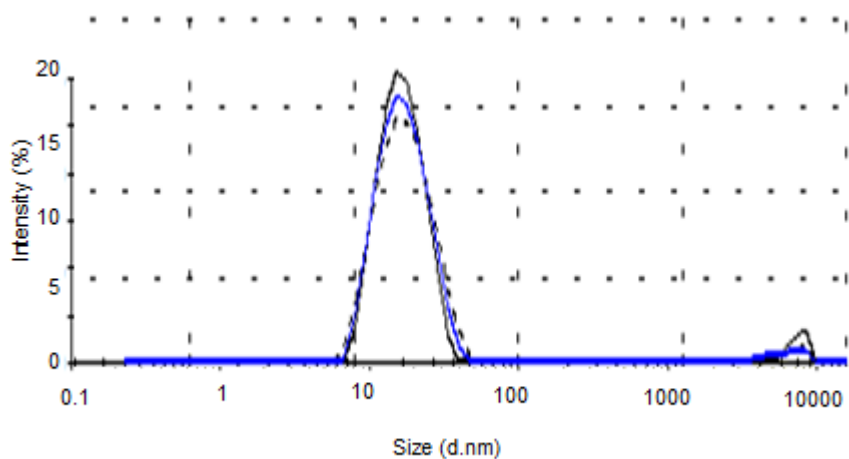
Prosečna veličina prečnika kapi odabrane SMEDDS formulacije bez i sa CBZ pri sadržaju vode od V % (m/m) = 95 % predstavljena je u Tabeli 9.6 i na Slici 9.3A; B. Može se tvrditi da pri velikim razblaženjima sa vodom ispitivani SMEDDS sistem bez i sa CBZ može da formira U/V mikroemuzije, jer je veličina prečnika kapi unutrašnje faze manji od 50 nm (Gursoy and Benita, 2004). Ispitivani sistem je pokazao monomodalnu raspodelu veličine kapi bez obzira da li sadrži CBZ ili ne (Slika 9.3.A; B).

**Tabela 9.6 - Prosečna veličina prečnika kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PdI) mikroemulzije bez CBZ (M) i sa CBZ (CM) pri sadržaju vode V % (m/m) = 95 % (K<sub>m</sub> 1:1; SC/O 8:2)**

	Z-Ave ± S.D.	PdI ± S.D.	Pik 1	Pik 2	Pik 1	Pik 2
			Z-Ave (nm)	Z-Ave (nm)	P Int (%)	P Int (%)
Mikroemulzija bez CBZ (M)	19,33 ±0,126	0,128 ± 0,01	19,33	0	100	0
Mikroemulzija sa CBZ (CM)	19,87 ±0,755	0,203±0,027	21,25	4802	97,5	2,5



**A)**

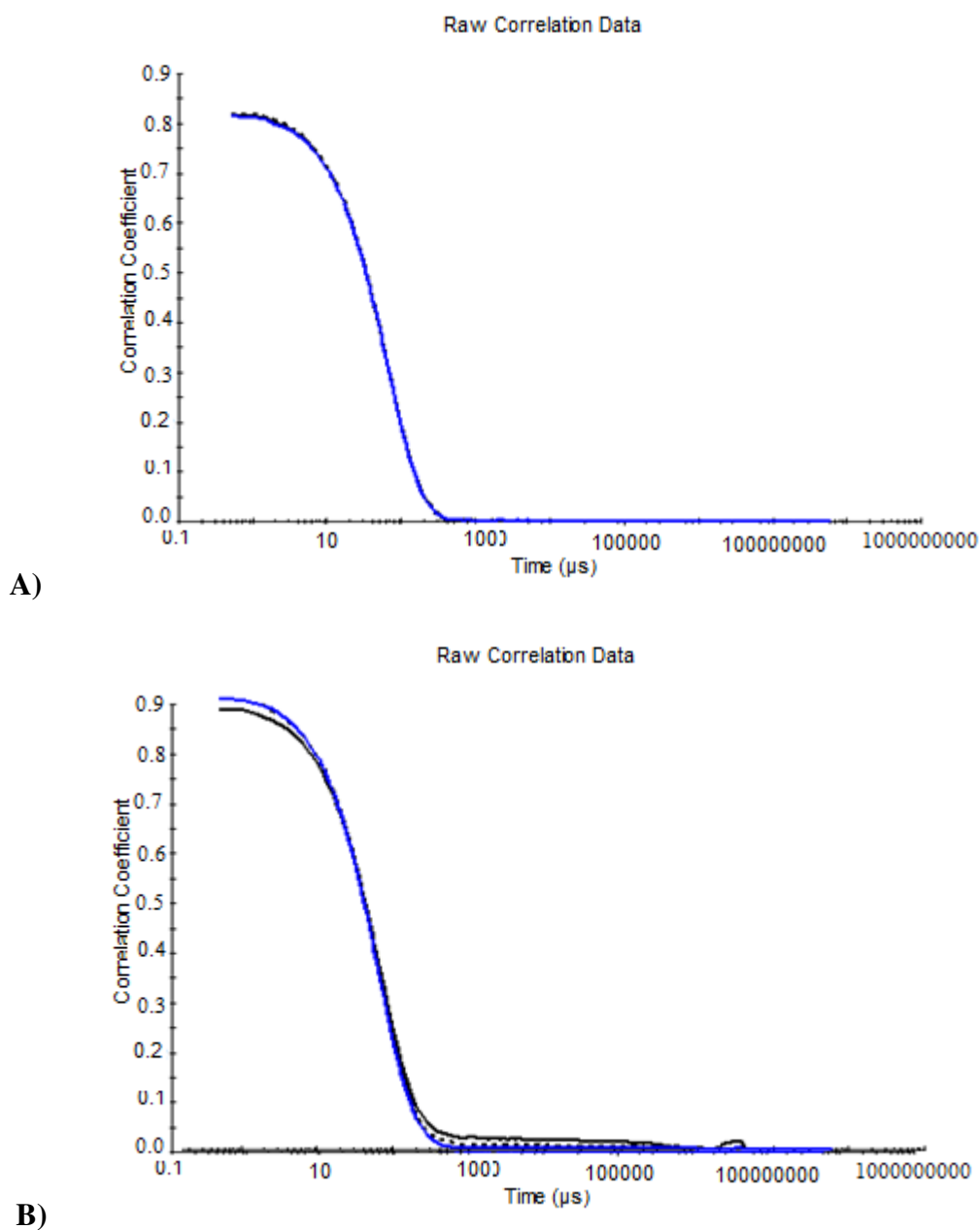


**B)**

Slika 9.3 - Raspodela veličine prečnika kapi<sup>7</sup> prema intenzitetu<sup>8</sup> kod SMEDDS bez CBZ, **(A)**, kao i SMEDDS sistema sa CBZ **(B)**,  $K_m$  1:1;  $SC_s/O$  8:2. Uzorci su mereni pri sadržaju vode  $V \% (m/m) = 95 \%$

<sup>7</sup> Size (d.nm)

<sup>8</sup> Intensity (%)



Slika 9.4 - Korelaciona funkcija<sup>9</sup> kod SMEDDS sistema bez CBZ, **(A)**, kao i SMEDDS sistema sa CBZ **(B)**,  $K_m$  1:1;  $SC_s/O$  8:2. Uzorci su mereni pri sadržaju vode  $V \% (m/m) = 95 \%$

<sup>9</sup> Koeficijent korelacije vs Vreme ( $\mu s$ ) – eng. Correlation function vs Time ( $\mu s$ )

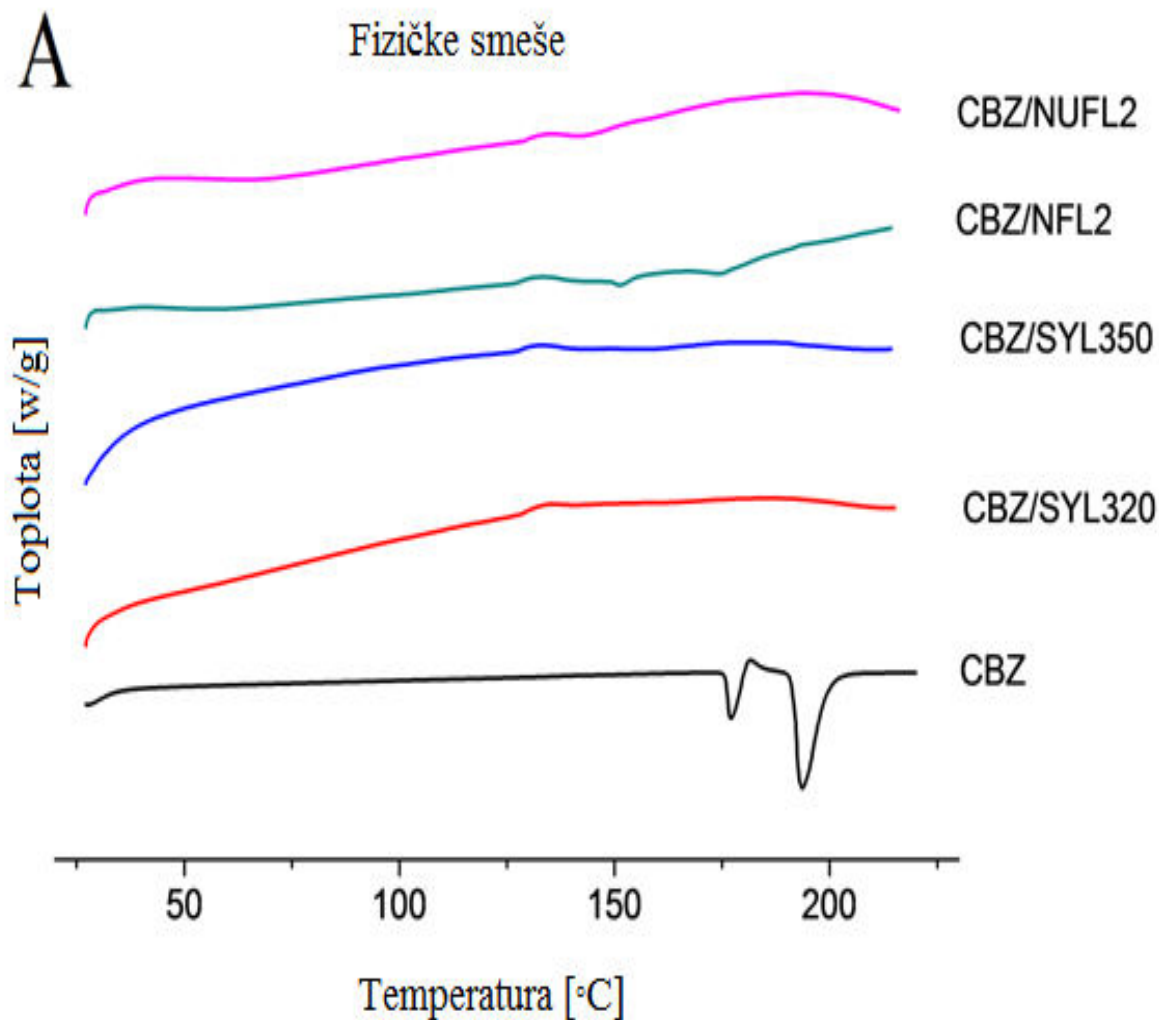
Viša vrednost indeksa polidisperznosti (PdI) u sistemu sa CBZ u odnosu na odgovarajući sistem bez CBZ ( $0.203 \pm 0.027 > 0.128 \pm 0.01$ ) (Tabela 9.6) se može objasniti prisustvom molekula CBZ na međupovršini ulje/voda. Usled male hidrofilne glave i relativno velikog hidrofobnog repa, molekul CBZ poseduje vrednost kritičnog parametra pakovanja,  $CPP > 1$  (eng. *critical Packing Parameter, CPP*). Samim tim, u nepolarnom medijumu CBZ teži da formira reverzne micelle, ali u vodi kao spoljašnjoj fazi, koja predstavlja jako polarni medijum, CBZ najverovatnije ima negativan uticaj na termodinamičku stabilnost sistema (Rosen, 2004), povećavajući fluidnost međupovršinskog filma, dovodeći do šire distribucije veličina prečnika kapi i posledično više vrednosti PdI (Tabela 9.6). U prilog ovome idu i uočene deformacije na zavšnom segmentu bazne linije autokorelacione funkcije (Slika 9.4B) koje ukazuju na prisustvo krupnijih kapi u ispitivanom sistemu, kao i na dešavanje promena u uzorku u toku samog merenja. Ovaj zaključak je u dobroj korelaciji sa činjenicom da, nakon 24 h stajanja na sobnoj temperaturi, sistem sa CBZ, pri  $V \% (m/m) = 95 \%$ , pokazuje znake blage precipitacije lekovite supstance.

### **9.2.5. Karakterizacija SSMEDDS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom**

Pet različitih SSMEDDS formulacija sa CBZ (Tabela 9.3 - SMEDDS/ NUFL2; NFL2; SYL320 i SYL350, 1/1, i SMEDDS/ NUFL2, 2/1) kao i odgovarajuće fizičke smeše CBZ i adsorbensa /12,5 % CBZ (m/m) su okarakterisane DSC i FT-IR analizom u cilju utvrđivanja potencijalne interakcije između CBZ i adsorbensa (Slika 9.5A; B; Slika 9.6A; B). U prisustvu lipidnih sistema, kao što su SMEDDS, a u cilju potvrđivanja određene interakcije između lekovite supstance i adsorbensa, DSC analiza nije pogodna kao jedini vid karakterizacije. Iz tog razloga, kako bi se pokazala efektivna interakcija, DSC analiza je kombinovana sa netermalnom analizom, kao što je FT-IR.



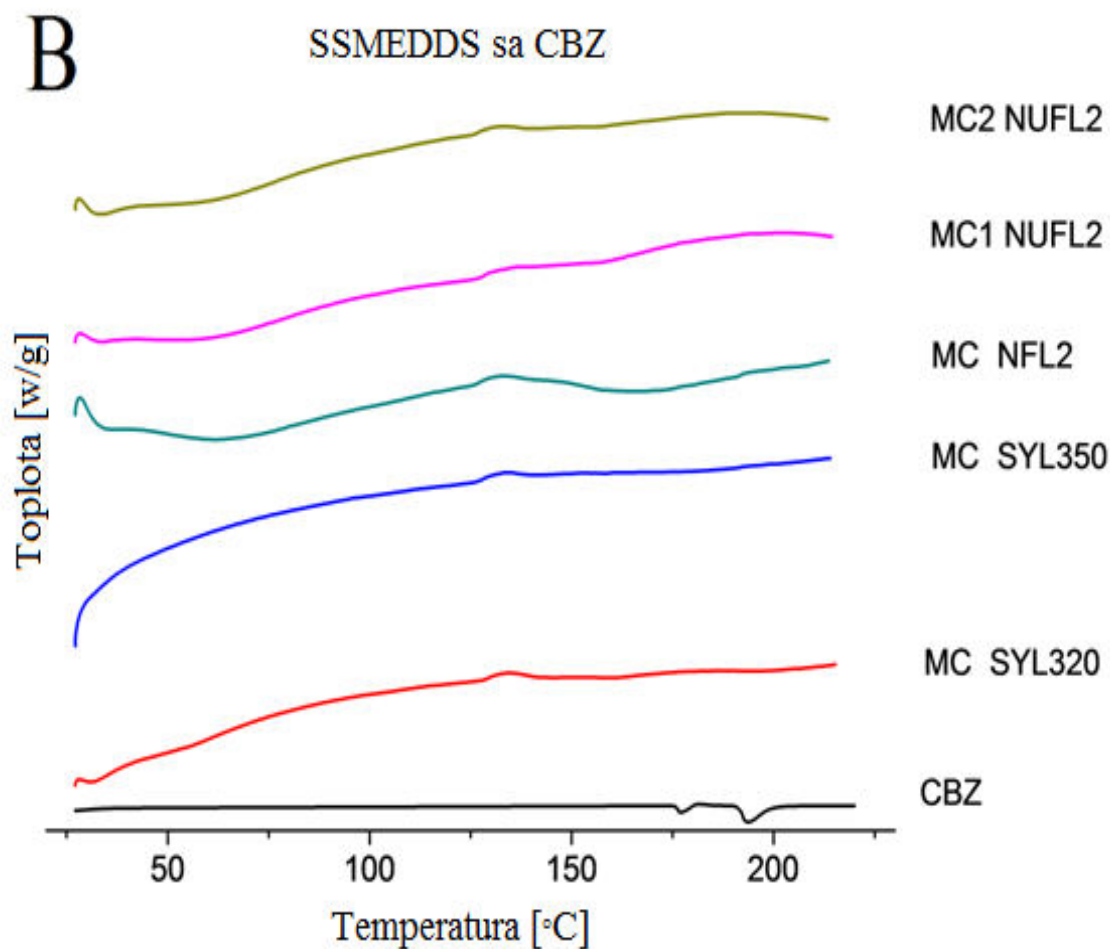
DSC analiza čistog karbamazepina je potvrdila da je prilikom izrade ispitivanih formulacija korišćen P-monokliničan (oblik III) karbamazepina (Slika 9.5 A).



Slika 9.5A - DSC krive čistog karbamazepina i fizičkih smeša karbamazepina i četiri različita adsorbensa, 12,5 % (m/m). CBZ – karbamazepin; NUFL2 - Neusilin<sup>®</sup> UFL2; NFL2 - Neusilin<sup>®</sup> FL2; SYL350 - Sylisia<sup>®</sup> 350; SYL320 - Sylisia<sup>®</sup> 320; Radi boljeg poređenja, 12,5% intenziteta signala od čistog CBZ je korišćeno prilikom poređenja sa intenzitetom signala iz fizičkih smeša

DSC kriva čistog CBZ je pokazala karakterističan pik topljenja na 175,5°C, koji odgovara tački topljenja P – monokliničkog polimorfnog oblika CBZ, a zatim egzotermni

pik rekristalizacije na 181,3°C u CBZ formu I , posle kog je sledio endotermni pik topljenja CBZ forme I na 192,6°C (Slika 9.5A). Slični rezultati DSC analize za CBZ formu III su objavljeni ranije (Kobayashi i sar., 2000; Rustichelli i sar., 2000).



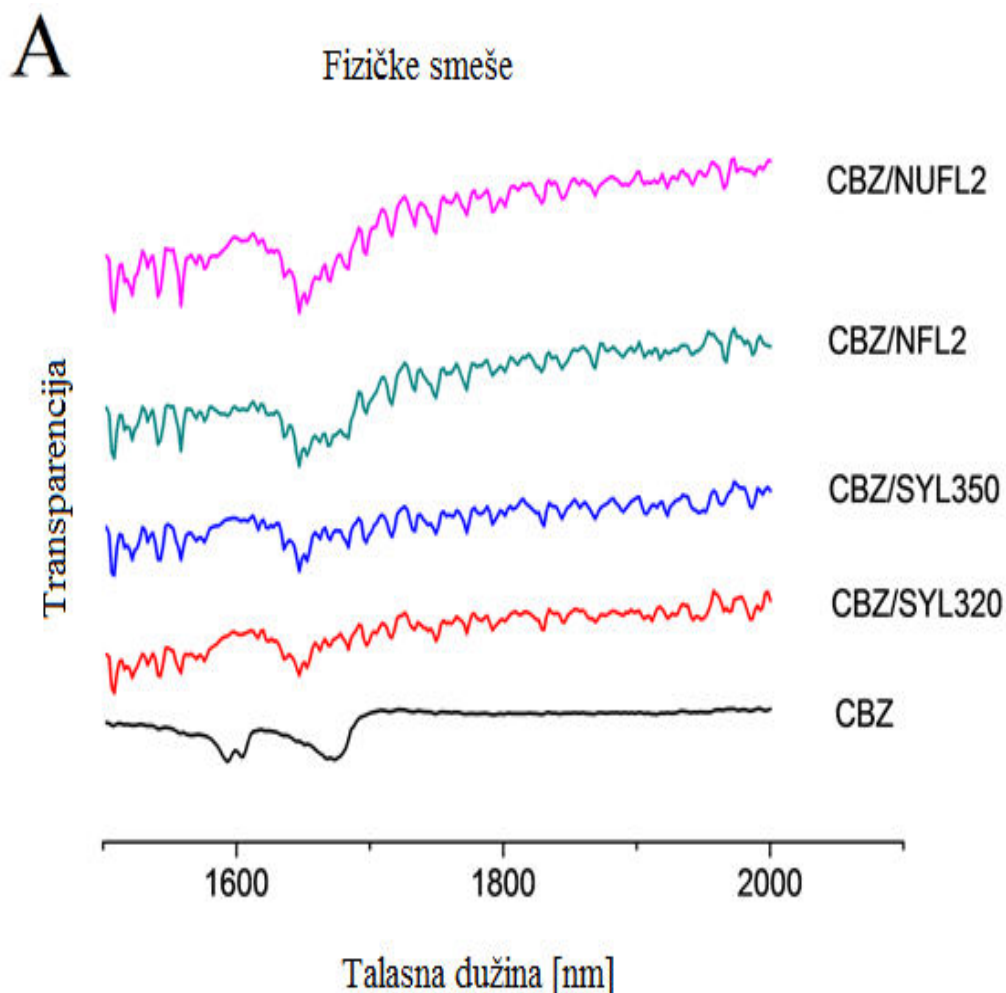
Slika 9.5B - DSC krive čistog CBZ i pet *MC* – SSMEEDDS sa CBZ, SC/O 8:2,  $K_m$  1:1. CBZ – karbamazepin; NUFL2 - Neusilin<sup>®</sup> UFL2; NFL2 - Neusilin<sup>®</sup> FL2; SYL350 - Sylysia<sup>®</sup> 350; SYL320 - Sylysia<sup>®</sup> 320. *MC1* - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 1:1; *MC2* - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 2:1. je korišćeno prilikom poređenja sa intenzitetom signala iz SSMEEDDS formulacije

Prilikom poređenja intenziteta pikova DSC krive fizičkih smeša i čistog CBZ uzeto je 12,5 % signala čistog CBZ (što odgovara sadržaju CBZ u fizičkim smešama). Razlog za to je da ukoliko u fizičkim smešama i budu prisutni pikovi karakteristični za CBZ, oni se mogu upoređivati sa intenzitetom pikova čistog CBZ, prilikom čega se može zaključiti da li je ceo ili samo deo CBZ prešao u amorfni oblik. Nepostojanje pika topljenja CBZ u fizičkim smešama (CBZ/NUFL2; CBZ/NFL2; CBZ/SYL320; CBZ/SYL350) (Slika 9.5A) ukazuje na transformaciju celokupnog CBZ iz CBZ forme III u amorfni oblik (Nair i sar., 2002).

Postepeni prelaz lekovite supstance iz kristalnog u amorfni oblik u fizičkim smešama sa poroznim silika nosačima je i ranije pokazan (Kim i sar., 1985).

Nepostojanje pika topljenja na DSC krivama SSEMEDDS formulacija ukazuje da nakon adsorbovanja SMEDDS formulacije sa CBZ na adsorbens najverovatnije nije došlo do rekristalizacije CBZ (Slika 9.5B). Intenzitet pikova DSC krive ispitivanih SSMEDDS formulacija poređen je sa 1,6885% intenziteta signala iz čistog CBZ (što odgovara sadržaju CBZ u finalnoj formulaciji SSMEDDS sistema sa adsorbens/SMEDDS odnosom 1/1 (Tabela 9.3). Međutim, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je CBZ prisutan u amorfnom obliku, jer se CBZ na povišenim temperaturama, koje se postižu u toku izvođenja DSC analize, potencijalno može rastvoriti u tečnim sastojcima SMEDDS - a. Iz tog razloga je DSC analiza kombinovana sa netermalnom analizom kao što je FT-IR.

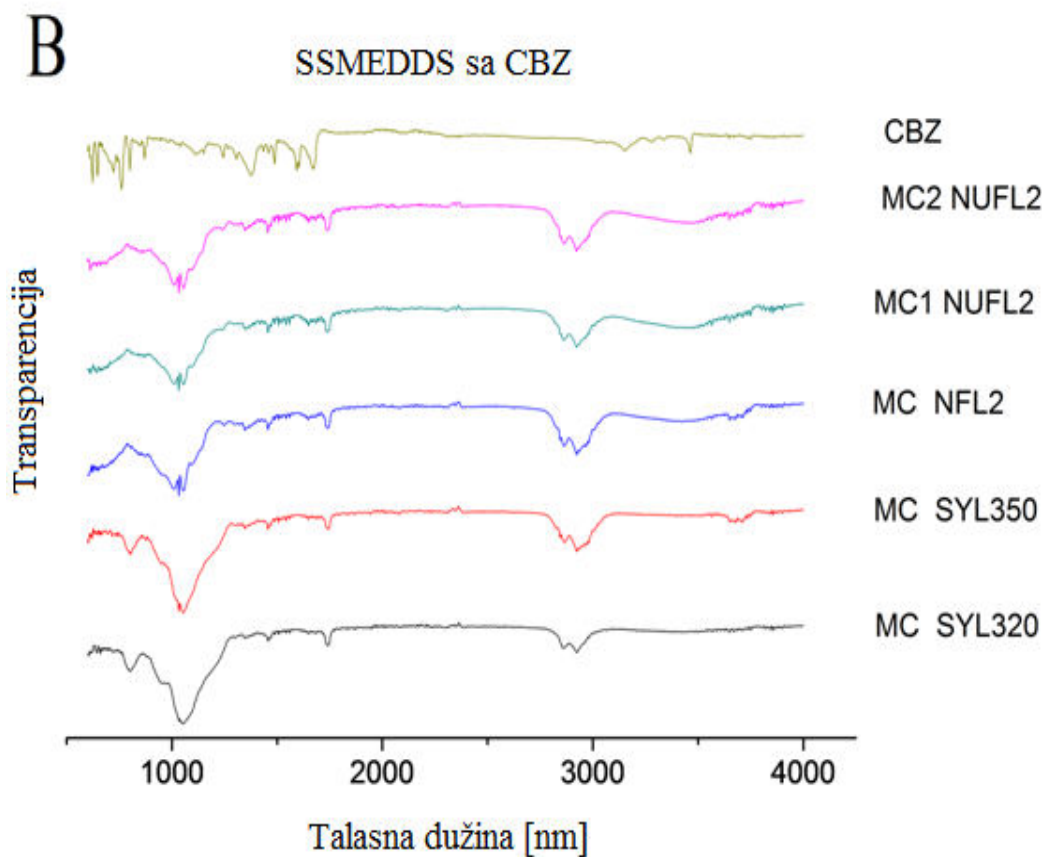
FT-IR spektri čistog CBZ takođe odgovaraju literaturnim podacima (Krahn i Mielck, 1987; Lowes i sar., 1987) za CBZ oblik III (Slika 9.6A). Karakteristični pikovi na  $3463\text{ cm}^{-1}$  (–NH valenciona vibracija),  $1674\text{ cm}^{-1}$  (–CO–R vibracija),  $1605$  i  $1593\text{ cm}^{-1}$  (opseg –C=C– i –C=O vibracije i –NH deformacije) (Slika 9.6A) odgovaraju CBZ formi III. Takođe prilikom poređenja intenziteta pikova FT-IR spektra čistog CBZ i fizičkih smeša uzeto je 12,5 % intenziteta pikova čistog CBZ (Slika 9.6 A).



Slika 9.6A - FT-IR spektri čistog karbamazepina i fizičkih smeša karbamazepina i četiri različita adsorbensa, 12.5 % (m/m). CBZ – karbamazepin; NUFL2 - Neusilin<sup>®</sup> UFL2; NFL2 - Neusilin<sup>®</sup> FL2; SYL350 - Sylysia<sup>®</sup> 350; SYL320 - Sylysia<sup>®</sup> 320; Radi boljeg poređenja, 12,5% intenziteta signala od čistog CBZ je korišćeno prilikom poređenja sa intenzitetom signala iz fizičkih smeša.

Deformacija karakterističnog pika u FT-IR spektrima fizičkih smeša za CBZ formu III na 1605 i 1593  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{C}=\text{O}$  vibracija i  $-\text{NH}$  deformacija) (Slika 9.6A) ukazuje da u formiranju amornog oblika CBZ učestvuje vodonična veza između karbonilne grupe CBZ i silanolne grupe adsorbensa. Deformacija je slabija u fizičkoj smeši sa NFL2 (Slika 9.6A). Može se pretpostaviti da usled manje specifične površine NFL2 ( $150\text{m}^2/\text{g}$ ), u poređenju sa

specifičnom površinom ostala tri adsorbensa (specifična površina NUFL2, SYL320 i SYL350 je  $\approx 300\text{m}^2/\text{g}$ ) i intenzitet interakcije je manji.

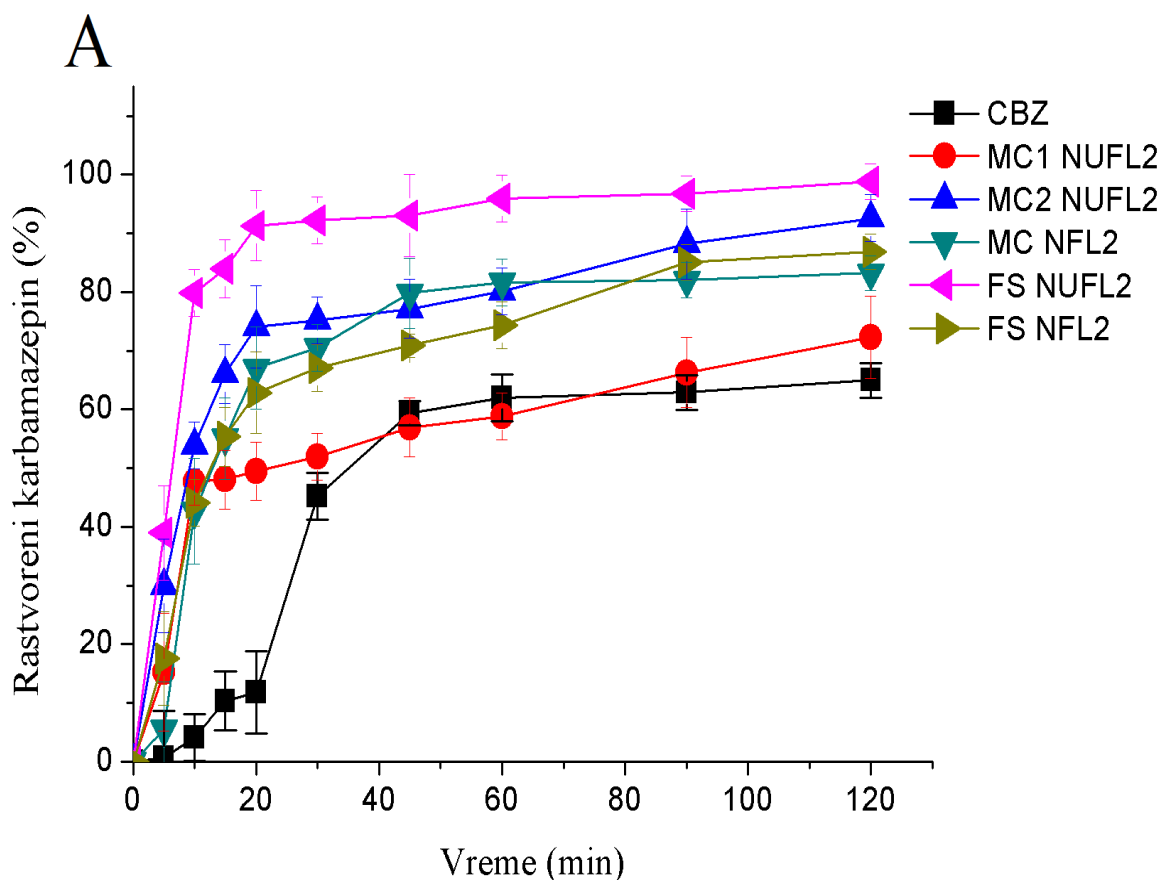


Slika 9.6B - FT-IR spektri čistog CBZ i pet **MC** – SSMEDDS sa CBZ, SC/O 8:2,  $K_m$  1:1. CBZ – karbamazepin; NUFL2 - Neusilin<sup>®</sup> UFL2; NFL2 - Neusilin<sup>®</sup> FL2; SYL350 - Sylysia<sup>®</sup> 350; SYL320 - Sylysia<sup>®</sup> 320. **MC1** - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 1:1; **MC2** - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 2:1.

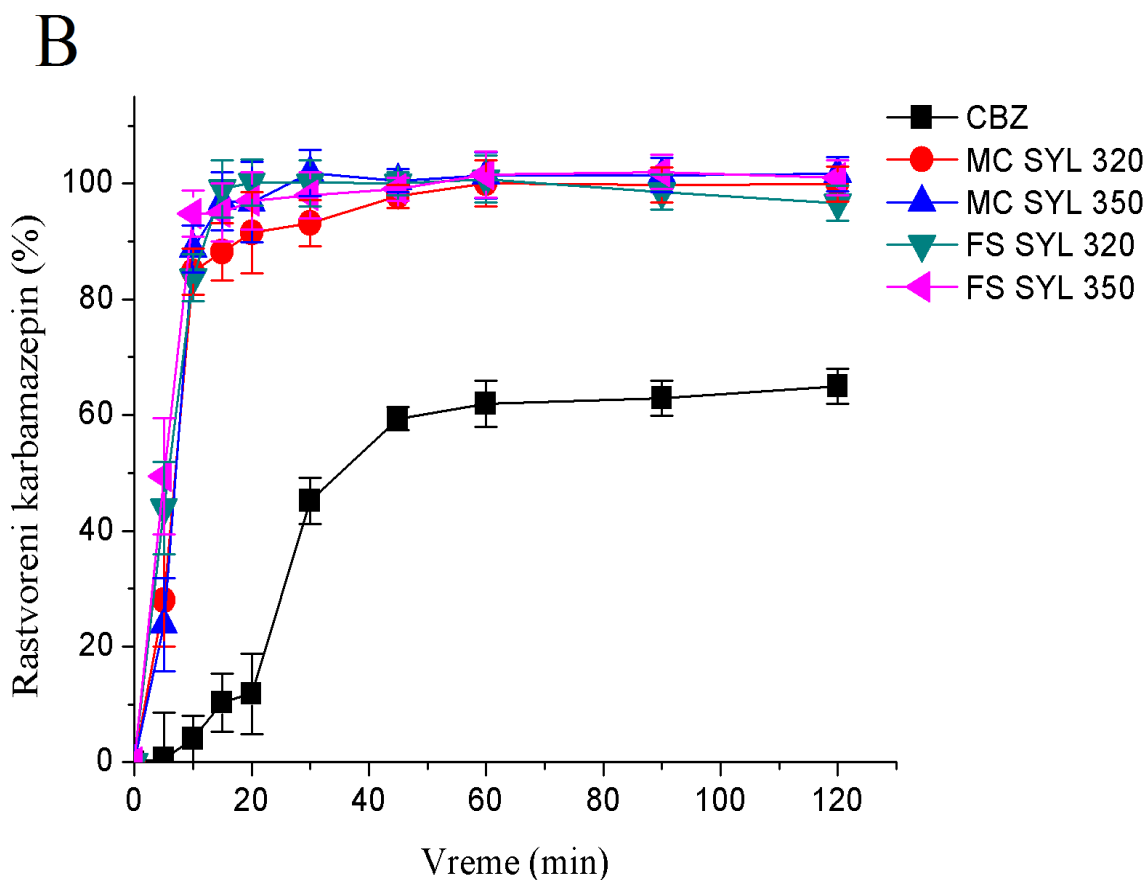
FT-IR spektri SSMEDDS formulacija takođe nisu pokazali karakteristične pikove za CBZ, pa se samim tim može zaključiti da je CBZ u ispitivanim SSMEDDS formulacijama u amorfnom obliku (Slika 9.6B).

### 9.2.6. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS formulacija

Na slikama 9.7A i 9.7 B prikazani su profili brzine oslobađanja CBZ iz fizičkih smeša i ispitivanih SSMEDDS formulacija.



Slika 9.7A - Profili brzine rastvaranja CBZ iz SSMEDDS formulacija i odgovarajućih fizičkih smeša sa NUFL2 i NFL2 kao adsorbensima. CBZ – karbamazepin; NUFL2 - Neusilin® UFL2; NFL2 - Neusilin® FL2; MC – SSMEDDS sa CBZ, SC/O 8:2,  $K_m$  1:1; FS - fizička smeša.



Slika 9.7B - Profili brzine rastvaranja CBZ iz SSMEDDS formulacija i odgovarajućih fizičkih smeša sa SYL320 i SYL350 kao adsorbensima. CBZ – karbamazepin; SYL320 - Sylysia<sup>®</sup> 320; SYL350 - Sylysia<sup>®</sup> 350; MC – SSMEDDS sa CBZ, SC/O 8:2, K<sub>m</sub> 1:1; MC1 - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 1:1; MC2 - SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup> UFL2 odnos 2:1; FS – fizička smeša

Fizičke smeše CBZ i adsorbensa NUFL2, NFL2, SYL320 kao i SYL350 su pokazale brže oslobađanje CBZ u poređenju sa čistim CBZ (Slika 9.7A; B). Do bržeg oslobađanja najverovatnije dolazi usled velike specifične površine adsorbensa (specifična površina NUFL2, SYL320 i SYL350 je  $\approx 300\text{m}^2/\text{g}$  i NFL2  $150\text{m}^2/\text{g}$ ) kao i CBZ/adsorbens interakcije potvrđene DSC i FT-IR analizama koja dovodi do prelaska CBZ u amorfni oblik. Poznato je da amorfni oblik, u većini slučajeva ima veću brzinu rastvaranja u odnosu na kristalan oblik (Zerrouck i sar., 2001). Fizička smeša CBZ i NFL2 pokazuje sporije

oslobađanje CBZ u poređenju sa fizičkim smešama CBZ i adsorbensa NUFL2, SYL320 i SYL350, 55 % leka se oslobodi u prvih 15 minuta trajanja testa u poređenju sa  $\approx 95$  % kod ostalih adsorbensa (Slika 9.7A; B). Ovome najverovatnije doprinosi manja specifična površina NFL2. Ovi rezultati se mogu dovesti u korelaciju sa deformacijom pika koja je manjeg stepena u CBZ/NFL2 fizičkoj smeši nego u ostalim fizičkim smešama, što ukazuje na manji intenzitet CBZ/adsorbens interakcije (Slika 9.6A). SSMEDDS formulacije su pokazale različitu brzinu oslobađanja CBZ u zavisnosti od vrste korišćenog adsorbensa (Slika 9.7A; B). Brzina oslobađanja CBZ iz odgovarajućih SSMEDDS formulacija se takođe može objasniti pomoću specifične površine adsorbensa. Prilikom adsorbovanja tečna SMEDDS formulacija može da uđe unutar pora adsorbensa, pri čemu se ograničava kontakt CBZ sa spoljašnjom površinom adsorbensa, što dovodi do sprečavanja precipitacije lekovite supstance (Agarwal i sar., 2009). NUFL2 sa velikom specifičnom površinom ( $300 \text{ m}^2/\text{g}$ ), ali istom veličinom čestica ( $2 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ ) kao i sastavom (magnezijum-aluminometasilikat), kao i NFL2 ( $150 \text{ m}^2/\text{g}$ ) poseduje uže i duže pore u koje tečna SMEDDS formulacija može da uđe nakon adsorbovanja. Postepeno oslobađanje CBZ u određenim vremenskim intervalima je usled ograničenog pristupa medijuma SMEDDS sistemu koji se nalazi u ovim porama. Takođe na osnovu ove pretpostavke se može objasniti i činjenica da je brzina oslobađanja CBZ iz SSMEDDS formulacije, u kojoj je SMEDDS/NUFL2 odnos 1:1, manja u odnosu na formulaciju u kojoj je SMEDDS/NFL2 odnos 1:1, dok formulacija sa SMEDDS/NUFL2 odnosom 2:1 pokazuje sličnu brzinu oslobađanja kao formulacija SMEDDS/NFL2 odnos 1:1 (Slika 9.7A). Ovo zapažanje implicira da je specifična površina u korelaciji sa količinom lekovite supstance koja nije dostupna za brzo oslobađanje u medijumu. Za lekovite supstance koje pokazuju nisku rastvorljivost u disperznom medijumu ( $<10\%$ ), pomoću koga su adsorbovane na Neusilin<sup>®</sup>, kristalizacija će postati dominantan mehanizam koji uzorkuje smanjenje u brzini oslobađanja, iako su formirane vodonične veze sa Neusilin<sup>®</sup> - om (Gupta i sar., 2002).

Ipak DSC analiza nije pokazala prisustvo kristala CBZ u SSMEDDS formulacijama (Slika 9.5B). To može biti i posledica rastvaranja eventualno precipitovanog CBZ u tečnim komponentama sistema na visokim temperaturama, slično studiji Zerrouk i sar, gde je



pokazano rastvaranje CBZ u otopljenom PEG 6000 ekscipijensu pri koncentracijama CBZ < od 20 % (Zerrouk i sar., 2001). Takođe odsustvo kristala CBZ podržava pretpostavku da tečna SMEDDS formulacija biva zarobljena unutar pora adsorbensa na bazi magezijum-aluminometasilikata. Veća brzina oslobađanja CBZ iz CBZ/NUFL2 fizičke smeše u poređenju sa SSMEDDS sistemima sa NUFL2 je usled parcijalnog „zarobljavanja“ tečne SMEDDS formulacije unutar pora adsorbensa (Slika 9.7A). SSMEDDS formulacije sa SYL320 i SYL350 kao poroznim silika adsorbensima, su pokazale slično, brzo oslobađanje CBZ kao i odgovarajuće fizičke smeše, što ukazuje da nije došlo do precipitacije CBZ na površini adsorbensa i da je CBZ ostao u rastvorenom obliku. Slična brzina oslobađanja SSMEDDS formulacija, izrađenih sa ova dva adsorbensa može se objasniti sličnom specifičnom površinom ( $\approx 300 \text{ m}^2/\text{g}$ ) kao i hemijskim sastavom. Sličnost u brzini oslobađanja CBZ između SSMEDDS formulacija i odgovarajućih fizičkih smeša sa SYL320 i SYL350 adsorbensima (Slika 9.7B) ukazuje da tečna SMEDDS nije „zarobljena“ unutar pora, najverovatnije usled njihove drugačije prirode i strukture.

## 10. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA ČVRSTE SAMOEMULGUJUĆE FOSFOLIPIDNE SUSPENZIJE (SSEPS)

### 10.1. Materijali i metode

#### 10.1.1. Materijali

*Ekscipijensi koji ulaze u sastav samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije:* **Labrasol**<sup>®</sup>, PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (Gattefosse, Francuska) je korišćen kao surfaktant (S); **Phosal**<sup>®</sup> 50 PG, lecitin/propilen-glikol, (Lipoid, Nemačka) je korišćen kao kosurfaktant/korastvarač (sadrži 50 % (m/m) lecitina rastvorenog u propilen-glikolu) (C); **Mygliol**<sup>®</sup> 812, trigliceridi srednje dužine lanaca (Sasol, Nemačka) je korišćen kao ulje (O).

*Porozni adsorbensi:* Dijatomit mikrokapsule, veličine čestica 1 - 2 μm 10 %, 10 μm 60 %, 30 - 50 μm 30 %, dobijene prečišćavanjem i klasifikacijom iz sirovog materijala diatomita koji potiče od Mount Sylvia, Pty. Ltd, Australija.

*Lekovita supstanca:* Karbamazepin (CBZ) (BASF AG, Nemačka).

Ispitivani sistemi su punjeni u kapsule veličine 3 (Capsugel<sup>®</sup>, Francuska), radi testa ispitivanja brzine rastvaranja. Prilikom ispitivanja korišćena je dvostruko destilovana voda (V).

#### 10.1.2. Metode

##### 10.1.2.1. Priprema tečne samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SEPS)

Tečne komponente samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije, PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/lecitin/propilen-glikol (C)/trigliceridi srednje dužine lanaca (O) su merene u odnosu 4.8/1.6/1.6/2 i mešane 1 h na magnetnoj mešalici. Nakon toga smeša je ostavljena 24 h na sobnoj temperaturi kako bi se struktura sistema stabilizovala. Odnos surfaktantne faze (S+C) i uljane faze (O) je  $(S+C)/O = 8/2$ , dok je odnos surfaktanta i kosurfaktanta  $K_m$

(S/C) = 3/2. Odgovarajući odnos surfaktantne i uljane faze kao i odnos surfaktanta i kosurfaktanta je optimizovan na osnovu *prescreening* studija, prilikom čega je odabran sistem koji sadrži najveći udeo uljane faze i najmanji udeo surfaktantne faze, a nakon razblaženja sa vodom, kao spoljašnjom fazom, formira emulziju sa najmanjom veličinom prečnika kapi. Nakon formiranja SEPS – a, u sistem je dodat CBZ do 40 % (m/m) sadržaja. Tako formulisana SEPS formulacija je mešana 3 minuta na 3200 o/min korišćenjem mešalice T 18 basic Ultra Turax<sup>®</sup> (Ika<sup>®</sup>, Nemačka) mešalice.

#### **10.1.2.2. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi SEPS primenom fotonske korelacione spektroskopije**

Prosečna veličina prečnika kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PdI) kao mera širina raspodele veličine su mereni korišćenjem Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments, Engleska) uređaja u opsegu vrednosti od 0,6 nm do 3 μm na temperaturi od 20 ± 0,2°C. Kao uzorci korišćeni su SEPS formulacija bez CBZ, kao i supernatant iz SEPS formulacije sa CBZ dobijen centrifugiranjem (4000 o/min, 10 min, 22°C; Beckman Ultracentrifuge L5-50). Pre merenja uzorci su razblaženi 100 x sa dvostruko destilovanom vodom. Rezultati su dobijeni iz raspodele intenziteta, korišćenjem softvera za statističku analizu podataka. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost i standardna devijacija (S.D.) tri uzastopna merenja svakog uzorka.

#### **10.1.2.3. Optička mikroskopija SEPS formulacije**

Mala količina tečne SEPS formulacije je naneta preko staklene pločice i vizuelno analizirana korišćenjem optičkog mikroskopa Axioscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Nemačka) sa integrisanom kamerom i integralnim softverom za analizu fotografija. Merenje je Martinov dijametar čestica CBZ. Martinov dijametar predstavlja dimenziju paralelnu fiksiranom pravcu koja deli česticu na dva dela jednake površine (Snow i sar., 1997). Pošto

veličina ovog dijametra varira u zavisnosti od orijentacije čestice, mereni su i radijalni i aksijalni dijametar korišćenjem integralnog softvera za obradu slika.

#### 10.1.2.4. Priprema čvrste SEPS (SSEPS) formulacije

Sastav pripremljenih formulacija prikazan je u Tabeli 10.1.

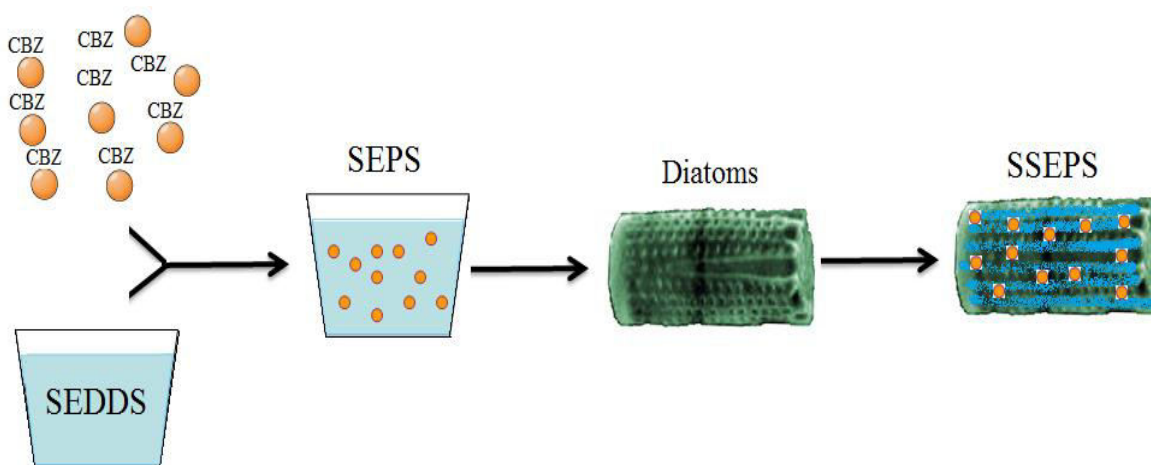
**Tabela 10.1 – Sastav čvrstih samoemulgujućih fosfolipidnih suspenzija (SSEPS)**

SEPS (CBZ 40 % (m/m))	Vrsta adsorbensa	Odnos adsorbens/SEPS	Metoda izrade	Oznaka uzorka
PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/lecitin/propilen-glikol (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) u odnosu 4.8/1.6/1.6/2 sa CBZ dispergovanim u smeši	Dijatomitne mikrokapsule	1/1	Metod A	SSEPS <sub>1</sub>
			Metod B	SSEPS <sub>2</sub>

Čvrsta SEPS formulacija (SSEPS) je pripremana na dva načina: direktnom adsorpcijom tečne SEPS na dijatomitne mikrokapsule u odnosu SEPS/adsorbens 1:1 (Metod A) i evaporacijom etanola iz etanolnog rastvora SEPS formulacije u kojoj je dispergovana određena količina dijatomitnih mikrokapsula, odnos SEPS/adsorbens je takođe 1:1 (Metod B). Finalna koncentracija CBZ u svim uzorcima je 20 % (m/m).

### ***Priprema SSEPS<sub>1</sub> - Metod A***

1 g tečne SEPS (CBZ 40 % (m/m)) formulacije je blago promešan sa 1 g dijatomitnih mikrokapsula korišćenjem tarionika i pistila pri čemu je SEPS/adsorbens odnos bio 1:1 (m/m) (Slika 10.1).



Slika 10.1 - Shematski prikaz pripreme SSEPS<sub>1</sub> formulacije

### ***Priprema SSEPS<sub>2</sub> - Metod B***

1 g tečne SEPS (CBZ 40 % (m/m)) formulacije je rastvoren u 100 ml 96 % etanola, nakon čega je u tom rastvoru dispergovano 1 g dijatomitnih mikrokapsula. Etanol je uparen na 40 °C u toku 24 h i prikupljen je dobijeni prašak.

Pripremljena je i fizička smeša CBZ/dijatomitne mikrokapsule blagim mešanjem tačno odmerene količine CBZ i dijatomitnih mikrokapsula u tarioniku sa pistilom, pri čemu je koncentracija CBZ bila 20 % (m/m). Čvrsta disperzija CBZ sa dijatomitnim mikrokapsulama dobijena je rastvaranjem odmerene količine CBZ u 96 % etanolu i naknadnim dispergovanjem odmerene količine dijatomitnih mikrokapsula. Etanol je uparen na 40 °C u toku 24 h i dobijeni prašak sa 20 % CBZ (m/m) je prikupljen.

#### **10.1.2.5. Karakterizacija SSEPS formulacija primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije**

DSC analiza ispitivanih uzoraka je vršena korišćenjem DSC 821 (Mettler Toledo AG, Nemačka) uređaja. Tačno odmerena količina uzorka (2 – 4 mg) je stavljena u odgovarajući aluminijski lončić i zagrevana u temperaturnom opsegu 20 – 250 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C/min. Kao referentni uzorak (slepa proba) korišćen je prazan aluminijski lončić. Merenja su vršena u struji azota N<sub>2</sub>. Postojanje određene kristalne forme CBZ potvrđeno je prisustvom endotermnih i/ili egzotermnih pikova.

#### **10.1.2.6. Karakterizacija SSEPS formulacija primenom difrakcije X-zraka**

Merenja difrakcije X – zraka vršena su korišćenjem Philips generator PW 1830 uređaja sa bakranom katodom ( $\lambda = 0,15418$  nm, 40 kV, 20 mA) koja je udružena sa kompjuterski kontrolisanim interfaced Philips PW 1710 difraktometrom. Difraktovano zračenje je mereno pomoću Philips PW 1820 (Philips Industrial & Electro-acoustic System Division, Almelo, Norveška) vertikalnog goniometra. Spektri su dobijeni snimanjem uzoraka na sobnoj temperaturi pri širini snimanja od 0,02° i uglom snimanja  $2\theta$  između 4° i 40°.

#### **10.1.2.7. *In vitro* ispitivanje brzina rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacija**

Profili brzine rastvaranja karbamazepina iz ispitivanih SSEPS formulacija kao i fizičke smeše i odgovarajuće čvrste disperzije dobijeni su korišćenjem VanKel 700 (Vankel Industries, SAD) aparata sa ispitivanje brzine rastvaranja sa rotirajućim korpicama. Kao medijum je korišćen fosfatni pufer pH = 6,8 na  $37 \pm 0,5$ °C. Količina rastvorenog CBZ određena je spektrofotometrijski korišćenjem UV-2101 Shimadzu Scientific Instruments (Columbia, SAD) uređaja na 287 nm, uz korišćenje odgovarajućeg SSEPS sistema bez CBZ u tačno definisanom intervalu uzorkovanja kao slepe probe, kao i količine CBZ koja

je uklonjena iz sistema predhodnim uzorkovanjem. Ispitivanje brzine rastvaranja je vršeno u triplikatu i vrednosti procenta rastvorenog karbamazepina u zavisnosti od vremena su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.

#### **10.1.2.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija SSEPS**

Praškasti uzorci su fiksirani na odgovarajućem nosaču za uzorke pomoću trake koja je lepljiva sa obe strane. Nakon toga uzorci su obloženi ultra tankim slojem zlata (5 nm) u atmosferi argona korišćenjem SCD 040, Bal-tec GmbH (Witten, Nemačka) uređaja. Uzorci su posmatrani korišćenjem SEM elektronskog mikroskopa (S-4000; Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Nemačka).

#### **10.1.2.9. Ubrzana studija stabilnosti SSEPS formulacija**

SSEPS formulacije kao i čvrsta disperzija čuvane su pod uslovima ubrzane studije stabilnosti (40°C i 70 % RH), korišćenjem klima komore tokom 10 nedelja. Nakon toga uzorci su ponovo okarakterisani DSC i XRD analizama kako bi se uočile eventualne promene fizičko-hemijskih karakteristika CBZ u uzorcima.

## 10.2. Rezultati i diskusija

### 10.2.1. Odabir odgovarajuće samoemulgujuće formulacije kao disperznog medijuma za SEPS

Odabrana samoemulgujuća formulacija (SEDDS) treba da zadovolji sledeće unapred odabrane kriterijume:

- Prosečna veličina prečnika kapi (Z-Ave) samoemulgujuće formulacije bez CBZ kao i supernatantna SEPS (samoemulgujuća formulacija + CBZ) nakon 100 x razblaženja ( $1/100 (m_{sedds}/m_{ukupno})$ ) sa vodom treba da bude  $<200$  nm;
- Indeks polidisperznosti (PdI) treba da bude što niži, što ukazuje na usku raspodelu veličine prečnika kapi;
- Nakon 100 x razblaženja ( $1/100 (m_{sedds}/m_{ukupno})$ ) sa vodom ispitivani sistem treba da bude stabilan. Nakon centrifugiranja (3000 o/min u toku 15 minuta) ne sme doći do faznog razdvajanja;
- Konačna formulacija treba da sadrži veći udeo lecitina, jer on pripada GRAS sistemu (*CFR - Code of Federal Regulations, Part 184 - Direct Food substances affirmed as Generally Recognized as Safe, Subpart B - Listing of specific substances Affirmed as GRAS, Section 184.1400*) (Elektronska baza podataka *vxii*), kao i manji udeo PEG-8 kaprilno/kaprinski glicerida (S) kako bi konačna formulacija imala što manji potencijal iritacije.

U okviru preliminarnih ispitivanja bilo je neophodno izabrati samoemulgujuću formulaciju sa odgovarajućim odnosima surfaktant (S)/kosurfaktant-korastvarač (C), S/C (Km), kao i (surfaktant (S)/kosurfaktant-korastvarač (C)/ulje (O) odnosom, (S/C)/O. U tu svrhu S/C odnos je variran od 1:1 preko 3:2 do 2:1. Za svaki S/C odnos pravljene su samoemulgujuće formulacije sa (S/C)/O odnosom 7:1, 8:2 i 9:1, što ukupno čini 9 formulacija. Sastav samoemulgujućih formulacija je prikazan u Tabeli 10.2.



**Tabela 10.2 - Sastav SEDDS formulacija prilikom odabira disperznog medijum za SEPS**

S/C ( $K_m$ )	(S/C)/O		
1:1	7:3	8:2	9:1
3:2			
2:1			

Samoemulgujući disperzni medijumi sa (S/C)/O odnosom 7/3 su pokazali značajno više vrednosti prosečne veličine prečnika kapi nakon razblaženja 100 x sa vodom kao i odvajanje faza nakon centrifugiranja. Nasuprot njima, kod SEDDS disperznih medijuma sa (S/C)/O odnosom 8/2 i 9/1 nije pokazano odvajanje faza. Kako bi konačan farmaceutski oblik imao što manji udeo PAM i što veći udeo ulja, SEDDS sistem sa **(S/C)/O odnosom 8/2** je odabran za dalja ispitivanja. Adekvatan S/C odnos ( $K_m$ ) odabran je na osnovu vrednosti prosečne veličine prečnika kapi (Z-Ave) (Tabela 10.3) i indeksa polidisperznosti (PdI) (Tabela 10.4).

SEDDS disperzni medijum sa  $K_m$  vrednošću 1:1 nije pokazao stabilnost nakon centrifugiranja (došlo je do odvajanja faza). Posmatranjem podataka iz Tabele 10.3 za prosečnu veličinu prečnika kapi, kao i Tabele 10.4 za veličinu indeksa polidisperznosti, može se zaključiti da SEDDS kao i supernatant SEPS sa  $K_m$  odnosom 2:1 pokazuju neznatno manje vrednosti prosečne veličine prečnika kapi (Tabela 10.3), ali više vrednosti indeksa polidisperznosti u odnosu na SEDDS sa  $K_m$  odnosom 3:2 (Tabela 10.4).

**Tabela 10.3 – Prosečna veličina prečnika kapi (Z – Ave) SEPS bez CBZ i supernatanta SEPS sa CBZ**

K <sub>m</sub>	Z – Ave [nm]	
	SEDDS	Supernatant SEPS
1:1*	161,8	173,4
3:2	157,4	162,2
2:1	149,2	157,9

\*nakon centrifugiranja dolazi do razdvajanja faza

**Tabela 10.4 - Indeks polidisperznosti (PdI) SEPS bez CBZ i supernatanta SEPS sa CBZ**

K <sub>m</sub>	PdI	
	SEDDS	Supernatant SEPS
1:1	0,111	0,169
3:2	0,088	0,106
2:1	0,093	0,176

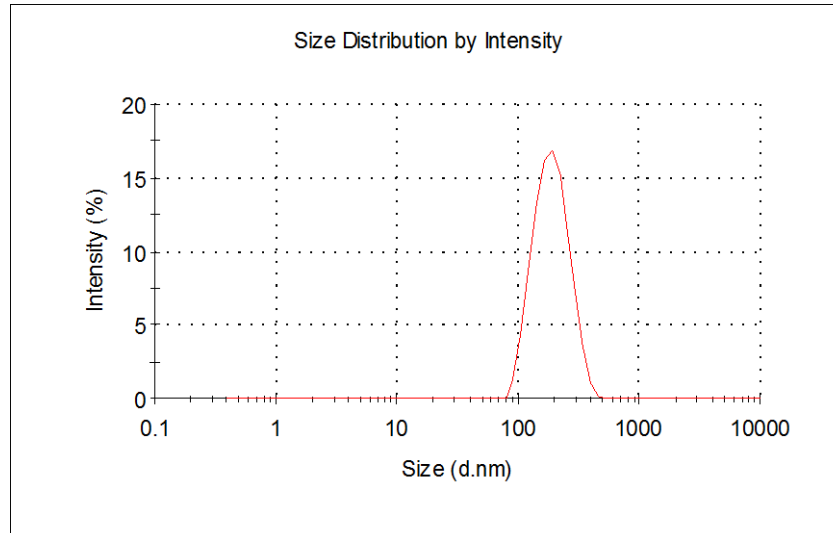
Pored toga SEDDS disperzni nosač sa K<sub>m</sub> odnosom 3:2 poseduje i veći udeo lecitina. U skladu sa predhodno navedenim kriterijumima SEDDS disperzni medijum sa **(S+C)/O odnosom 8/2** i sa **S/C (K<sub>m</sub>) odnosom 3:2** je uključen u dalja istraživanja.

### 10.2.2. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije

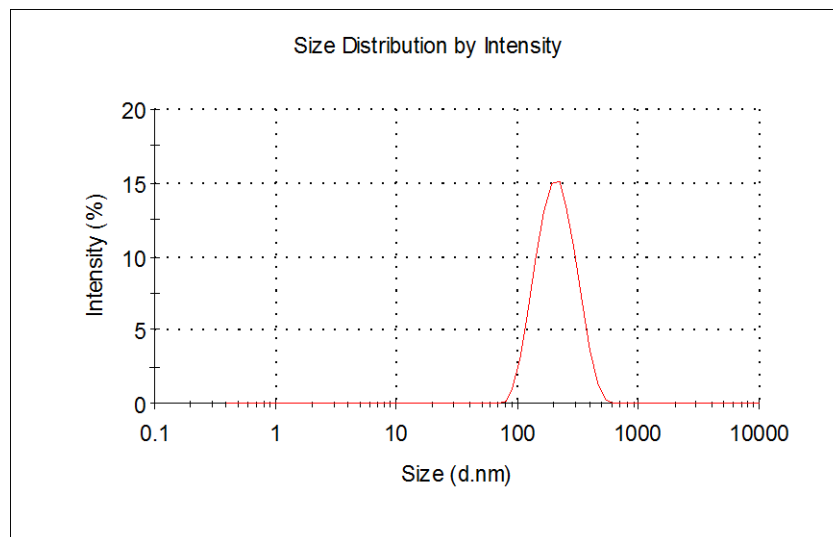
Rezultati PCS analize SEPS formulacije bez CBZ (SEDDS, SC/O 8:2 i S/C (Km) 3:2) kao i supernatanta SEPS prikazani su u Tabeli 10.5. Nakon razblaženja 100 x sa vodom prazna SEPS formulacija kao i supernatant SEPS formulacije sa CBZ formiraju U/V emulziju u kojoj je prosečna veličina prečnika kapi manja od 200 nm sa monomodalnom distribucijom veličine. Sadržaj CBZ u supernatantu je određen spektrofotometrijski na 287 nm i iznosi 6 %  $m_{cbz}/m_{ukupna}$ . Nakon razblaženja, supernatant SEPS formulacije sa CBZ pokazuje neznatno više vrednosti za prosečnu veličinu prečnika kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PdI) u odnosu na SEPS formulaciju bez CBZ (Tabela 10.5) (Slika 10.2 i Slika 10.3).

**Tabela 10.5 - Prosečna veličina prečnika kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PdI) samoemulgujućeg disperznog medijuma i supernatanta SEPS sa CBZ nakon razblaženja (100 x) sa vodom (K<sub>m</sub> 3:2; SC/O 8:2)**

	Z-Ave ± S.D.	PdI ± S.D.	Pik 1	Pik2	Pik 1	Pik2
			Z-Ave (nm)	Z-Ave (nm)	P Int (%)	P Int (%)
SEPS bez CBZ	157.40 ± 1.473	0.088 ± 0.024	174.60 ± 3.112	0	100	0
Supernatant SEPS sa CBZ	173.33 ± 1.665	0.177 ± 0.024	204.20 ± 7.654	0	100	0



**A)**

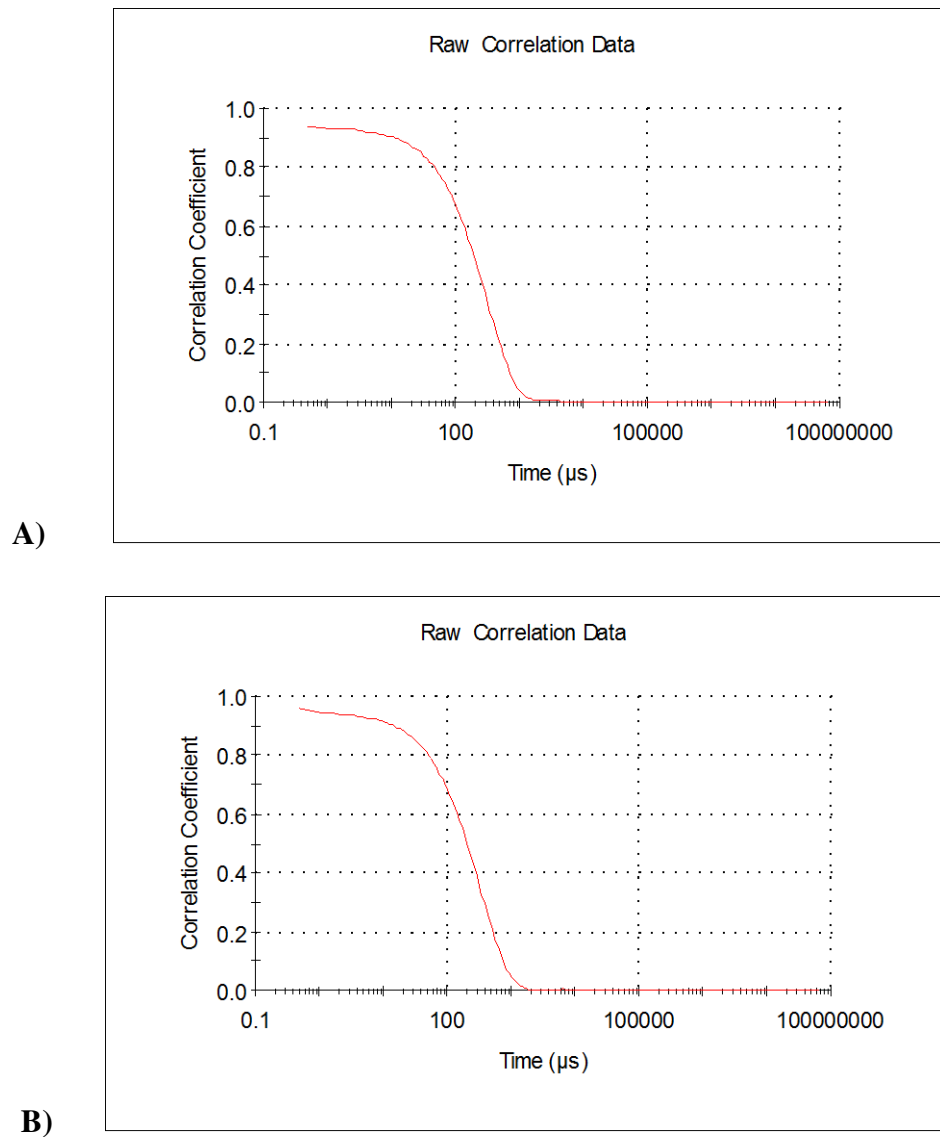


**B)**

Slika 10.2 - Raspodela veličine prečnika kapi<sup>10</sup> prema intenzitetu<sup>11</sup> kod SEDDS disperznog nosača, K<sub>m</sub> 3:2; SC/O 8:2 (**A**), kao i supernatanta SEPS (**B**), nakon razblaženja 100 x sa vodom.

<sup>10</sup> Size (d.nm)

<sup>11</sup> Intensity (%)



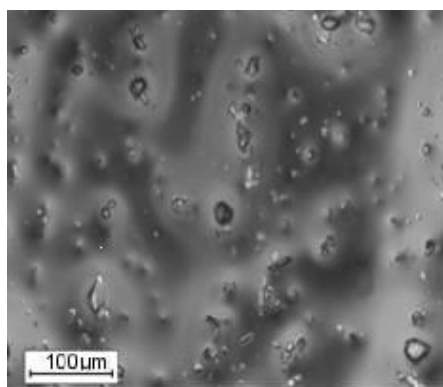
Slika 10.3 - Korelaciona funkcija<sup>12</sup> SEDDS disperznog nosača,  $K_m$  3:2; SC/O 8:2 (**A**), kao i supernatanta SEPS (**B**), nakon 100 x razblaženja sa vodom

<sup>12</sup> Koeficijent korelacije vs Vreme ( $\mu$ s) – eng. Correlation function vs Time ( $\mu$ s)

Razlog za dobijene rezultate je prisustvo CBZ na ulje/voda međupovršini. Molekul CBZ zbog male hidrofilne glave i velikog hidrofobnog repa poseduje vrednost kritičnog faktora pakovanja,  $CPP > 1$  pa u polarnom medijumu, kao što je voda, dovodi do smanjenja termodinamičke stabilnosti sistema, tako što čini međupovršinski film fluidnijim, što može biti uzrok većih vrednosti veličine prečnika kapi i šire raspodele veličine (Tabela 10.5) (Israelachvili i sar., 1976). Ipak odsustvo deformacija u završnom delu bazne linije autokorelacionih funkcija (Slika 10.3), ukazuje da se posledice termodinamičke nestabilnosti sistema sa CBZ relativno sporo razvijaju, svakako ne u toku vremena merenja.

### 10.2.3. Određivanje veličine čestica karbamazepina u tečnoj SEPS pomoću optičke mikroskopije

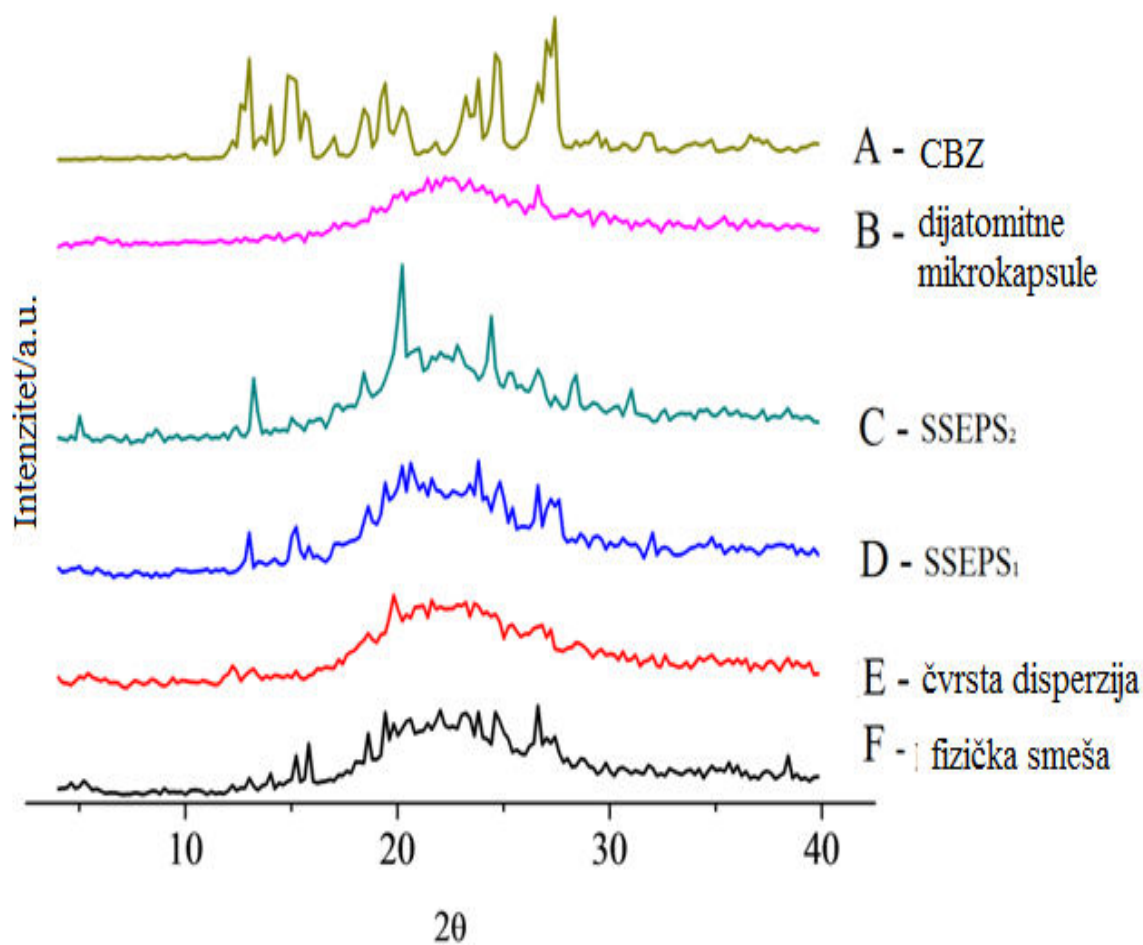
Nanošenjem SEPS formulacije na staklenu pločicu i posmatranjem formulacije pod optičkim mikroskopom može se uočiti prisustvo kristala nerastvorenog CBZ. SEPS formulacija zaista predstavlja suspenziju CBZ u odabranom samoemulgujućem disperznom medijumu. Veličina čestica CBZ nije ujednačena, međutim nije uočeno prisustvo velikih čestica CBZ. Prosečna vrednost Martinovog dijametra, merenog i aksijalno i radijalno u odnosu na osu čestice kristala CBZ u tečnoj SEPS formulaciji je oko  $7.66 \mu\text{m}$  (Slika 10.4).



Slika 10.4 - Slika SEPS suspenzije CBZ, 40 % ( $m_{\text{cbz}}/m_{\text{ukupna}}$ )

#### 10.2.4. Karakterizacija čvrste samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SSEPS) primenom diferencijalna skenirajuće kalorimetrije, difrakcije X-zraka i skenirajuće elektronske mikroskopije

Na Slici 10.5 prikazani su rezultati XRD analize čistog CBZ (Slika 10.5A), diјatomitnih mikrokapsula (Slika 10.5B), SSEPS<sub>2</sub> formulacije (Slika 10.5C), SSEPS<sub>1</sub> formulacije (Slika 10.5D), čvrste disperzije (Slika 10.5E) i fizičke smeše (Slika 10.5F).



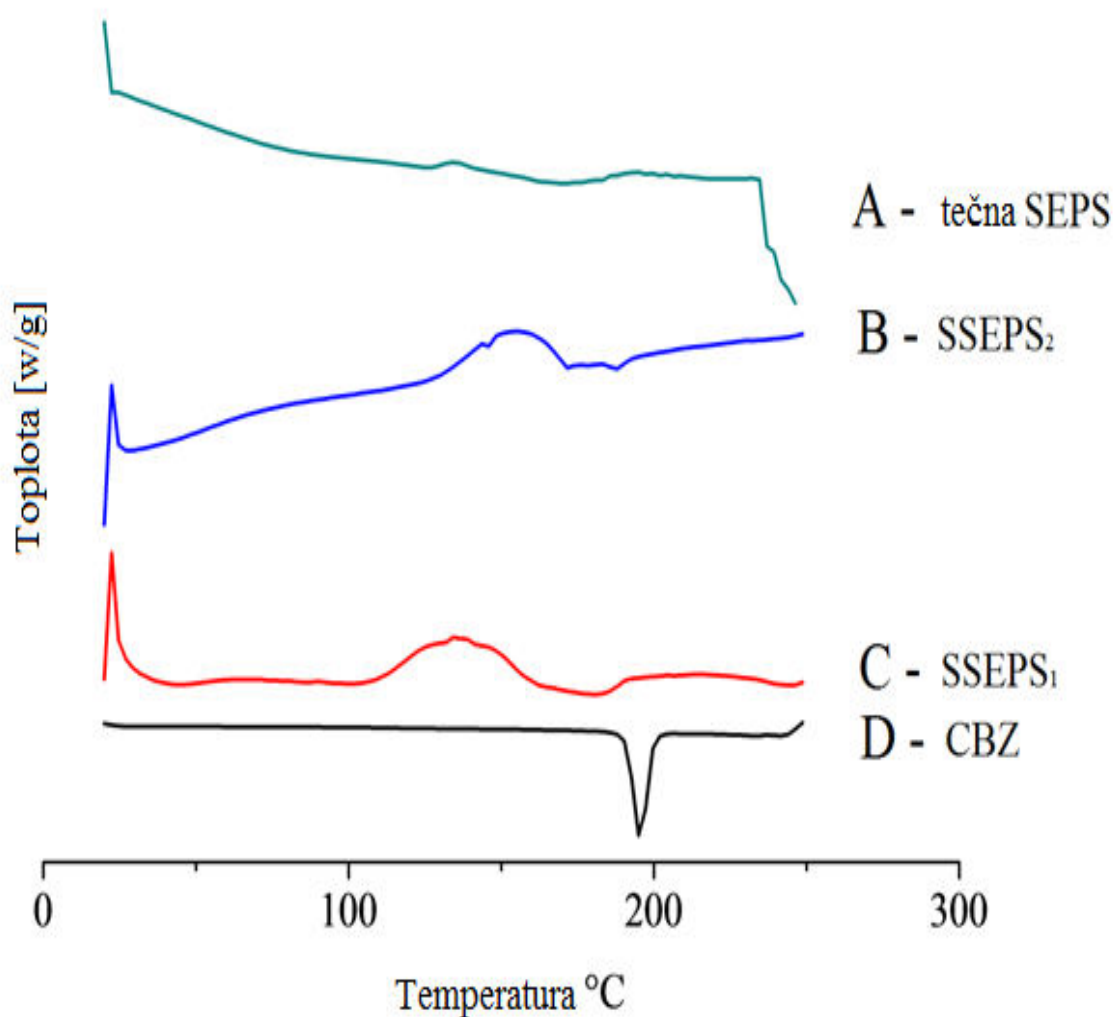
Slika 10.5 - XRD dijagrami: A – čist CBZ (20 % intenziteta signala); B – diјatomitne mikrokapsule; C – SSEPS<sub>2</sub> pripremljen prema metodi B; D – SSEPS<sub>1</sub> pripremljen prema metodi A; E – čvrsta disperzija; F – fizička smeša.

XRD analiza čistog CBZ je potvrdila da se CBZ nalazi u formi III (P – monokliničan polimorfni oblik) (Slika 10.5A). Karakteristični pikovi čistog CBZ su se pojavili na  $2\theta$  – 13.02, 15.02, 19.42, 23.82 i 24.62 (Slika 10.5A), koji prema studiji Grzesiak i saradnika odgovaraju P – monokliničkoj formi (Grzesiak i sar., 2003). XRD analiza čistog adsorbensa je pokazala da se u sastavu dijatomitnih mikrokapsula dominantno nalazi amorfni silicijum-dioksid. Manji specifični pikovi (<1%) na 11.62, 19.82 i 22.22 odgovaraju kristalnoj strukturi kvarca, kristobalita i gipsa (Slika 10.5B). Prilikom poređenja intenziteta pikova čistog CBZ i ispitivanih SSEPS formulacija kao i fizičke smeše, uzeto je 20 % intenziteta pikova čistog CBZ (što odgovara sadržaju CBZ u ispitivanim formulacijama) kako bi moglo da se zaključi da li samo deo ili celokupni CBZ eventualno podleže polimorfnom prelazu. XRD analiza ispitivanih SSEPS formulacija je pokazala prisustvo pikova karakterističnih za određene polimorfne oblike CBZ (Slika 10.5C; D). SSEPS<sub>1</sub> formulacija izrađena prema metodi A pokazuje pikove karakteristične za P – monokliničan oblik CBZ (Slika 10.5D). Može se zaključiti da nakon adsorpcije tečne SEPS na dijatomitne mikrokapsule blagim mešanjem u tarioniku sa pistilom ne dolazi do konverzije polimornog oblika celokupnog CBZ. XRD analizom SSEPS<sub>2</sub> formulacije izrađene prema metodi B istakli su se nešto drugačiji pikovi,  $2\theta$  – 8.62, 13.22, 18.42, 20.22, 25.02 i 26.62 (Slika 10.5C), koji su karakteristični za trigonalni oblik CBZ (CBZ forma II) (Grzesiak i sar., 2003), što ukazuje da ukoliko se SSEPS formulacija izrađuje uparavanjem etanola iz etanolnog rastvora komponenti sa dispergovanim dijatomitnim mikrokapsulama na 40 °C (metod B), CBZ najvećim delom prelazi u igličasti trigonalni oblik (forma II). Prema Evropskoj farmakopeji jedini oblik karbamazepina koji je pogodan za farmaceutsku uporebu je P – monokliničan oblik, odnosno CBZ forma III, zbog čega prisustvo trigonalnog oblika u SSEPS<sub>2</sub> formulaciji izrađenoj prema metodi B predstavlja nedostatak ove metode. XRD analiza fizičke smeše CBZ i dijatomitnih mikrokapsula pokazuje prisustvo pikova karakterističnih za P - monokliničan oblik karbamazepina (forma III),  $2\theta$  – 13.02, 15.02, 19.42, 23.82 i 24.62, međutim oni su manjeg intenziteta, što ukazuje da je deo CBZ prešao u amorfan oblik (Slika 10.5F). XRD analiza



čvrste disperzije CBZ i dijatomitnih mikrokapsula, korišćenjem etanolnog rastvora CBZ, ne pokazuje pikove karakteristične za P-monokliničan niti ijedan drugi polimorfni oblik CBZ, što potvrđuje da je u čvrstoj disperziji CBZ prevashodno u amorfnom obliku (Slika 10.5E).

Rezultati DSC analize prikazani su na Slici 10.6 i to tečne SEPS (Slika 10.6A), SSEPS<sub>2</sub> (Slika 10.6B), SSEPS<sub>1</sub> (Slika 10.6C) i čistog CBZ (Slika 10.6D).

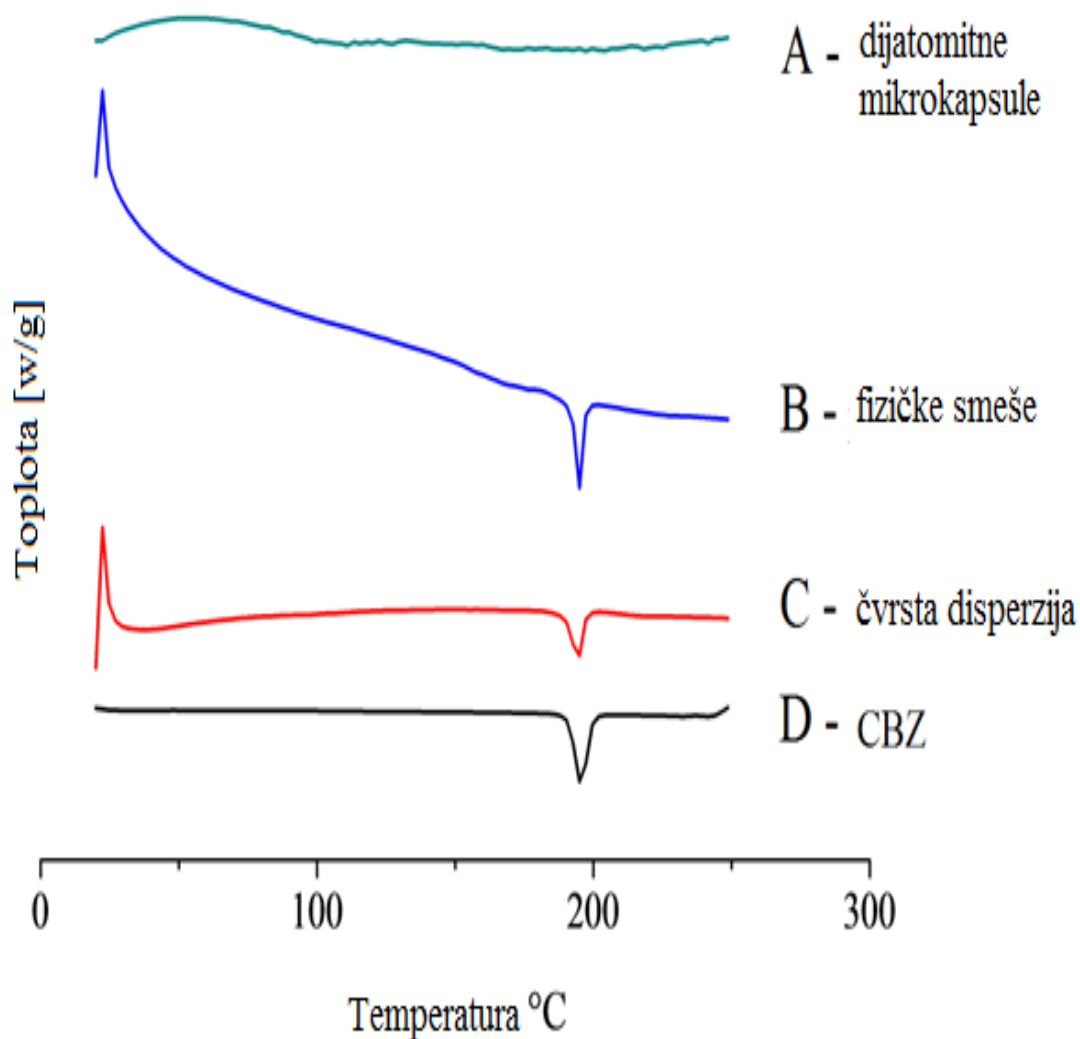


Slika 10.6 - DSC krive tečne SEPS i različitih uzoraka: A – Tečna SEPS (sadržaj CBZ 40 % (m/m)); B – SSEPS<sub>2</sub> (sadržaj CBZ 20 % (m/m)) pripremljen metodom B; C – SSEPS<sub>1</sub> (sadržaj CBZ 20 % (m/m)) pripremljen metodom A; D – CBZ (20 % intenziteta signala)

DSC analiza čistog CBZ je pokazala odsustvo rekristalizacionog pika P – monokliničkog oblika u triklinični oblik i karakterističan pik topljenja na 191,2°C, koji odgovara piku topljenja trikliničkog oblika (Slika 10.6D). Odsustvo karakterističnog pika topljenja P – monokliničkog oblika kao i odsustvo rekristalizacionog pika P – monokliničkog oblika u trikliničan oblik, koji se simultano dešavaju u opsegu temperatura od 162 – 175 °C (Grzesiak i sar., 2003), najverovatnije je posledica spore brzine zagrevanja uzorka. Kao što je već ranije pomenuto, glavni nedostatak DSC analize je taj što se uzorci izlažu visokim temperaturama, usled kojih može doći do rastvaranja lekovite supstance u tečnim komponentama ispitivanog sistema kao i do eventualne degradacije lekovite supstance i/ili ekscipijenasa, što može u velikoj meri uticati na konačne rezultate ove analize. Iz tog razloga je DSC analiza kombinovana sa netermalnom analizom kao što je difrakcija X – zraka. DSC analize obe vrste SSEPS formulacije pokazuju odsustvo pika topljenja CBZ (Slika 10.6B; C). Širok egzotermni pik u temperaturnom opsegu od 110 – 170 °C (Slika 10.6B; C) je najverovatnije posledica nekog vida degradacije, ali da bi se otkrio tačan uzrok neophodni su dodatni eksperimenti. Pošto je XRD analizom pokazano da se CBZ u SSEPS formulacijama nalazi u kristalnom obliku, može se zaključiti da u toku DSC analize dolazi do rastvaranja CBZ u tečnim komponentama SSEPS sistema, što je potvrđeno i DSC analizom tečne SEPS (Slika 10.6A) koja takođe ne pokazuje pikove topljenja karakteristične za P - monokliničan karbamazepin. Oštar pad DSC krive tečne SEPS iznad 230 °C ukazuje da iznad ove temperature počinje degradacija materijala (Slika 10.6A) (Zhou i Labuza, 2011).

Na Slici 10.7 prikazane su DSC krive dijetomitnih mikrokapsula (Slika 10.7A), fizičke smeše (Slika 10.7B), čvrste disperzije (Slika 10.7C) i čistog CBZ (Slika 10.7D). Dijetomitne mikrokapsule nisu pokazale pik topljenja (Slika 10.7A), što ukazuje na njihovu termalnu stabilnost u ispitivanom temperaturnom opsegu. Prilikom upoređivanja pikova sa DSC krive čistog CBZ i pikova sa DSC krivi fizičke smeše i čvrste disperzije korišćeno je 20 % intenziteta pika čistog CBZ, što odgovara sadržaju CBZ u ispitivanim formulacijama. DSC krive fizičke smeše odgovaraju onima za P – monokliničan i amorfni oblik CBZ (Grzesiak i sar., 2003). Prilikom ispitivanja amorfno oblika dolazi do spore

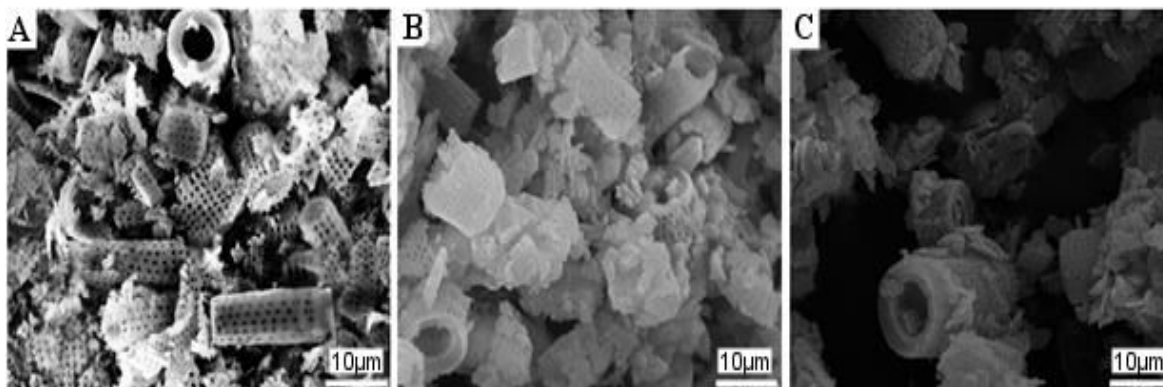
kristalizacije amornog oblika u trikličan oblik, koji se vidi kao širok egzotermni pik, i naknadnog topljenja na temperaturi od 191,2°C (Grzesiak i sar., 2003; Li i sar., 2000). Odsustvo širokog egzotermnog pika je najverovatnije usled spore brzine zagrevanja.



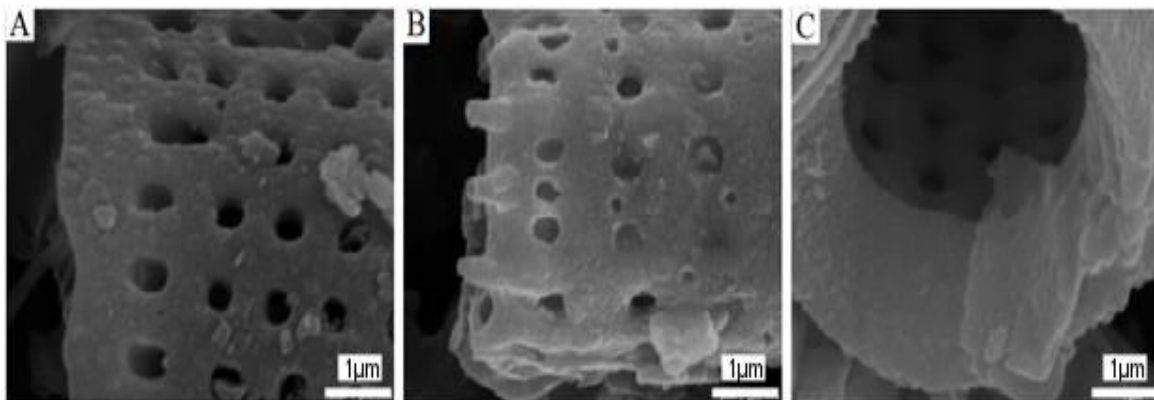
Slika 10.7 - DSC krive različitih formulacija: A – diјatomitne mikrokapsule; B – fizička smeša (sadržaj CBZ 20 % (m/m)); C – čvrsta disperzija (sadržaj CBZ 20 % (m/m)); D – CBZ 20 % intenziteta signala

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je pokazano da se korišćeni nosač sastoji od diјatomitnih mikrokapsula različitih veličina sa celim i izlomljenim mikrokapsulama (Slika 10.8A; 10.9A). Dijametar pore iznosi oko 400 nm (Slika 10.9A), slično nalazima Sinn Aw i saradnika za tzv. Barrett-Joyner-Halenda (BJH) diјametar pora diјatomitnih mikrokapsula koji iznosi 370.8 nm (Aw i sar., 2011).

SEM analiza SSEPS formulacije pripremljene prema metodi *A* pokazuje da tečna SEPS formulacije nije ravnomerno raspoređena po površini adsorbensa (Slika 10.8B), dok SSEPS formulacija pripremljena prema metodi *B* pokazuje uniformnu raspodelu tečne SEPS na površini diјatomitnih mikrokapsula, pri čemu je tečna SEPS većim delom prisutna unutar pora adsorbensa (Slika 10.8C; 10.9B). Ipak velika, centralna šupljina nije kompletno ispunjena sa tečnom SEPS (Slika 10.9C).



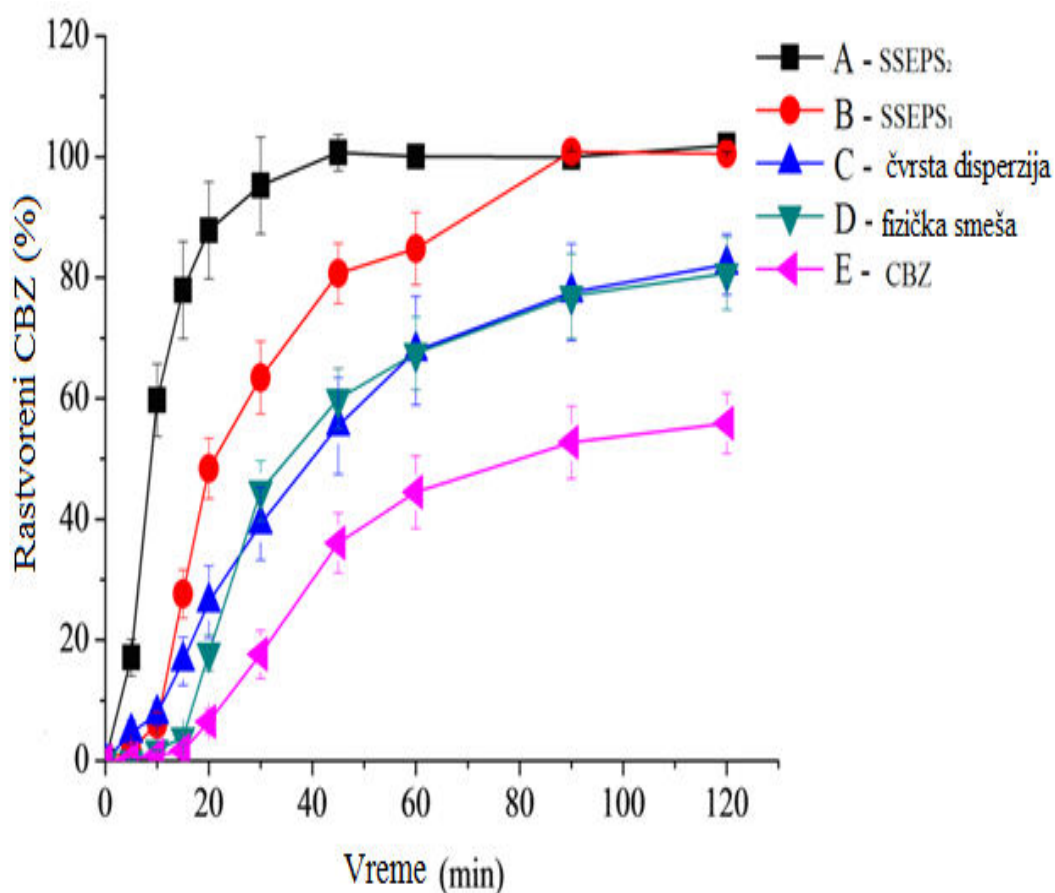
Slika 10.8 - SEM fotografije; A) nemođifikovane diјatomitne mikrokapsule B) Diјatomitne mikrokapsule iz SSEPS<sub>1</sub> pripremljene metodom *A* C) Diјatomitne mikrokapsule iz SSEPS<sub>2</sub> pripremljene metodom *B*



Slika 10.9 - SEM fotografije visoke rezolucije koje prikazuju poroznu strukturu: A) nemodifikovane dijatomitne mikrokapsule B) Dijatomitne mikrokapsule iz SSEPS<sub>2</sub> pripremljene metodom B C) Dijatomitne mikrokapsule iz SSEPS<sub>2</sub> pripremljene metodom B (velika centralna šupljina)

#### 10.2.5. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacija

Na Slici 10.10 prikazani su profili brzine rastvaranja CBZ iz ispitivanih formulacija SSEPS<sub>2</sub> (Slika 10.10A), SSEPS<sub>1</sub> (Slika 10.10B), čvrsta disperzija iz etanolnog rastvora (Slika 10.10C), fizička smeša (Slika 10.10D) i čist CBZ (Slika 10.10E).



Slika 10.10 – Profili brzine rastvaranja CBZ. A – SSEPS<sub>2</sub> pripremljena metodom B; B – SSEPS<sub>1</sub> pripremljena metodom A; C - čvrsta disperzija iz etanolnog rastvora; D – fizička smeša; E – čist CBZ.

Čvrsta disperzija CBZ i dijaminatnih mikrokapsula, koja je dobijena korišćenjem 96 % etanola kao rastvarača, kao i fizička smeša, su pokazale veću brzinu rastvaranja u odnosu na čist CBZ (Slika 10.10C; D). Najverovatniji razlog za to je prisustvo amornog CBZ detektovanog XRD kao i prisustvo adsorbensa velike specifične površine (Slika 10.5E; F). Poznato je da je amorfni oblik lekovite supstance u najvećem broju slučajeva pokazuje bolju rastvorljivost u odnosu na kristalni oblik (Leuner i Dressman, 2000). Takođe nije

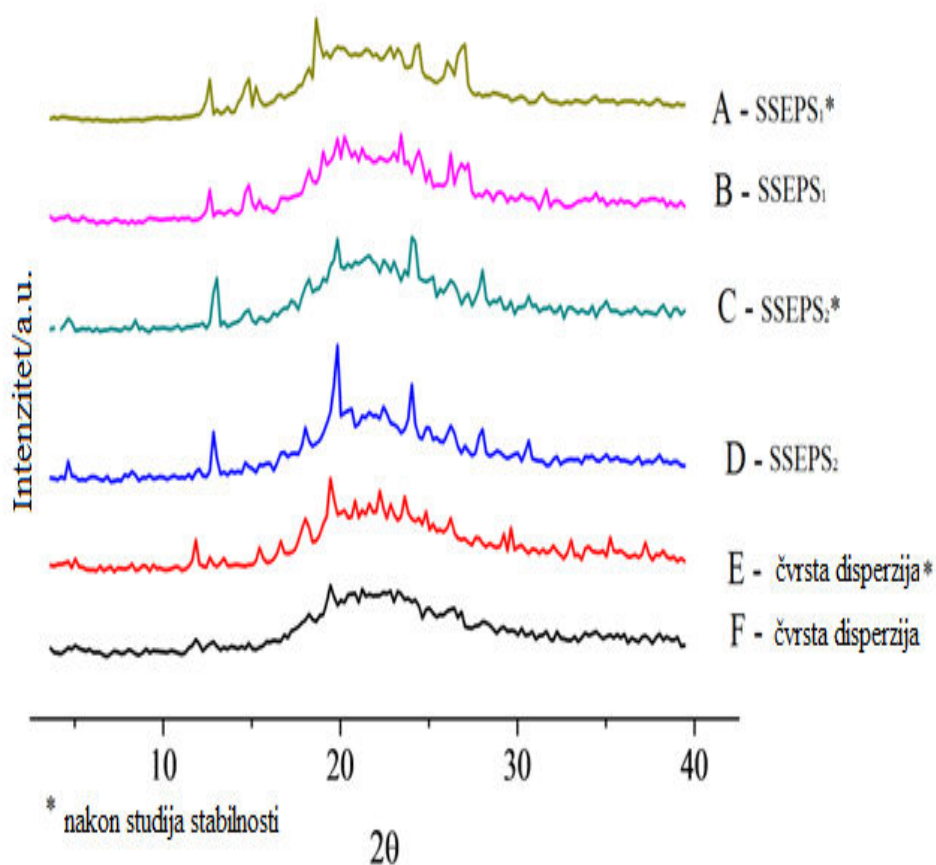
pokazana značajna razlika u brzini rastvaranja između čvrste disperzije i odgovarajuće fizičke smeše (Slika 10.10C; D).

Brzina rastvaranja CBZ iz SSEPS<sub>1</sub> formulacije pripremljene metodom A (direktna adsorpcija) pokazuje veću brzinu rastvaranja u odnosu na čist CBZ, ali i u odnosu na fizičku smešu i čvrstu disperziju, najverovatnije zbog prisustva SEDDS sistema sa visokom koncentracijom surfaktanata kao disperznog medijuma. SSEPS formulacija pripremljena metodom B (evaporacija etanola iz disperzije dijamitnih mikrokapsula u etanolnom rastvoru komponenti SEPS tokom 24h na 40°C) je pokazala najveću brzinu rastvaranja (Slika 10.10A) usled prisustva tečne SEPS unutar pora dijamitnih mikrokapsula (Slika 10.9B; C). Prisustvo SEPS formulacije unutar pora dijamitnih mikrokapsula smanjuje kontakt CBZ sa površinom adsorbensa, što može znatno da poveća brzinu rastvaranja. Formulacija unutar pora je dostupna za medijum dok deo formulacije prisutan na površini potencijalno može da interaguje sa silika grupama što dovodi do smanjenja brzine rastvaranja (Agarwal i sar., 2009). Brže rastvaranje CBZ iz SSEPS<sub>2</sub> formulacije pripremljene metodom B u odnosu na SSEPS<sub>1</sub> formulaciju (pripremljenu metodom A) može se objasniti prisustvom CBZ u trigonalnom obliku (formi II), koji je više rastvorljiv u odnosu na P-monoklinički oblik (forma III), (Yoshihashi i sar., 2002). Međutim, prisustvo trigonalnog oblika u SSEPS<sub>2</sub> formulaciji pripremljenoj metodom B, iako pokazuje veću brzinu rastvaranja, predstavlja nedostatak ove metode pripreme, jer jedini polimorfni oblik CBZ koji ima prihvatljivu farmaceutsku primenu je P-monokliničan oblik (forma III), čime metoda pripreme A dobija na značaju.

### **10.2.6 – Rezultati ubrzane studije stabilnosti SSEPS formulacija**

Na Slici 10.11 prikazani su rezultati XRD analize SSEPS<sub>1</sub>, SSEPS<sub>2</sub> formulacije i čvrste disperzije nakon čuvanja pod uslovima ubrzane studije stabilnosti. Obe SSEPS formulacije (pripremljene prema metodi A i metodi B), kao i čvrsta disperzija, čuvane su pod uslovima ubrzane studije stabilnosti (40°C i 70% RH) u toku 10 nedelja. Nakon toga, kod obe SSEPS formulacije su primećene male promene u kristaličnosti CBZ. Ovo ukazuje da je

PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi/lecitin/propilen-glikol/ trigliceridi srednje dužine lanca SEDDS sistem u stanju da, nakon adsorbovanja na dijetomitne mikrokapsule, očuva polimorfni oblik CBZ stabilnim u uslovima visoke vlažnosti, gde je favorizovano stvaranje CBZ dihidrata. U čvrstoj disperziji, koja ne sadži predhodno pomenuti SEDDS sistem, porast kristalčnosti pokazuje da same dijetomitne mikrokapsule, kao adsorbens, nisu u stanju da očuvaju amorfni oblik CBZ (Slika 10.11E; F).

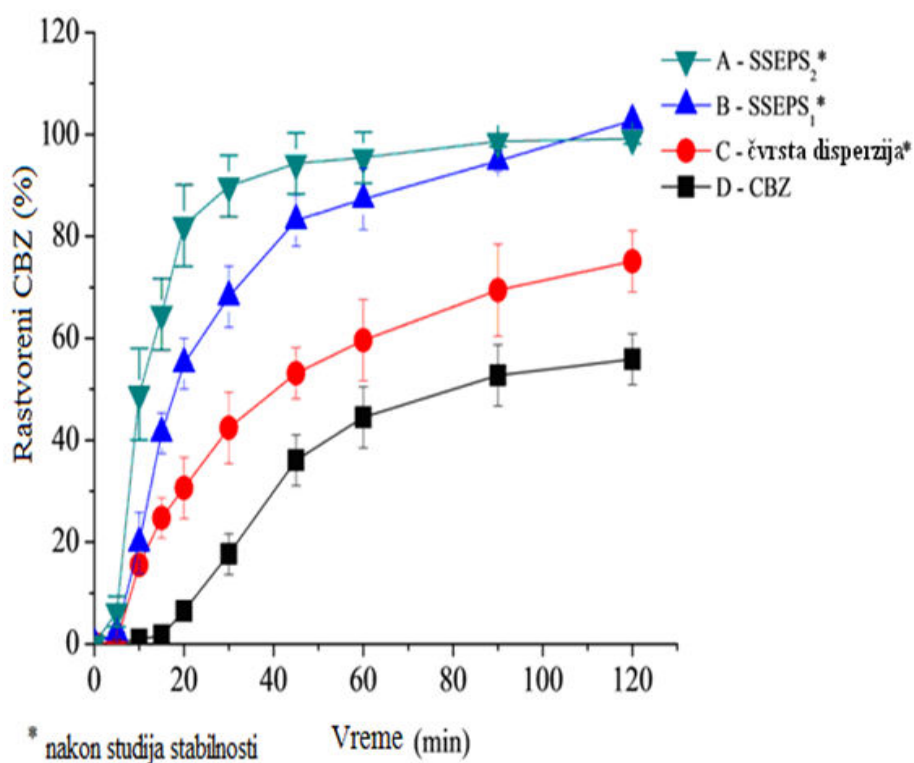


Slika 10.11 - XRD dijagrami: A – SSEPS<sub>1</sub> pripremljena metodom A nakon studija stabilnosti; B – SSEPS<sub>1</sub> pripremljena metodom A; C – SSEPS<sub>2</sub> pripremljena metodom B nakon studija stabilnosti; D – SSEPS<sub>2</sub> pripremljena metodom B; E – čvrsta disperzija nakon studija stabilnosti; F – čvrsta disperzija



Slični rezultati u prikazani u studiji Sinn Aw i saradnikasa indometacinom i dijatomitnim mikrokapsulama s (Aw i sar., 2011).

Na Slici 10.12 prikazani su profili brzine rastvaranja CBZ iz uzoraka nakon zavšetka studija stabilnosti. Kako bi se pokazala eventualna razlika između profila brzine rastvaranja pre i posle studije stabilnosti izračunate su vrednosti faktora razlike ( $f_1$ ) i faktora sličnosti ( $f_2$ ) faktora iz srednje vrednosti procenta rastvorenog CBZ u odgovarajućem vremenskom intervalu (FDA, 1995, 1997a, b; Shah i sar., 1999) (Tabela 10.6).



Slika 10.12 – Profili brzine rastvaranja CBZ: A – SSEPS<sub>2</sub> pripremljena metodom B nakon studija stabilnosti; B – SSEPS<sub>1</sub> pripremljena metodom A nakon studija stabilnosti; C – čvrsta disperzija nakon studija stabilnosti; D – čist CBZ.

**Tabela 10.6 - Vrednosti faktora razlike ( $f_1$ ) i faktora sličnosti ( $f_2$ ) za profile brzine rastvaranja CBZ iz ispitivanih SSEPS formulacija i čvrste disperzije nakon studija stabilnosti ( $T_t$  - procenat rastvorenog CBZ) u odnosu na odgovarajuće formulacije pre studija stabilnosti ( $R_t$  - procenat rastvorenog CBZ).**

Vreme [h]	Jednačina	SSEPS <sub>1</sub> (Metod A)	SSEPS <sub>2</sub> (Metod B)	Čvrsta disperzija
2	$f_1 = \{\sum_{t=1}^n  R_t - T_t  / \sum_{t=1}^n R_t\} \times 100$	7.80	8.22	1.70
2	$f_2 = 50 \log\{1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2\}^{-0.5} \times 100$	56.23	55.40	59.54

Faktor  $f_1$  (faktor razlike) proporcionalan je srednjoj razlici između dva poredbena profila, dok faktor  $f_2$  (faktor sličnosti) je obrnuto proporcionalan srednjem kvadratu razlike između dva poredbena profila. Pošto FDA vodiči naglašavaju da ukoliko su vrednosti faktora  $f_1$  u intervalu od 0 – 15 i vrednosti faktora  $f_2$  u intervalu od 50 – 100, profili brzine rastvaranja se mogu smatrati ekvivalentnim, odnosno sličnim.

Izračunate vrednosti ova dva faktora, prikazane u Tabeli 10.6 ukazuju da su profili brzine rastvaranja CBZ iz ispitivanih SSEPS formulacija pre i posle studije stabilnosti ekvivalentni, odnosno slični.

# 11. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA SAMOEMULGUJUĆIH PELETA

## 3.11.1. Materijali i metode

### 11.1.1. Materijali

*Ekscipijensi koji ulaze u sastav samoemulgujućih peleta:* **Labrasol**<sup>®</sup>, PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (Gattefosse, Francuska) je korišćen kao surfaktant (S); **Phosal**<sup>®</sup> **50 PG**, lecitin/propilen-glikol, (Lipoid, Nemačka) je korišćen kao kosurfaktant/korastvarač (C); **Mygliol**<sup>®</sup> **812**, kaprilno/kaprinski triacilgliceroli (Sasol, Nemačka) je korišćen kao ulje (O).

*Ostali ekscipijensi:* Aerosil<sup>®</sup> 200, neporozni koloidni silicijum-dioksid (Evonik Industries AG, Nemačka) je korišćen kao sredstvo protiv lepljenja (*eng. anti-tacky agent*), Methocel<sup>®</sup> E5, hidroksipropilmetilceluloza, (Orpington, UK) (HPMC) je korišćen kao sredstvo za vezivanje (*eng. binding agent*).

*Nosač:* Suglets<sup>®</sup> sugar spheres, šećerne pelete NF 710 – 825 µm (NP pharma S.A., Francuska).

*Lekovita supstanca:* Karbamazepin (CBZ) (BASF AG, Nemačka).

Ostali ekscipijensi su korišćeni bez predhodne pripreme. Prilikom ispitivanja korišćena je isključivo dvostruko destilovana voda (V).

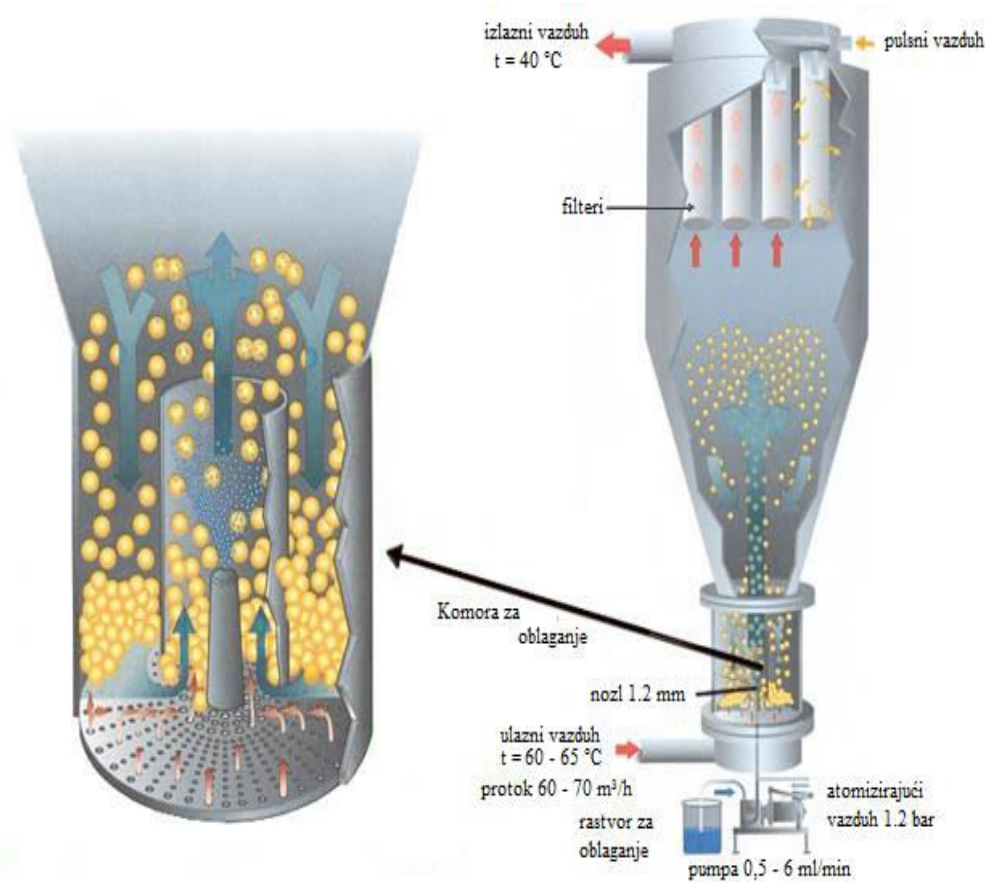
### 11.1.2. Metode

#### 11.1.2.1. Izrada samoemulgujućih peleta karbamazepina

Pelete, obložene sa samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom karbamazepina, pripremljene su korišćenjem uređaja sa fluidizirajućim protokom vazduha sa Wurster – ovim insertom (Aeromatic Strea-1, Niro Inc., Aeromatic-Fielder AG, Bubendorf,

Švajcarska). Uslovi rada su shematski prikazani na Slici 11.1. Uslovi rada komore sa fluidizirajućim protokom vazduha su:

- ulazna temperatura 60–65 °C;
- izlazna temperatura 40 °C;
- protok vazduha 60–70 m<sup>3</sup>/h;
- pritisak atomizirajućeg vazduha 1.2 bar;
- dijametar brizgalice za raspršivanje 1.2 mm.



Slika 11.1 - Shematski prikaz uslova rada na uređaju sa fluidizirajućim protokom vazduha prilikom oblaganja šećernih peleta.

Uslovi rada su optimizovani, prilikom čega niža temperatura ulaznog vazduha kao i niži protok imaju za posledicu konačno lepljenja peleta, verovatno zbog spore brzine sušenja. Sastav rastvora za oblaganje prikazan je u Tabeli 11.1.

**Tabela 11.1 - Sastav rastvora za oblaganje 400 g šećernih peleta**

<i>Komponenta</i>	<i>Količina (g)</i>	<i>Uloga</i>
Karbamazepin (CBZ)	50	Aktivna supstanca
Labrasol <sup>®</sup> (S)	19.2	Surfaktant
Phosal <sup>®</sup> 50 PG (C <sub>s</sub> )	12.8	Kosurfaktant/Kosolvens
Mygliol <sup>®</sup> 812 (O)	8	Ulje
Methocel <sup>®</sup> E5	2	Sredstvo za vezivanje
Aerosil <sup>®</sup> 200	8	Sredstvo protiv lepljenja
Voda/Etanol 9:1	do 800	Disperzioni medijum

Brzina nanošenja rastvora za oblaganje u početku iznosi oko 0.5 ml/min, nakon čega se u toku narednih 20 minuta postepeno povećava do otprilike 6 ml/min. Fosfolipidna suspenzija sa CBZ je obložena na 400 g šećernih peleta nanošenjem rastvora tačno odmerene količine surfaktanta (S), kosurfaktanta/korastvarača (C), ulja (O), HPMC (4 % ( $m_{\text{HPMC}}/m_{\text{cbz}} \times 100$ ) u odnosu na CBZ) kao i karbamazepina (CBZ). Konačan teorijski sadržaj CBZ u samoemulgujućim peletama iznosio 10 % ( $m_{\text{cbz}}/m_{\text{ukupna}}$ ). U rastvoru za raspršivanje je dispergovana odgovarajuća količina Aerosil<sup>®</sup> - a 200, kako bi se sprečilo slepljivanje peleta u toku oblaganja. Finalno sušenje peleta vršeno je na 40°C u toku 15 minuta.

Finalna koncentracija CBZ u peletama određena je spektrofotometrijski na 287 nm. Efikasnost oblaganja određena je na osnovu sledeće formule (Jednačina 11.1):

$$E (\%) = \frac{m(\text{cbz}) + m(\text{prazne pelete}) + m(\text{s}) + m(\text{Cs}) + m(\text{o}) + m(\text{aerosil}) + m(\text{HPMC})}{m(\text{ukupna})} \times 100 \text{ (Jed. 11.1)}$$

gde je  $m$  (cbz) – masa CBZ;  $M$  (s) – masa surfaktanta,  $m$  (Cs) – masa kosurfaktanta/korastvarača;  $m$  (aerosil) – masa Aerosil<sup>®</sup> - a 200;  $m$  (HPMC) – masa – Methocel<sup>®</sup> – a E5.

Pripremljena je i određena količina praznih samoemulgujućih peleta – bez CBZ.

#### **11.1.2.2. Optička mikroskopija samoemulgujućih peleta**

Maloj količini peleta, obloženih samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom CBZ, je dodato nekoliko kapi vode neposredno pre merenja, nakon čega su pelete prekrivene pokrovnim staklom i posmatrane pomoću optičkog mikroskopa Axioscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Nemačka) sa integrisanom kamerom i integralnim softverom Easy-Measur (Inteq Informationstechnik GmbH, Berlin, Nemačka) za analizu fotografija.

#### **11.1.2.3. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije**

Prosečna veličina prečnika kapi je određena korišćenjem Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija) uređaja sa He-Ne laserom na 633 nm pri temperaturi od  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Merenje je izvršeno pod fiksnim uglom od  $90^\circ$ . Iz raspodele intenziteta, korišćenjem softvera za statističku analizu podataka, izračunata je prosečna vrednost prečnika kapi (Z-Ave), kao i indeks polidisperznosti (PDI) iz tri uzastopna merenja. Tačno odmerena količina praznih samoemulgujućih peleta, kao i samoemulgujućih peleta sa CBZ, je mešana u toku 30 minuta sa odgovarajućom količinom vode, tako da odnos mase lipidnih materijala ( $m_s + m_{Cs} + m_o$ ), nanešenih na pelete, i vode iznosi  $1/100$  ( $(m_s + m_{Cs} + m_o) / m_{\text{vode}} = 1/100$ ). Uzorak od 4 ml je centrifugiran 1 min na 1000 o/min korišćenjem Tehnica lc 320, (Železniki, Slovenija) i supernatant je korišćen za analizu.

#### **11.1.2.4. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije**

DSC analiza praznih samoemulgujućih peleta kao i peleta obloženih samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom CBZ vršena je korišćenjem DSC 821 (Mettler Toledo AG, Nemačka) uređaja. Tačno odmerena količina uzorka (10 - 12 mg) je zagrevana u temperaturnom opsegu 20 – 220 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C/min. Merenja su vršena u struji azota N<sub>2</sub> korišćenjem praznog aluminijumskog lončića kao referentnog standarda (slepa proba). Postojanje endotermnih i/ili egzotermnih pikova ukazuje na prisustvo određene kristalne forme CBZ.

#### **11.1.2.5. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom difrakcije X-zraka**

Difrakcija X – zraka uzoraka peleta vršena je korišćenjem uređaja Bruker D8 Advance difraktometra opremljenog sa bakarnom katodom ( $\lambda = 0.15418$  nm, 40 kV, 20 mA). Merenja su vršena pri širini koraka merenja od 0.02° na 2  $\theta$  između 4° i 40°, na sobnoj temperaturi. Postojanje karakterističnih pikova ukazuje na prisustvo određene kristalne forme CBZ.

#### **11.1.2.6. *In vitro* ispitivanje brzina rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta**

Profil brzine rastvaranja karbamazepina iz ispitivanih samoemulgujućih peleta kao i čistog CBZ dobijeni su korišćenjem VanKel 700 (Vankel Industries, SAD) aparata sa ispitivanje brzine rastvaranja sa rotirajućim korpicama. Kao medijum je korišćena 0.1 M HCl na 37 °C. U odgovarajućim vremenskim intervalima (10, 20, 30 i 45 min) uzorkovano je 4 ml uzorka i profiltrirano kroz 0.45  $\mu$ m filter. Količina rastvorenog CBZ određena je spektrofotometrijski korišćenjem UV-2101 Shimadzu Scientific Instruments (Columbia, SAD) uređaja na 287 nm.

## 11.2. Rezultati i diskusija

### 11.2.1. Oblaganje samoemulgujućih peleta

Prilikom oblaganja peleta korišćenjem komore sa fluidizirajućim protokom vazduha radni uslovi su od krucijalnog značaja i moraju biti optimizovani. Osnovni radni uslovi koji se mogu menjati su (Cole, 2002):

- Pritisak atomizirajućeg vazduha,
- Udaljenost prskalice (*eng. spray gun*) od peleta,
- Dizajn prskalice,
- Dijametar i oblik prskalice,
- Ugao raspršivanja,
- Protok i temperatura vazduha,
- Brzina nanošenja rastvora za oblaganje i drugi.

Neophodno je obezbediti da kapi raspršenog rastvora za oblaganje prilikom kontakta sa površinom peleta budu parcijalno osušene. Sastav rastvora za oblaganje mora biti takav da obezbedi da se parcijalno osušene kapi zalepe za površinu peleta na koje se nanose. Ukoliko je sušenje kapi presporo dolazi do preteranog vlaženja površine peleta (*eng. overwetting*), što za posledicu ima lepljenje peleta, a ako je sušenje raspršenih kapi prebrzo dolazi do sušenja raspršivanjem (*eng. spray drying*), što za posledicu ima malu efikasnost oblaganja. Povećanjem pritiska atomizirajućeg vazduha mogu se dobiti kapi manjeg dijametra, iz kojih rastvor brže isparava, dok povećanjem temperature ulaznog vazduha intenzitet i brzina sušenja se povećavaju. Međutim, nakon inicijalnog nanošenja rastvora za oblaganje neophodno je da i ostatak disperznog medijuma brzo ispari kako bi se sprečilo eventualno lepljenje peleta. Protok vazduha takođe mora biti optimalan da bi se obezbedilo ravnomerno i efikasno oblaganje i sušenje peleta kao i razdvajanje međusobno slepljenih peleta. Optimizacijom ovih uslova može se postići zadovoljavajuća efikasnost i uniformnost oblaganja. Pozicija prskalice često nije od krucijalnog značaja, mada je



najbolje postaviti prskalicu uvek u istu poziciju kako bi se adekvatno reprodukovali rezultati (Cole, 2002).

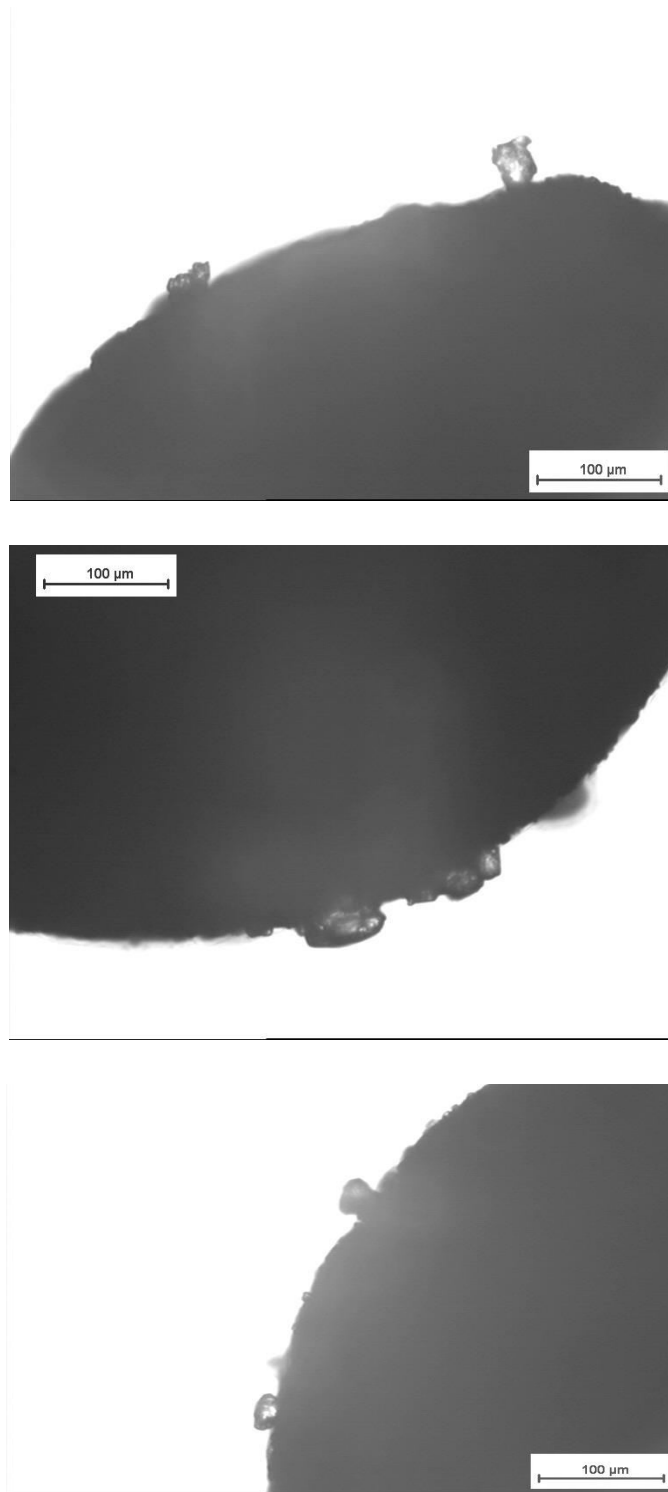
Methocel<sup>®</sup> - a E5 (2 % (m/m) vodeni rastvor na 20°C poseduje viskozitet od 5 mPa) (Cole, 2002) se vrlo često koristi kao sredstvo za vezivanje u koncentraciji od 2 – 5 % (m/v) (Rowe i sar., 2006). Međutim, pošto rastvor za oblaganje, koji se koristi prilikom izrade samoemulgujućih peleta, sadrži rastvorene lipidne ekscipijense, koji sami po sebi imaju efekat sredstva za vezivanje, nije bila neophodna visoka koncentracija HPMC – a da bi se postiglo efikasno vezivanje CBZ na površinu peleta (0.25 % m/v; 4 % u odnosu na CBZ).

Koloidni silicijum-dioksid se često dodaje kao sredstvo protiv lepljenja prilikom oblaganja peleta zbog dobrih adsorptivnih karakteristika (Cole, 2002; Rowe i sar., 2006). Udeo koloidnog silicijum-dioksida je postepeno povećavan, uz istovremeno smanjenje HPMC – a kako bi se postiglo efikasno oblaganje peleta bez međusobnog slepljivanja. Konačna koncentracija koloidnog silicijum-dioksida koji je dispergovan u medijumu za oblaganje, iznosila je 1 % (m/v) odnosno 16 % u odnosu na CBZ ( $m_{\text{aerosil}}/m_{\text{cbz}} \times 100$ ).

Finalna koncentracija CBZ u peletama iznosila je 9.88 % ( $m_{\text{cbz}}/m_{\text{ukupna}} \times 100$ ). Efikasnost oblaganja izračunata je korišćenjem jednačine (Jednačina 11.1) i iznosi  $E = 94$  %.

### **11.2.2. Optička mikroskopija samoemulgujućih peleta**

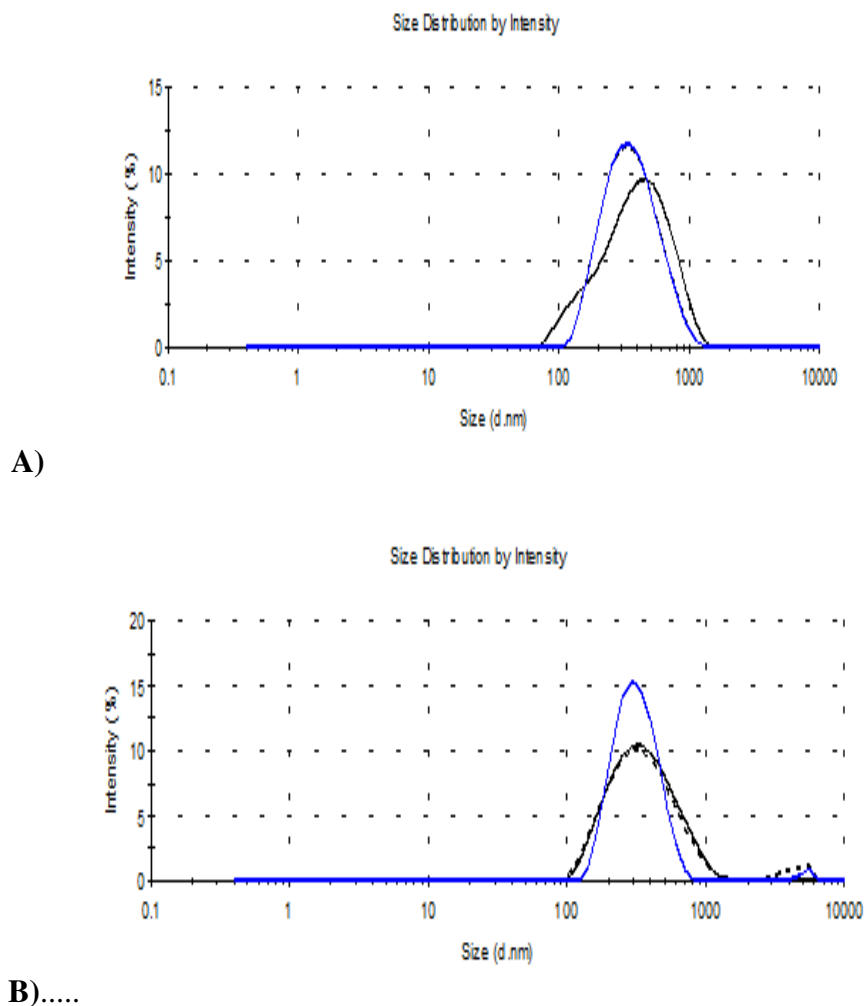
Posmatranjem peleta obloženih samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom CBZ pomoću svetlosnog mikroskopa uočene su kristalne formacije CBZ na njihovoj površini (Slika 11.2), međutim da bi se tačno utvrdilo u kom polimorfnom obliku je CBZ prisutan, neophodna su dalja ispitivanja DSC i XRD analizom.



Slika 11.2. Slike različitih delova površine samoemulgujuće pelete sa kristalima CBZ dobijenih optičkom miroskopijom

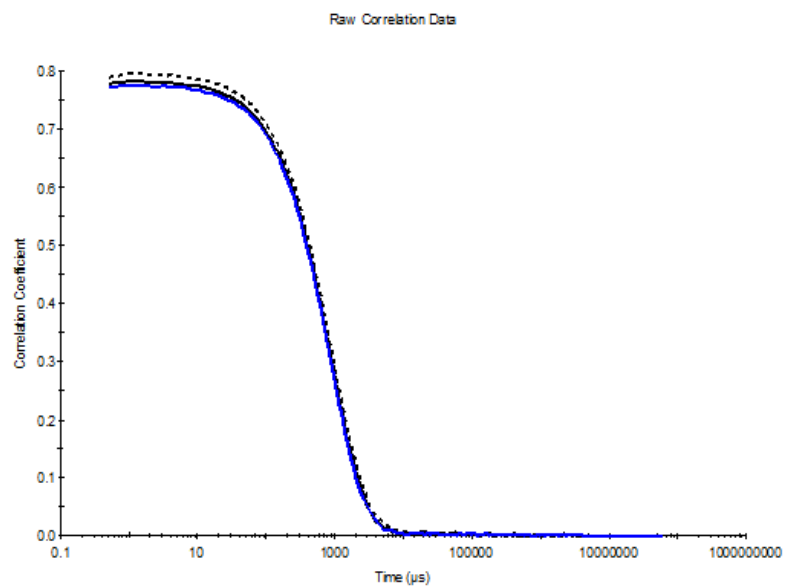
### 11.2.3. Određivanje prosečne veličine prečnika kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije

Prosečna veličina prečnika kapi ispitivanog sistema bez i sa CBZ pri 100x razblaženju (u odnosu na sadržaj lipidnih ekscipijenasa) sa vodom prikazana je na Tabeli 11.2 i Slici 11.3A; B i Slici 11.4A;B.

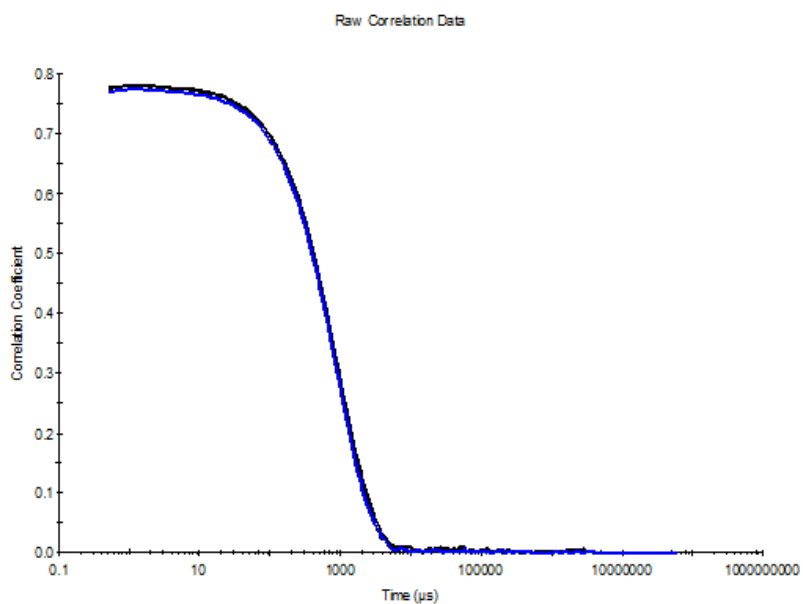


Slika 11.3 - Raspodela veličine prečnika kapi<sup>13</sup> prema intenzitetu<sup>14</sup> kod samoemulgjućih peleta bez CBZ, (A), kao i samoemulgjućih peleta sa CBZ (B),  $K_m$  3:2; SC/O 8:2. Uzorci su mereni pri 100 x razblaženju (u odnosu na sadržaj lipidnih ekscipijenasa) sa vodom

<sup>13</sup> Size (d.nm)



**A)**



**B)**

Slika 11.4 - Korelaciona funkcija<sup>15</sup> kod samoemulgujućih peleta bez CBZ, **(A)**, kao i samoemulgujućih peleta sa CBZ **(B)**,  $K_m$  3:2; SC/O 8:2. Uzorci su mereni pri 100 x razblaženju (u odnosu na sadržaj lipidnih ekscipijenasa) sa vodom

<sup>14</sup> Intensity (%)

<sup>15</sup> Koeficijent korelacije vs Vreme ( $\mu s$ ) – eng. Correlation function vs Time ( $\mu s$ )

Može se tvrditi da pri velikim razblaženjima sa vodom ispitivane samoemulgujuće pelete formiraju emulziju sa relativno visokom prosečnom vrednošću veličine prečnika kapi (Tabela 11.2), ali i dalje u okviru vrednosti koje se prepisuju emulzijama (Gursoy i Benita, 2004; Pouton i Porter 2008). Visoke vrednosti indeksa polidisperznosti, kao i pokazane razlike u širini raspodele veličine prečnika kapi u toku uzastopnih merenja ispitivanog uzorka (Slika 11.3A; B) ukazuju da je, nakon razblaženja, sistem relativno nestabilan i da se veličina formiranih kapi brzo menja. Ipak odstupanja na početnim delovima bazne linije autokorelacione funkcije samoemulgujućih peleta bez CBZ ukazuju da su se u toku intervala merenja formirale kapi šireg intervala veličine prečnika. Nakon razblaženja formira se termodinamički sistem koji je relativno nestabilan usled čega dolazi do aktivne konverzije veličine prečnika kapi (Slika 11.4A). Odstupanja u završnom delu bazne linije autokorelacione funkcije samoemulgujućih peleta sa CBZ takođe ukazuju na termodinamičku nestabilnost (Slika 11.4B). Postojanje kapi sa relativno višom vrednošću prosečne veličine prečnika kao i malog udela znatno većih kapi (Tabela 11.2) kao i nešto višom prosečnom vrednošću indeksa polidisperznosti ukazuju da CBZ dovodi do dalje destabilizacije sistema.

**Tabela 11.2 - Prosečna veličina prečnika kapi (Z-Ave) i indeks polidisperznosti (PdI) pri 100 x razblaženju (u odnosu na sadržaj lipidnih ekscipijenasa) sa vodom**

	Z-Ave ± S.D.	PdI ± S.D.	Pik 1	Pik 2	Pik 1	Pik 2
			Z-Ave (nm)	Z-Ave (nm)	P Int (%)	P Int (%)
Samoemulgujuće pelete bez CBZ	305.8 ±0.233	0.212 ± 0.12	384.9	0	100	0
Samoemulgujuće pelete sa CBZ	298.9 ±0.685	0.205±0.16	326.2	5181	98.6	1.6

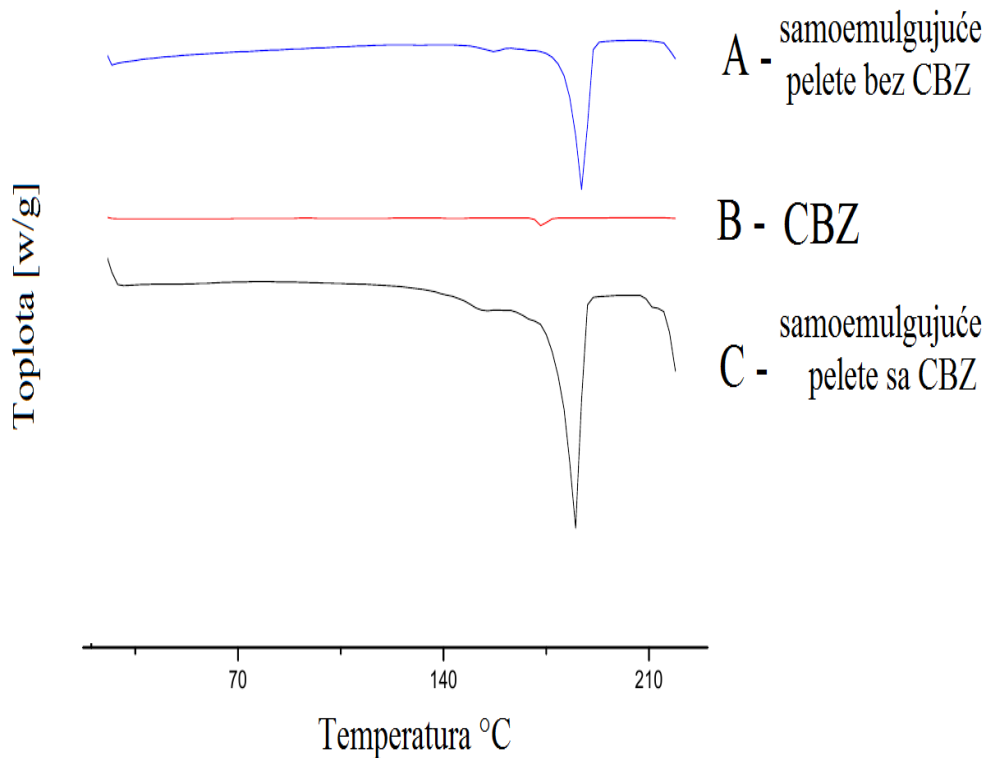
CBZ poseduje parametar kritičnog pakovanja CPP >1 (*eng.* Critical Packing Parameter) jer se molekul CBZ sastoji od velikog hidrofobnog dela i malog hidrofilnog dela, zbog čega teži da formira reverzne micelle. U polarnom medijumu u toku solubilizacije, CBZ se pozicionira blizu površine međupovršinskog filma uzorkujući destabilizaciju i povećanu

interakciju među kapima, koja se ogleda kroz formiranje većih kapi unutrašnje faze i šire raspodele veličine prečnika kapi (Tabela 11.2) (Israelachvili i sar., 1976). Do viših vrednosti prosečne veličine prečnika kapi i indeksa polidisperznosti praznih samoemulgujućih peleta kao i samoemulgujućih peleta sa CBZ u odnosu na odgovarajuće SEPS formulacije sa dijatomitnim mikrokapsulama objašnjenih u drugom delu istraživanja, najverovatnije dolazi usled prisustva HPMC. Takođe je poznato da porozni silicijum-dioksid (npr. dijatomitne mikrokapsule) može imati znatan uticaj na veličinu kapi samoemulgujućeg sistema (Lim i sar., 2011).

#### **11.2.4. Karakterizacija samoemulgujućih peleta primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i difrakcije X-zraka**

Rezultati DSC analize samoemulgujućih peleta (Slika 11.5 A), samoemulgujućih peleta bez CBZ (Slika 11.5B) i čistog CBZ (Slika 11.5C) prikazani su na Slici 11.5. DSC analiza samoemulgujućih peleta sa i bez CBZ je pokazala oštar endotermni pik topljenja na 193.2°C, malo iznad endoternog pika topljenja ( $\approx 191.2^\circ\text{C}$ ) karakterističnog za sve forme CBZ (Grzesiak i sar., 2003).

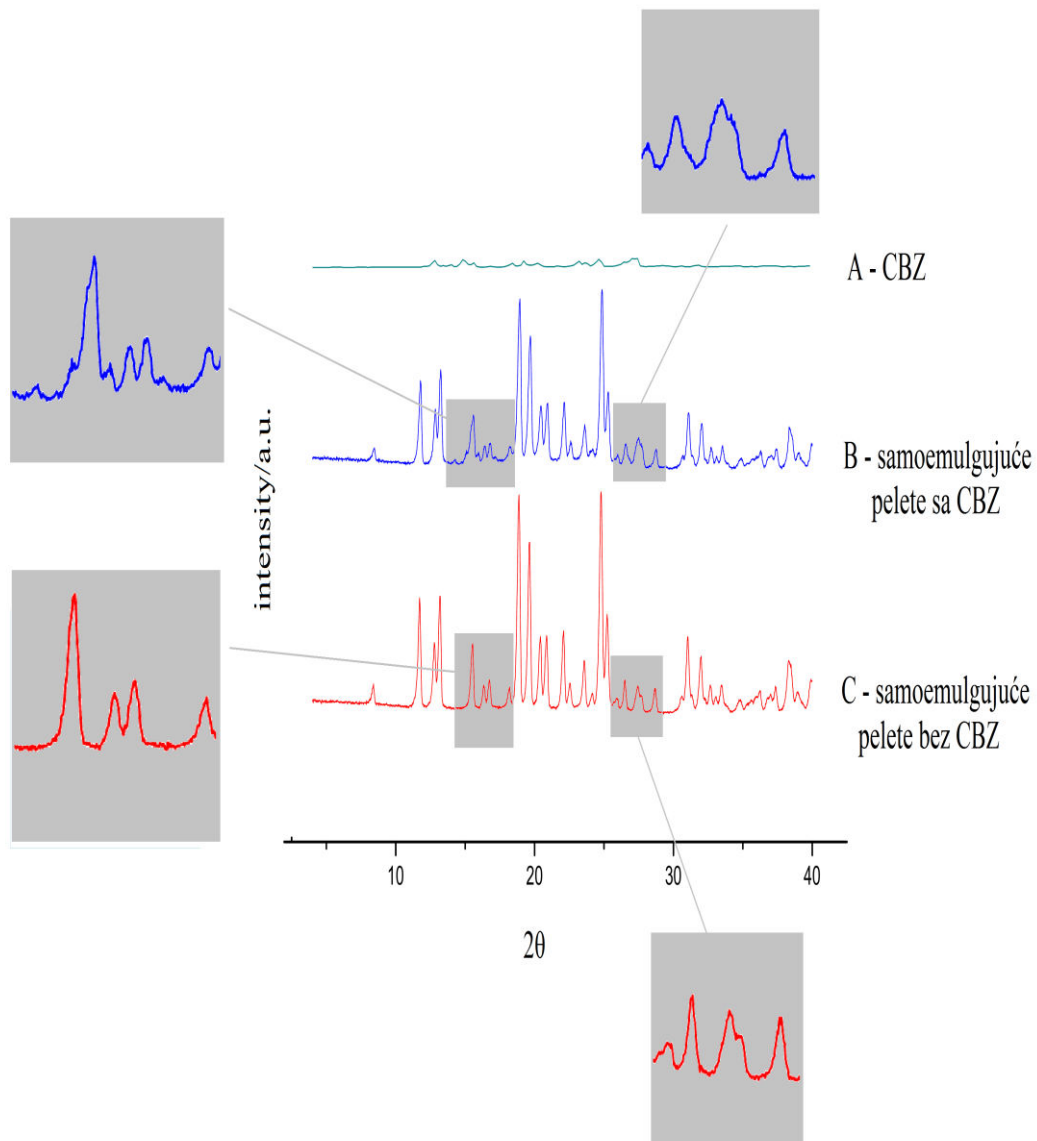
Intenzitet signala pikova samoemulgujućih peleta poreden je sa 10 % intenziteta signala CBZ, što odgovara teorijskom sadržaju CBZ u samoemulgujućim peletama. Intenzitet signala je znatno veći nego što odgovara teorijskom sadržaju CBZ (Slika 11.5 B; C). Razlog za to je što se prazne šećerne pelete takođe tope na predhodno pomenutoj temperaturi (Zhang i sar., 2008) (Slika 11.5A). Endotermni pad oznad 215°C ukazuje na početak degradacije sistema. Zbog toga je bilo neophodno uraditi XRD analizu ispitivanih uzoraka.



Slika 11.5 - DSC krive samoemulgujućih peleta: A – samoemulgujuće pelete bez CBZ; B – CBZ forma III, 10 % intenziteta signala; C - samoemulgujuće pelete sa CBZ (sadržaj CBZ 9.88 % ( $m_{cbz}/m_{ukupno}$ ))

Na Slici 11.6 prikazani su XRD dijagrami čistog CBZ (10 % inteziteta signala) (Slika 11.6A), samoemulgujućih peleta sa CBZ (Slika 11.6B) i samoemulgujućih peleta bez CBZ (Slika 11.6C). XRD dijagram praznih samoemulgujućih peleta pokazuje karakteristične pikove kristala saharoze (Leinen i Labuza, 2006). Intenzitet signala je opet znatno veći nego što odgovara teorijskom sadržaju CBZ (Slika 11.6A;C), međutim između XRD dijagrama samoemulgujućih peleta bez CBZ i dijagrama samoemulgujućih peleta sa CBZ uočene se male razlike (Slika 11.6). Postojanje novih malih pikova, kao i deformacija postojećih, uzimajući u obzir količinu prisutnog CBZ na vrednostima  $2\theta$  u opsegu  $2\theta = 15 - 19$  i  $2\theta = 26 - 29$  ukazuje da je CBZ prisutan u P – monokliničkom polimorfnom obliku

(forma III), međutim tačan udeo CBZ koji je prisutan u ovom kristalnom obliku nije poznat (Slika 11.6) (Grzesiak i sar., 2003).



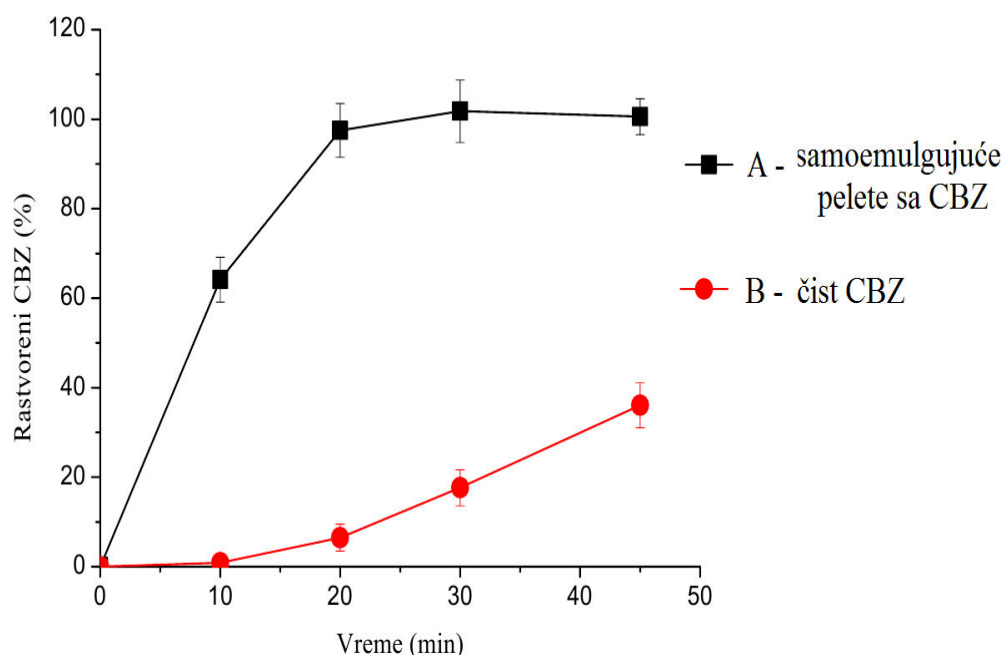
Slika 11.6 - XRD dijagrami: A – CBZ forma III, 10 % intenziteta; B – samoemulgujuće pelete sa CBZ (sadržaj CBZ 9.88 % ( $m_{cbz}/m_{ukupno}$ )); C – samoemulgujuće pelete bez CBZ



Velika prednost predhodno opisane metode pripreme samoemulgujućih peleta je što, nakon pripreme, CBZ ostaje u polimorfnom obliku koji je prihvatljiv za farmaceutsku upotrebu – P – monokliničkom obliku (Ph. Eur).

### 11.2.5 - *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta

Profili brzine rastvaranja CBZ iz samoemulgujućih peleta i čistog CBZ u 0.1 M HCl prikazani su na Slici 11.7. Kao slepa proba za samoemulgujuće pelete sa CBZ korišćeni su alikvoti uzeti od praznih peleta u odgovarajućem vremenskom intervalu, dok za čist CBZ je korišćen medijum.



Slika 11.7 - Profile brzine rastvaranja CBZ: A – samoemulgjuće pelete sa CBZ (sadržaj CBZ 9.88 % ( $m_{cbz}/m_{ukupno}$ )); B – čist CBZ

Može se zaključiti da je brzina rastvaranja CBZ iz peleta na koje je obložena samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija CBZ znatno brža u odnosu na čist CBZ. Prisustvo samoemulgujućeg sistema, bogatog surfaktantima, svakako doprinosi većoj brzini rastvaranja CBZ, ali značajan doprinos ima i velika površina peleta.

## 12. *IN VITRO* DINAMIČKA LIPOLIZA ČVRSTIH SAMOMIKROEMULGUJUĆIH SISTEMA (SSMEDDS) ZA ORALNU PRIMENU

### 12.1. Materijali i metode

#### 12.1.1. Materijali

*Ekscipijensi koji ulaze u sastav medijuma za dinamički in vitro model lipolize - Pankreatin*, ekstrakt svinjskog pankreasa,  $\geq 3\times$  USP specifikacija (1 mg pankreatina poseduje aktivnost lipaze najmanje 2.0 USP jedinice, USP30, NF25) (Sigma Aldrich, SAD), *4 - Bromfenilboronska kiselina* je korišćena kao inhibitor aktivnosti lipaze (Sigma Aldrich, SAD), *Phospholipon® 90 G*, 94 – 102 % lecitina (Phospholipid GmbH, Nemačka), *Natrijum-hlorid* (Merc), *Kalcijum-hlorid* (Merc, SAD), *Natrijum-tauroholat hidrat* (Sigma Aldrich, SAD), *Trizma® maleat* (Sigma Aldrich, SAD), *Natrijum-hidroksid* (Merc, SAD).

*Lekovita supstanca:* Karbamazepin (CBZ) (Ph. Jug V).

Ispitivane su polisorbat 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O), SC/O 8:2;  $K_m$  1:1, SSMEDDS formulacije sa sledećim nosačima; NUFL2 - Neusilin® UFL2; NFL2 - Neusilin® FL2; SYL350 - Sylvania® 350 i SYL320 - Sylvania® 320 (Tabela 12.1).

Ostali ekscipijensi su korišćeni bez predhodne pripreme. Prilikom ispitivanja korišćena je isključivo dvostruko destilovana voda (V).

**Tabela 12.1 – Sastav čvrstih samomikroemulgujućih formulacija (SMEDDS) za dinamičku *in vitro* lipolizu**

SMEDDS (CBZ 3,37 % (m/m))	Adsorbens	Adsorbens/SMEDDS	Oznaka
polisorbat 80-(20)-sorbitanmonooleat (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O), SC/O odnos 8/2 sa CBZ rastvorenim u smeši	Neusilin® UFL2	1/1	MC NUFL2
		1/2	MC2 NUFL2
	Neusilin® FL2	1/1	MC NFL2
	Sylsia® 320	1/1	MC SYL 320
	Sylsia® 350	1/1	MC SYL 350

### 12.1.2. Metode

#### 12.1.2.1. Dinamički *in vitro* model lipolize

Korišćen je modifikovani model iz Kopenhagena (Tabela 6.1). Sastav medijuma za lipolizu je prikazan u Tabeli 12.2.

**Tabela 12.2 - Sastav medijuma za dinamičku *in vitro* lipolizu (Zangenberg i sar., 2001a; 2001b; Sek i sar., 2002)**

Vrsta ekscipijensa	Jedinica mere	Vrednost
NaCl	mM	150
Trizma® maleat	mM	2
Lecitin	mM	1,25
Ca <sup>2+</sup>	mmol Ca <sup>2+</sup> /min	0,181
Na-tauroholat	mM	5
Aktivnost lipase	USP unit/ml	810
Ukupan volume	ml	50

Rastvor pankreatina je pripremljen neposredno pre upotrebe kako bi se sačuvala aktivnost pankreasne lipaze. 6,75 g praška pankreatina je pomešano sa 35 ml pufera Tris-maleata (2 mM Trizma<sup>®</sup> maleata, 150 mM NaCl, pH = 6.5) na magnetnoj mešalici u toku 15 min. Nakon toga disperzija pankreatina je centrifugirana 15 min na 4000 o/min korišćenjem SIGMA 2-6E (SIGMA, Nemačka) centrifuge i odvojen je supernatant. Lecitin i Na-tauroholat su predhodno rastvoreni u puferu Tris-maleata mešanjem preko noći na magnetnoj mešalici. Odgovarajuća količina ovog rastvora dodata je sveže pripremljenom supernatantu pankreatina i rastvor je dopunjen do 50 ml sa puferom Tris-maleata (finalna koncentracija lecitina je 1.25 mM, Na-tauroholata 5 mM, dok je teorijska aktivnost pankreasne lipaze iznosila 810 USP unit/ml). Pripremljena je još jedna mera medijuma za lipolizu čija je pH podešena na pH = 6.5, koja je čuvana na ledu, radi dopune u toku dinamičke *in vitro* lipolize, nakon uzorkovanja u određenim vremenskim intervalima.

pH medijuma za lipolizu je naknadno podešen na pH = 6.5. Temperatura medijuma je održavana u opsegu 36 - 38°C uz stalnu temperaturnu kontrolu, kako bi se obezbedila adekvatna aktivnost pankreasne lipaze. Medijum za lipolizu je kontinuirano mešan bez promene brzine mešanja u toku rada. Tačno odmerena količina SSMEDDS formulacije koja sadrži oko 30 mg lipida je direktno stavljena u medijum za lipolizu. Rastvor CaCl<sub>2</sub>, koncentracije 1,81mol/l, je kontinuirano dodavan u medijum pomoću Dosimat 776 (Metrohm, Švajcarska) titratora brzinom od 100 µl/min. pH medijuma je održavan konstantnim u toku 30 minuta na pH = 6.5 titriranjem sa 1 M rastvorom NaOH pomoću 718 STAT Titrino (Metrohm, Švajcarska) titratora. Pre testa za svaku formulaciju je pripremljen svež medijum. Takođe je urađena i slepa proba titriranjem praznog, sveže pripremljenog medijuma, i dobijene vrednosti su uzete u obzir prilikom izračunavanja količine neutralisanih masnih kiselina oslobođenih dejstvom lipaze. Okvirne vrednosti % lipolize određene su na osnovu teorijskog sadržaja masnih kiselina u kaprilno/kaprinskom triacilglicerolu, uzimajući u obzir da je molarna masa ulja  $\approx 372,54 \text{ g/mol}$ <sup>16</sup> i da svaki mol triacilglicerola oslobađa tri masne kiseline prilikom lipolize.

---

<sup>16</sup> <http://www.jianghuichem.com/template/ODO.htm>, Poslednji pristup 22.09.2013

### 12.1.2.2. Stepen lipolize i određivanje sadržaja CBZ iz čvrstih SSMEEDDS u toku *in vitro* dinamičke lipolize

U određenim vremenskim intervalima u toku *in vitro* dinamičke lipolize (5, 10, 15, 20 i 30 minuta) uzorkovano je 2 ml medijuma u koji je odmah dodato 20 µl 0.5 M rastvora 4-bromfenilboronske kiseline, koji je takođe držan na 37°C. Nakon uzorkovanja, radi održavanja konstantne zapremine i aktivnosti pankreasne lipaze, vraćeno je 2 ml svežeg medijuma. Uzorci su centrifugirani 30 minuta na 4000 o/min korišćenjem SIGMA 2-6E (SIGMA, Nemačka) centrifuge. Nakon centrifugiranja uzorci su pokazivali dve faze, gornju vodenu fazu i donju fazu pelete.

Koncentracija CBZ u obe faze je određivana HPLC metodom korišćenjem Agilent 1100 HPLC sistema sa *ChemStation* integralnim softverom za obradu podataka. Analiza je vršena pod sledećim uslovima:

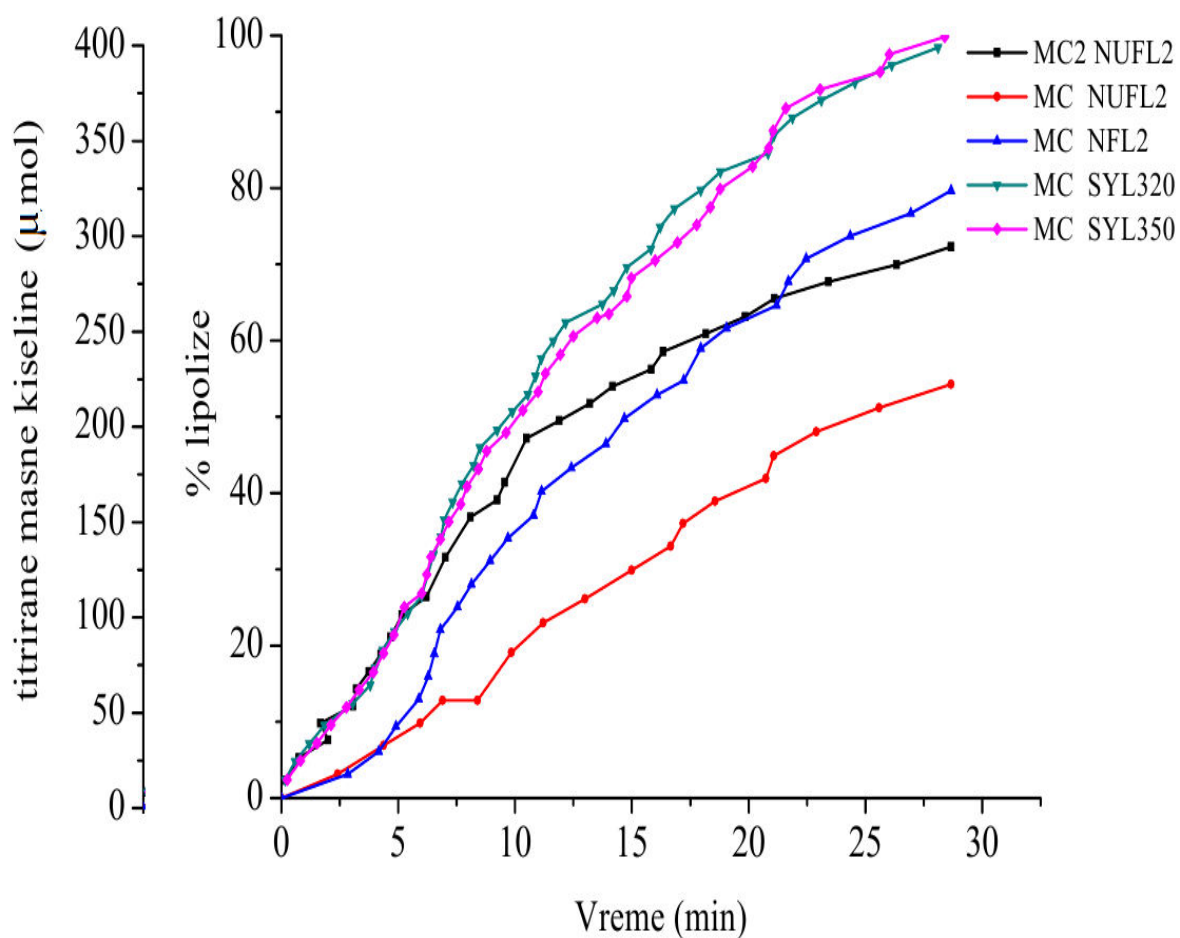
- Kolona – Zorbax SB C – 18, 250 x 4.6 mm, veličina čestica 5 µm,
- Temperature kolone – 40°C,
- Protok: 0.5 ml/min,
- Zapremina injektovanja – 20 µl,
- Mobilna faza (MF) – MeOH: H<sub>2</sub>O = 70 : 30.

Izvršena je kalibracija u 7 tačaka, kako bi se pokrio širok opseg koncentracija CBZ (0,001689 – 0,08445 mg/ml). Faktor korelacije je iznosio  $R = 0,99992$ .

Uzorci vodene faze pre injektovanja su razblaženi sa mobilnom fazom kako bi koncentracija CBZ bila u opsegu kalibracione krive. Uzorcima faze pelete dodato je 10 ml etanola i 50 µl 1 M HCl, nakon čega su ostavljeni na ultrasoničnom kupatilu 15 minuta kako bi se eventualno prisutan CBZ rastvorio. Nakon toga uzorci su razblaženi sa MF kako bi koncentracija CBZ bila u opsegu kalibracione krive.

## 12.2. Rezultati i diskusija

Na Slici 12.1 prikazana je zavisnost stepena lipolize masnih kiselina (%) odnosno količine masnih kiselina ( $\mu\text{mol}$ ) u ispitivanim SSMEDDS formulacijama i vremena trajanja testa (min) (Slika 12.1).



Slika 12.1 - Krive zavisnosti lipolize masnih kiselina (%) odnosno količine titriranih masnih kiselina ( $\mu\text{mol}$ ) od vremena trajanja (min) dinamičke *in vitro* lipolize

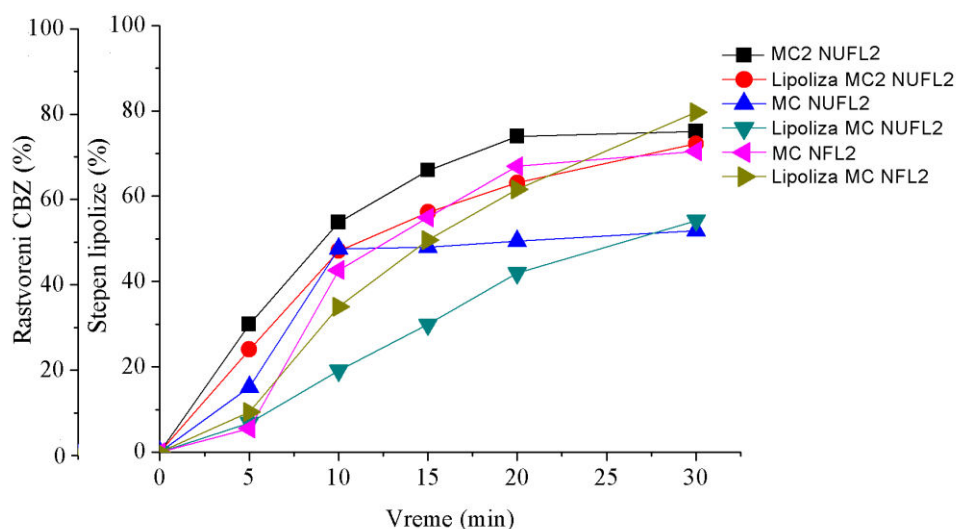
Pankreatin, dobijen ekstrakcijom svinjskog pankreasa, ima jako sličan sastav kao ljudski pankreatin (Lauwers i Scharpé, 1997). Pankreasna lipaza hidrolizuje triacilglicerole na  $sn_1$  i  $sn_3$  poziciji oslobađajući dve masne kiseline i 2-monoglicerid. 2-monoglicerid može sponatno da pređe u 1- ili 3 – monoglicerid koju su supstrati pankreasne lipaze. Hidrolizu na  $sn_2$  poziciji vrši fosfolipaza  $A_2$ , koja je takođe prisutna u pankreatinu.

Za punu aktivnost pankreasne lipaze neophodni su jon  $Ca^{2+}$  i ulje/voda međupovršina (Embleton i Pouton, 1997). Prilikom lipolize lipidnih formulacija može da dođe do pada kapaciteta solubilizacije formulacije za lekovitu supstancu što uzrokuje njenu precipitaciju (Sassene i sar., 2010).

Posmatrajući krive zavisnosti količine titriranih masnih kiselina odnosno stepena lipolize (%), od vremena trajanja testa, može se uočiti da se lipoliza intenzivnije dešava u SSMEDDS formulacijama sa SYL320 i SYL 350 poroznim adsorbensima u odnosu na SSMEDDS formulacije sa NUFL2 i NFL2 adsorbensima (Slika 12.1). Najverovatnije da drugačija struktura i hemijski sastav površine adsorbensa na bazi silicijum-dioksida čini SMEDDS formulaciju dostupnijom pankreasnoj lipazi u odnosu na adsorbense na bazi magnezijum-aluminometasilikata. Ovo je u skladu sa rezultatima Agarwal – a i saradnika u kojima je prikazano da adsorbensi na bazi magnezijum-aluminometasilikata imaju tendenciju da smanje desorpciju lipidnog sistema uzorkujući smanjeni stepen oslobađanja lekovite supstance (Agarwal i sar., 2009).

Stepen lipolize (% oslobodjenih masnih kiselina istitriranih sa 1M NaOH) je u jakoj korelaciji sa količinom rastvorenog CBZ (%) oslobodjenog prilikom *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja CBZ (Slika 12.2).





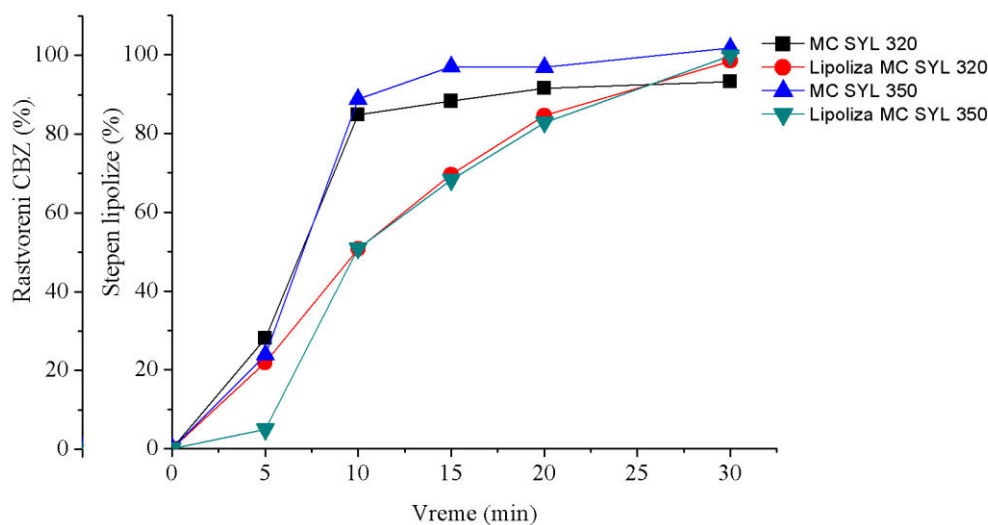
Slika 12.2 – Profili brzine rastvaranja CBZ i profili lipolize lipida iz MC2 NUFL2, MC NUFL2 i MC NFL2 formulacije

Koeficijenti korelacije između rastvorenog CBZ (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepena lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize za MC2 NUFL2, MC NUFL2 kao i MC NFL2 SSMEDDS formulacije predstavljani su u Tabeli 12.3.

Tabela 12.3 – Koeficijent korelacije između rastvorenog CBZ (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepena lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize

Naziv formulacije	Koeficijent korelacije
MC2 NUFL2	0,9935
MC NUFL2	0,8544
MC NFL2	0,9764
MC SYL 320	0,9346
MC SYL 350	0,9424

Posmatranjem faktora korelacije može se zaključiti da su rastvoreni CBZ (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepen lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize u visokoj korelaciji ( $R > 0.9$  izuzev kod MC NUFL2 SSMEDDS formulacije). Na osnovu toga može se zaključiti da su faktori koji određuju dostupnost CBZ za rastvaranje kao i faktori koji određuju dostupnost lipida za lipolizu jako slični i da najverovatnije obuhvataju samo fizičko-hemijske karakteristike površine adsorbensa. Razlog nešto niže vrednosti koeficijenta korelacije kod MC NUFL2 formulacije (Tabela 12.3) može biti zato što u ovoj formulaciji odnos specifične površine ( NUFL2 – 300 m<sup>2</sup>/g) i lipidnog sistema je najveći (tabela 12.1) pa eventualne interakcije koje se dešavaju na površini adsorbensa su najizraženije. Isti trend primećen je i kod MC SYL 320 i MC SYL 350 SSMEDDS formulacija (Slika 12.3; Tabela 12.3).

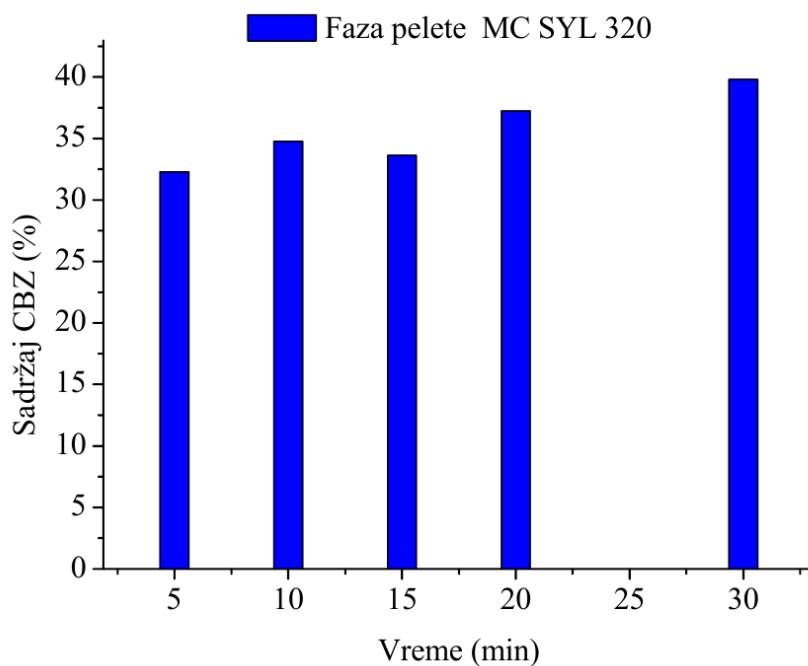


Slika 12.3 – Profili brzine rastvaranja CBZ i profili lipolize lipida iz MC SYL 320 i MC SYL 350 formulacija

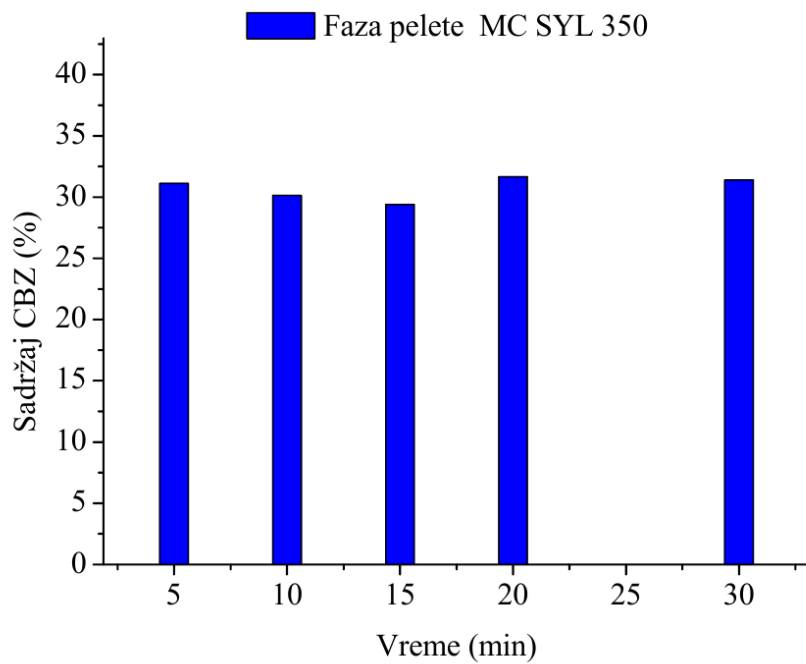
Korelacije između rastvorenog CBZ (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepena lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize kod formulacija MC SYL 320 i MC SYL350 je značajna ( $R > 0.99$ ) (Tabela 12.3).

Ipak, pri predhodno opisanim radnim uslovima dinamičkog *in vitro* modela lipolize CBZ se jako brzo oslobađa iz formulacija, iako se lipoliza postepeno dešava, uzorkujući da kod skoro svih SSMEDDS formulacija koncentracija CBZ u vodenoj fazi već u prvih 5 minuta bude najveća i da kako lipoliza odmiče, koncentracija CBZ u ovoj fazi postepeno opada (Slika 12.4A; B; C; D; E). Stepen lipolize kod SSMEDDS formulacija sa adsorbensima na bazi magnezijum-aluminometasilikata je u jakoj korelaciji sa specifičnom površinom, jer MC2 formulacija NUFL2 (SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup>UFL2 = **2/1**, površina NUFL2 **300 m<sup>2</sup>/g**, stepen lipolize nakon 30 minuta **72.29 %**) i MC formulacija NFL2 (SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup>FL2 = **1/1**, površina NFL2 **150 m<sup>2</sup>/g**, stepen lipolize nakon 30 minuta **79.64 %**) pokazuju jako sličan stepen lipolize (Slika 12.1), dok MC formulacija NUFL2 (SMEDDS/Neusilin<sup>®</sup>UFL2 = **1/1**, površina NUFL2 **300 m<sup>2</sup>/g**, stepen lipolize nakon 30 minuta **54.29 %**) pokazuje manji. Ovo ukazuje da je količina SMEDDS formulacije koja je dostupna za lipolizu u korelaciji sa specifičnom površinom. Može se primetiti da u toku trajanja testa količina CBZ se blago povećava u fazi pelete, a smanjuje u vodenoj fazi (Slika 12.4A; B; C; D; E i Slika 12.5A; B; C; D; E) što ukazuje da se prilikom lipolize smanjuje kapacitet solubilizacije polisorbata 80(S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) SMEDDS formulacije za CBZ, ali to povećanje, odnosno smanjenje, nije veliko i iznosi od 1 – 7 % (Slika 12.4A; B; C; D; E i Slika 12.5A; B; C; D; E). Intenzivnija lipoliza uzrokuje veći sadržaj karbamazepina u fazi pelete kod SSMEDDS formulacija sa SYL320, od 32.28 – 39.79 % ( $\frac{m_{cbz} \text{ u fazi pelete}}{m_{cbz} \text{ ukupna}} \times 100$ ) i SYL 350, od 31.11 – 31.39 %, nosačima (Slika 12.4A; B), nego kod MC formulacija sa NUFL2, od 24.87 – 27.13 % i NFL2, od 26.2 – 31.5 % kao i MC2 formulacija sa NUFL2, od 14.24 – 15.53 % (Slika 12.4C; D; E). Ovi rezultati odgovaraju rezultatima Speybroeck i saradnika koji su *in vitro* modelom lipolize ispitivali SEDDS sistem, sa Neusilin<sup>®</sup> - om US2 kao nosačem i danazolom kao model supstancom, i pokazali da razlog smanjene koncentracije danazola u vodenoj fazi (za 25 – 30 %) i posledično povećane koncentracije u fazi pelete, u odnosu na odgovarajući tečni SEDDS sistem je nemogućnost Neusilin<sup>®</sup> - a US2 da prezentuje lekovitu supstancu u solubilizovanom obliku digestivnom medijumu, što za posledicu ima smanjenu desorpciju lekovite supstance (Speybroeck i sar., 2012).

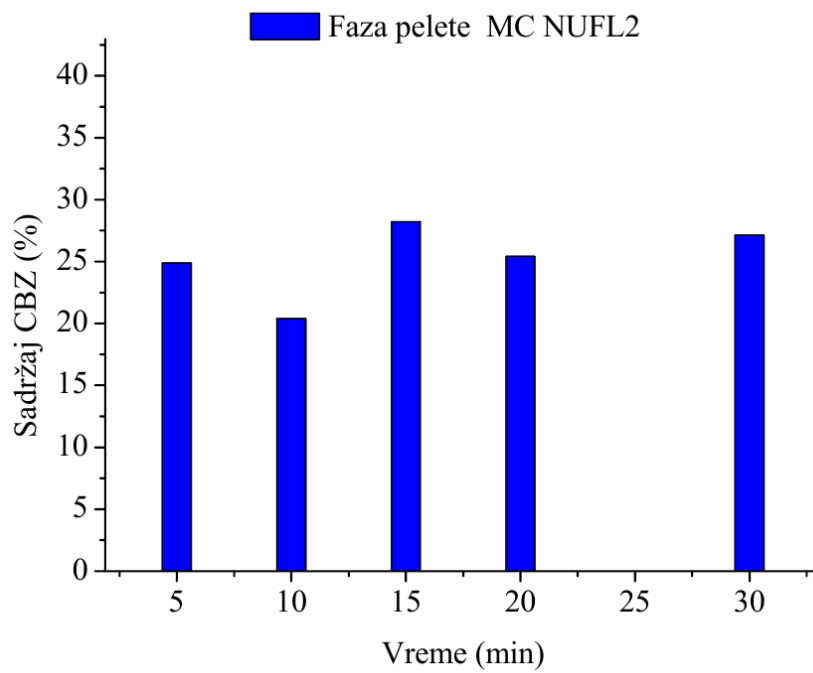
MC2 formulacija sa NUFL2 pokazuje najmanji sadržaj CBZ u fazi pelete, 15.53 % nakon 30 minuta (Slika 12.4E), i najveći u vodenoj fazi 84,17 % (Slika 12.5E) najverovatnije usled najveće koncentracije tečne SMEDDS (i posledično surfaktanata) i najmanjeg udela adsorbensa. MC NUFL2 i MC NFL2 formulacije pokazuju međusobno slične vrednosti za sadržaj CBZ u fazi pelete (27.13 % naspram 29.2 %) i vodenoj fazi (67.67 % naspram 64.6 %) (Slika.12.4C; D i Slika 12.5C; D) ukazujući da na količinu CBZ u obe faze kod SSMEDDS formulacija sa adsorbensima na bazi magnezijum-aluminometasilikata, veći uticaj ima SMEDDS/adsorbens odnos nego specifična površina adsorbensa. Sadržaji CBZ u fazi pelete i vodenoj fazi između MC SYL320 i MC SYL 350 formulacija su relativno slični. Blago više vrednosti u fazi pelete u odnosu na SSMEDDS sisteme sa NUFL2 i NFL2 adsorbensima se mogu prepisati većem stepenu lipolize kao i potencijalno drugačijem intezitetu interakcija SMEDDS formulacije sa CBZ zbog kojih je udeo CBZ koji ne može da se desorbuje blago veći, dok je istovremeno omogućena kompletna lipoliza ulja adorbovanog SMEDDS sistema.



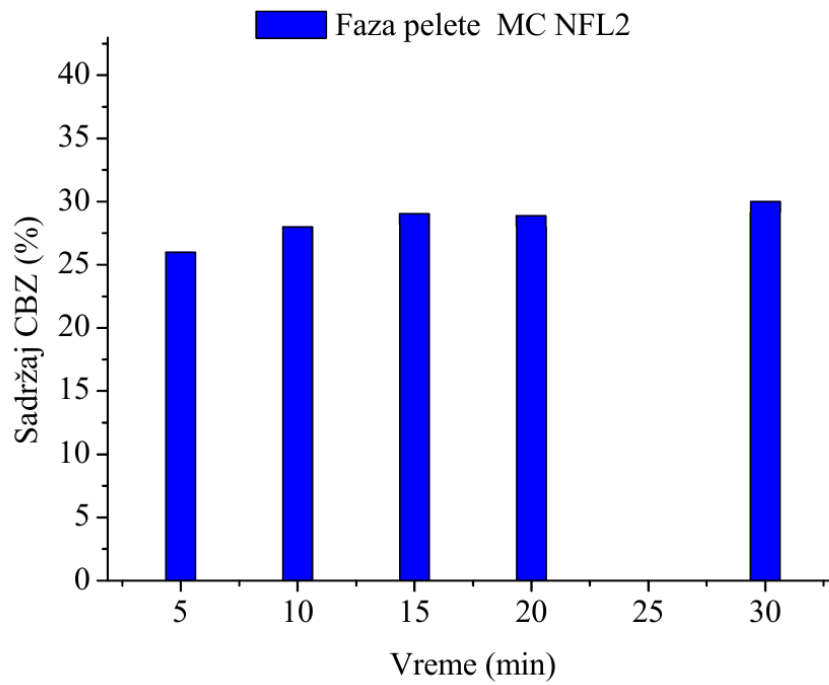
**A) nastavak**



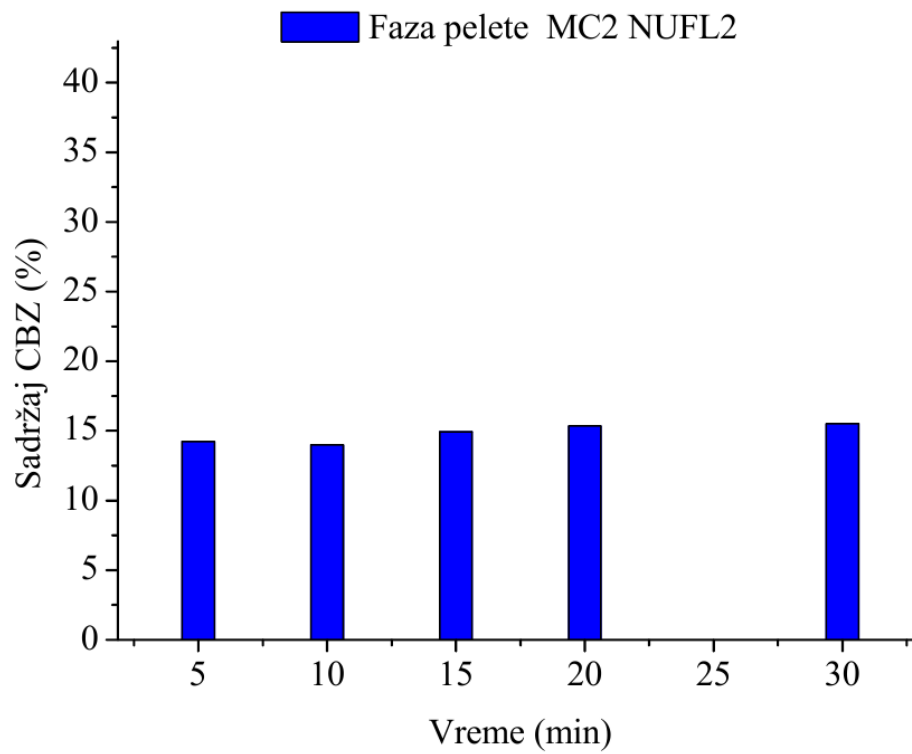
**B) nastavak**



**C) nastavak**

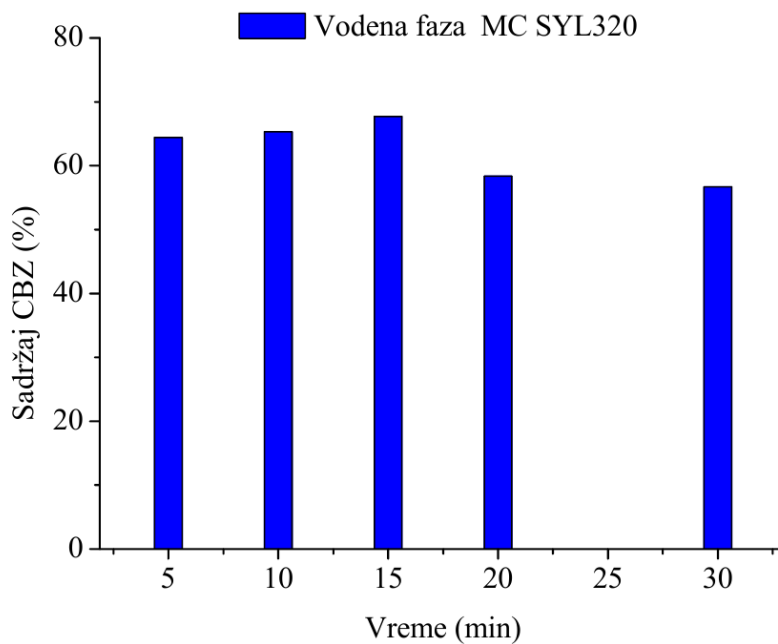


**D) nastavak**

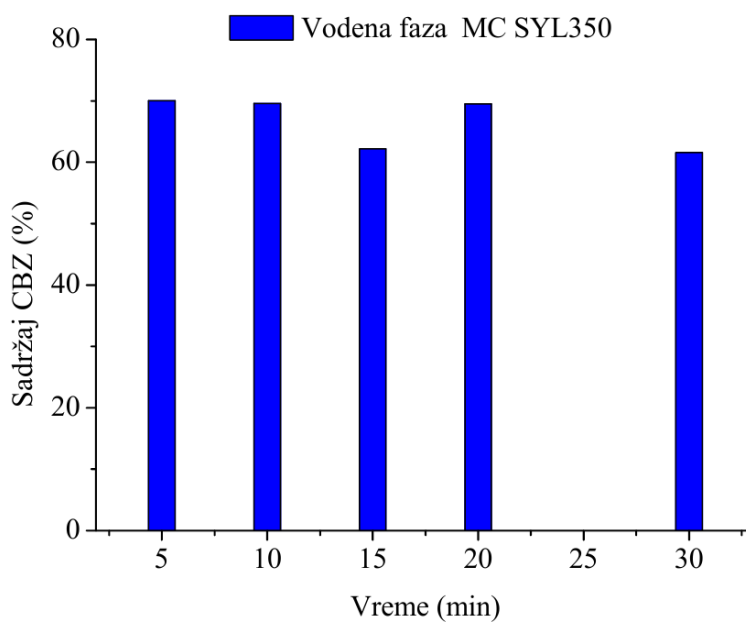


**E)**

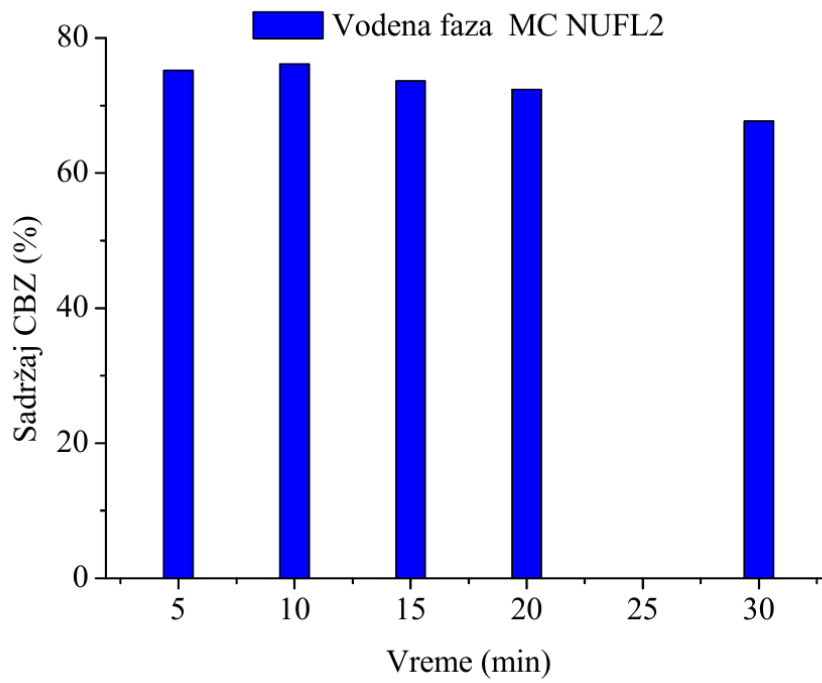
Slika 12.4 - Sadržaj CBZ u fazi pelete ( $m_{cbz}$  u fazi pelete/ $m_{cbz}$  ukupna  $\times$  100) različitih SSMEDDS formulacija u određenim intervalima uzorkovanja u toku *in vitro* lipolize. **A** – MC SYL 320; **B** – MC SYL 350; **C** – MC NUFL2; **D** – MC NFL2; **E** – MC2 NUFL2



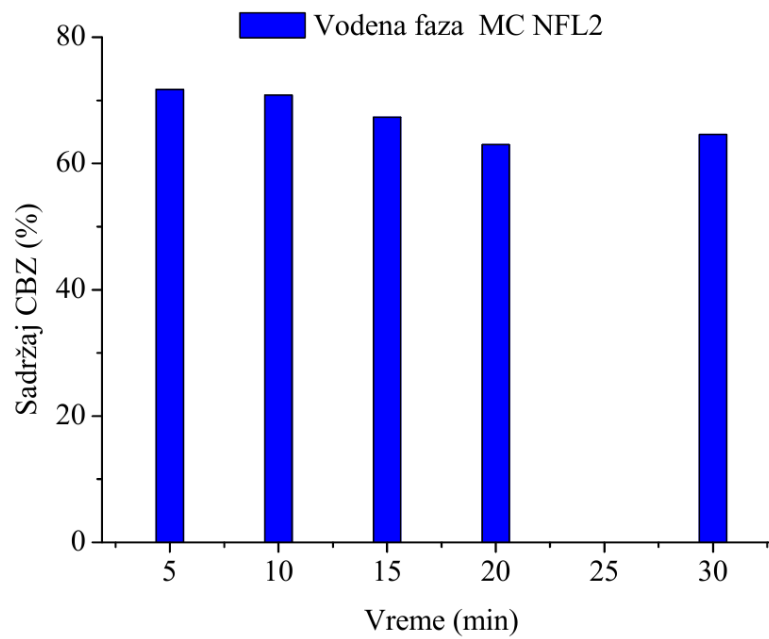
**A) nastavak**



**B) nastavak**

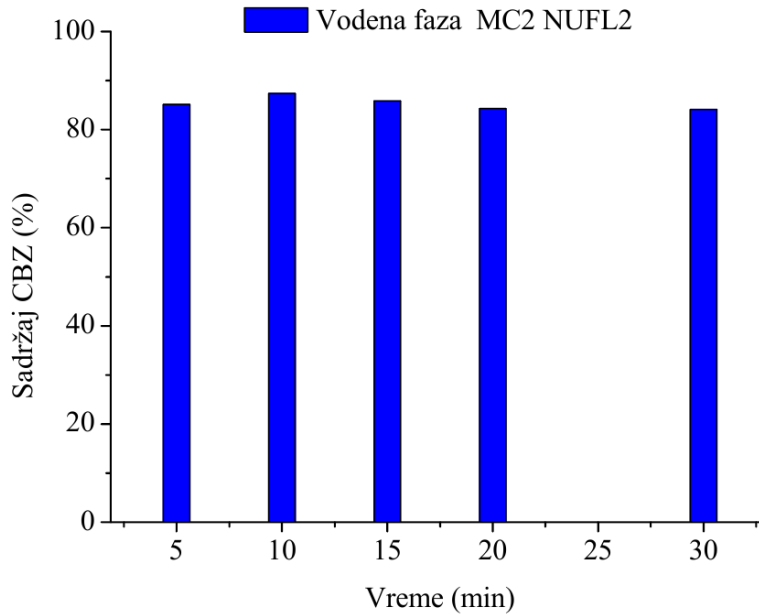


**C) nastavak**



**D) nastavak**





**E)**

Slika 12.5 - Sadržaj CBZ u vodenoj fazi ( $m_{\text{cbz}}$  u vodenoj fazi/ $m_{\text{cbz}}$  ukupna  $\times$  100) različitih SSMEEDDS formulacija u određenim intervalima uzorkovanja u toku *in vitro* lipolize. **A** – MC SYL 320; **B** – MC SYL 350; **C** – MC NUFL2; **D** – MC NFL2; **E** – MC2 NUFL2.

## **ZAKLJUČAK**

I – ispitivanje faznog ponašanja za pseudoternerni sistem voda/polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca, u inicijalnoj fazi istraživanja samomikroemulgujućih sistema, je pokazalo da udeo ulja ima značajan uticaj na efikasnost surfaktantne faze (polisorbat 80(S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C), S:C = 1:1 ( $K_m$ )) kao i kapacitet solubilizacije sistema za vodu. Pokazano je da efikasnost solubilizacije surfaktantne faze za vodu raste sa smanjenjem udela ulja u sistemu. Sistemi sa SC/O odnosom 8/2 i većim, pri visokom udelu vodene faze (> 60 % V (m/m)), formiraju transparentne, jednofazne, niskoviskozne sisteme, odnosno mikroemulzije. To je pokazano i fotonskom korelacionom spektroskopijom kod sistema sa 95 % vode (m/m), pri čemu je veličina prečnika kapi odgovarala veličini za mikroemulzije. Svi sistemi prilikom razblaženja prolaze kroz viskoznu gel fazu, pri čemu, što je udeo surfaktantne faze veći gel faza je izraženija.

II – Rastvorljivost CBZ u polisorbatu 80 je 328x veća nego u 0,1 M HCl kao i 14.52x veća nego u trigliceridima srednje dužine lanca. Tečna SMEDDS formulacija, SC/O 8/2 i  $K_m$  1:1, pokazuje rastvorljivost za CBZ od  $33771 \pm 41.05$   $\mu\text{g/ml}$  koji je 276x veći nego u 0.1 M HCl, ukazujući da formulisana SMEDDS poseduje značajno veću rastvorljivost za CBZ u odnosu na 0.1 M HCl.

III – Merenje viskoziteta kao i utvrđivanje tipa proticanja voda/polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca pseudoternernih sistema bez i sa CBZ, pri različitim udelima vode, su pokazali da CBZ ima značajan uticaj na reološko ponašanje sistema. Sistemi sa 10 % vode (m/m) i 20 % vode (m/m) su pokazali Njutnovski tip proticanja, koji je tipičan za mikroemulzione sisteme, pri čemu su sistemi sa CBZ pokazali veću vrednost viskoziteta ukazujući da CBZ utiče na interakciju među kapima unutrašnje faze dovodeći do intenzivnije interakcije i posledično veće vrednosti viskoziteta. Sistemi sa 30 i 40 % vode (m/m) su pokazali tiksotropno ponašanje (gel faza). Pseudoternerni sistemi bez i sa CBZ sa 50 % vode (m/m) su pokazali Ostvaldovo ponašanje ukazujući da su kapi unutrašnje faze nepravilnog oblika, zbog narušavanja structure slične gelu, i da se pri povećanju brzine smicanja kapi postavljaju u odgovarajući položaj kako bi napon smicanja bio najmanji. Pseudoternerni sistem bez CBZ sa 60 %

vode (m/m) pokazuje Njutnovski tip proticanja ukazujući da je se formirala U/V mikroemulzija. Ipak pseudoternerni sistem sa CBZ pri sadržaju vode 60 % (m/m) pokazuje Bingmov tip proticanja ukazujući da i pri ovim koncentracijama vode CBZ može imati značajan uticaj na reološke karakteristike sistema.

IV – Fotonska korelaciona spektroskopija voda/polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca pseudoternernog sistema sa i bez CBZ pokazuje da CBZ utiče na prosečnu veličinu prečnika kapi ( $Z\text{-}Ave$ ) i vrednost indeksa polidisperznosti (PDI) dovodeći do formiranja većih kapi sa širom distribucijom veličine, ukazujući da CBZ kao molekul sa malom hidrofилnom glavom i relativni velikim hidrofobnim repom uzrokuje intenzivniju interakciju među kapima.

V – Na osnovu kapaciteta adsorpcije formulisano je 5 različitih SSMEDDS sistema sa 4 različita adsorbensa: Neusilin<sup>®</sup> UFL2 (NUFL2), Neusilin<sup>®</sup> FL2 (NFL2) (magnezijum-aluminometasilikat), Sylsya<sup>®</sup> 320 (SYL320) i Sylsya<sup>®</sup> 350 (SYL350) (silicijum-dioksid), pri čemu je za polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/trigliceridi srednje dužine lanca SMEDDS sistem NUFL2 pokazao najveći kapacitet adsorpcije. Nakon adsorpcije, DSC i FT-IR analiza su pokazale da nije došlo do rekristalizacije CBZ, odsustvovanjem karakterističnog pika topljenja kao i pikova karakterističnih vibracija, dobijenih analizom čistog CBZ. Takođe u fizičkim smešama nije pokazan pik topljenja, ali je prisutna deformacija na 1605 i 1593  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{-C=O}$  vibracija i  $\text{-NH}$  deformacija), koja ukazuje na formiranje vodonične veze između CBZ i adsorbensa, što je razlog stvaranja amornog oblika CBZ. Intenzitet deformacije kod fizičke smeše sa NFL2 je manjeg inteziteta u odnosu na fizičke smeše CBZ i ostalih adsorbenasa

VI – *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja SSMEDDS formulacija je pokazalo znatno brže rastvaranje CBZ kod svih formulacija u odnosu na čistu supstancu. Najbrže rastvaranje su pokazale SSMEDDS formulacije sa SYL320 i SYL 350 adsorbensima, dok su SSMEDDS formulacije sa NUFL2 i NFL2 pokazale sporije rastvaranje sa nižim stepenom oslobađanja. Brzina rastvaranja, a i stepen, kod adsorbenasa na bazi magnezijum-aluminometasilikata, zavise od specifične površine, pri čemu ovi adsorbensi pri većim

vrednostima površine i manjim vrednostima SMEDDS/adsorbens odnosa, pokazuju sporije oslobađanje. Razlog za to je što je manje CBZ prezentirano medijumu u solubilizovanom obliku iz kog CBZ može odmah da se oslobodi. Fizičke smeše su pokazale brzo oslobađanje usled prisustva amorfno oblika CBZ. Najsporije oslobađanje je pokazala fizička smeša sa NFL2 adsorbensom usled najmanjeg inteziteta interakcije sa površinom adsorbensa.

VII Ispitivanjem voda/PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/(lecitin/propilen-glikol) (Cs)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) pseudoternernog sistema sa SCs/O odnosom 7/3; 8/2 i 9/1 fotonskom korelacionom spektroskopijom je pokazano da sistem 8:2 pri S/Cs odnosu (Km) 3:2 nakon 100x razblaženja sa vodom formira kapi najmanjeg prečnika i distribucije veličine. Veličina prečnika kapi odgovara vrednostima za emulziju. Sistemi sa većim udelom uljane faze su nakon razblaženja sa vodom nestabilni i pokazuju razdvajanje faza.

VIII – Formulirana PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/(lecitin/propilen-glikol) (Cs)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija (SEPS) SCs/O 8/2 i Km 3:2, sa 40 % CBZ, posedovala je čestice čiji je Martinov dijametar oko 7.66  $\mu\text{m}$ . Supernatant ove suspenzije pokazuje blago više vrednosti veličine prečnika kapi i indeksa polidisperznosi u odnosu na sistem bez CBZ, ukazujući da CBZ utiče na fluidnost međupovršinskog filma formiranih kapi unutrašnje faze emulzije i da povećava interakciju između njih.

IX – Adsorpcijom SEPS na dijetomitne mikrokapsule direktnim adsorbovanjem (SSEPS<sub>1</sub>) u tarioniku sa pistilom, prilikom izrade SSEPS u odnosu 1:1, dolazi do neravnomerne raspodele SEPS na površini adsorbensa, za razliku od adsorpcije SEPS uparavanjem etanolnog rastvora SEPS u kome su dispergovane dijetomitne mikrokapsule (SSEPS<sub>2</sub>), gde je SEPS formulacija većim delom prisutna unutar pora adsorbensa (odnos SEPS/dijetomitne mikrokapsule 1:1). Ovo je potvrđeno SEM analizom Prilikom direktne adsorpcije ne dolazi do promene polimorfno oblika CBZ, što je potvrđeno DSC i XRD analizom. Odsustvo karakterističnog pika topljenja karbamazepina u obe SSEPS je usled

rastvaranja CBZ u tečnom sistemu na visokim temperaturama, što je i potvrđeno DSC analizom tečne SEPS. Nakon adsorpcije uparavanjem etanolnog rastvora SEPS na 40°C u toku 24h u kome su dispergovane dijatomitne mikrokapsule dolazi do promene polimorfnog oblika CBZ iz P-monokliničkog (forma III) u trigonalni oblik (forma I) koji prema Evropskoj farmakopeji nije farmaceutski prihvatljiv polimorfni oblik. U fizičkoj smeši CBZ i dijatomitnih mikrokapsula pokazano je prisustvo prvobitne kristaličnosti CBZ (forma III), ali u manjem intenzitetu u odnosu na intenzitet odgovarajuće količine čiste supstance, dok je u čvrstoj disperziji CBZ i dijatomitnih mikrokapsula dobijenoj uparavanjem etanolnog rastvora, pod uslovima istim kao pri dobijanju SSEPS<sub>2</sub>, prisutan amorfni oblik CBZ.

X – *In vitro* brzina rastvaranja CBZ iz SSEPS formulacija u puferu pH = 6.8 je pokazala da formulacija dobijena uparavanjem etanolnog rastvora pokazuje brže rastvaranje CBZ u odnosu na SSEPS formulaciju dobijenu direktnim adsorbovanjem, dok obe pokazuju znatno brže rastvaranje u odnosu na čist CBZ. Brže rastvaranje CBZ iz SSEPS<sub>2</sub> u odnosu na SSEPS<sub>1</sub> je usled lokalizacije adsorbovanog materijala unutar pora, čime se ograničava kontakt CBZ sa površinom adsorbensa i izbegavaju interakcije koje otežavaju desorpciju i oslobađanje CBZ. Fizička smeša i čvrsta disperzija CBZ i dijatomitnih mikrokapsula pokazuju sličnu brzinu rastvaranja CBZ, koja je značajno veća u odnosu na čist CBZ.

XI – Nakon ubrzanih studija stabilnosti SSEPS<sub>1</sub>, SSEPS<sub>2</sub> i čvrste disperzije pod uslovima 40 °C i 70 % RH u toku 10 nedelja, pokazano je da u SSEPS formulacijama ne dolazi do promene polimorfnog oblika CBZ, ukazujući da je PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/(lecitin/propilen-glikol) (Cs)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija (SEPS) SCs/O 8/2 i Km 3:2, sa dijatomitnim mikrokapsulama kao čvrstim nosačem, u stanju da održi prvobitni polimorfni oblik CBZ. Kod čvrste disperzije primećen je porast kristaličnosti, jer same dijatomitne mikrokapsule nisu u stanju da održe prvobitni amorfni oblik CBZ. Ipak poređenjem profila *in vitro* brzine rastvaranja model nezavisnim pristupom, formulacije pre i posle studija stabilnosti nisu pokazale značajnu razliku u brzini rastvaranja.

XII – Izrada samoemulgujućih peleta vršena je adsorbovanjem PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/(lecitin/propilen-glikol) (Cs)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SEPS) SCs/O 8/2 i Km 3:2, sa 55,55 % CBZ, u komori sa fluidizirajućim protokom vazduha pri sledećim uslovima: radna temperatura 60–65 °C; izlazna temperatura 40 °C; protok vazduha 60–70 m<sup>3</sup>/h; pritisak atomizirajućeg vazduha 1.2 bar; dijametar brizgalice za raspršivanje 1.2 mm. Korišćen je etanol/voda 9/1 disperzni medijum, pri čemu za 400 g peleta veličine 710 – 825 µm je neophodno 800 ml medijuma kako bi konačan sadržaj CBZ bio 10 %. Optimizovana količina HPMC kao sredstva za vezivanje iznosi 4 % u odnosu na CBZ ( $m_{\text{HPMC}}/m_{\text{CBZ}} \times 100$ ) odnosno 0.25 % m/v, dok optimizovana količina Aerosil® - a 200 kao sredstva protiv lepljenja iznosi 16 % u odnosu na CBZ ( $m_{\text{aerosil}}/m_{\text{CBZ}} \times 100$ ) odnosno 1 % m/v.

XIII – Samoemulgujuće pelete, nakon 100x razblaženja lipidnih komponenti sa vodom, pokazuju vrednosti veličine prečnika kapi koje odgovaraju emulzijama, pri čemu CBZ utiče na fluidnost međupovršinskog filma povećavajući intenzitet interakcija što dovodi do viših vrednosti za veličinu kapi kao i do šire distribucije veličine u poređenju sa vrednostima dobijenim za prazne samoemulgujuće pelete. Nakon adsorbovanja SEPS sistema na šećerne pelete pokazano je XRD analizom da je CBZ prisutan u P – monokličnom obliku (forma III), što predstavlja veliku prednost ove metode jer je ova forma prema Evropskoj farmakopeji jedina prihvatljiva za farmaceutsku upotrebu.

XIV – *In vitro* brzina rastvaranja samoemulgujućih peleta je pokazala znatno brže rastvaranje CBZ u 0.1 M HCl u odnosu na čistu supstancu. Brže rastvaranje CBZ je usled prisustva SEPS sistema, bogatog surfaktantima, i velike površine lako rastvorljivih šećernih peleta.

XV – Dinamički *in vitro* model lipolize SSMEEDDS formulacija je pokazao da stepen lipolize zavisi od vrste adsorbensa pri čemu SSMEEDDS formulacije sa SYL320 i SYL350 adsorbensima (silicijum-dioksid) pokazuju znatno veći stepen lipolize, nakon 30 min 100% lipoliza, u odnosu na SSMEEDDS formulacije sa NUFL2 i NFL2 adsorbensima (magnezijum-aluminometasilikat), gde je stepen lipolize od 50 – 80 % za 30 min.

Pokazano je da je koeficijent korelacije između rastvorenog CBZ (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepena lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize značajan ( $R > 0,99$ ), izuzev kod MC NUFL2 formulacije gde je  $R \approx 0,85$ . Pokazano je da stepen lipolize kod adsorbenasa na bazi magnezijum-aluminometasilikata zavisi od specifične površine adsorbensa i SMEDDS/adsorbens odnosa, pri čemu veća površina smanjuje stepen lipolize, a veći odnos povećava stepen lipolize.

XVI – U toku dinamičkog *in vitro* modela lipolize ispitivanih SSMEDDS formulacija CBZ se vrlo brzo raspodeli između vodene faze i faze pelete (već u prvih 5 min), pri čemu SSMEDDS formulacije sa SYL320 i SYL350 adsorbensima pokazuju veći udeo CBZ u fazi pelete u odnosu na SSMEDDS formulacije sa NUFL2 i NFL2 adsorbensima. U toku lipolize sve formulacije pokazuju mali pad koncentracije CBZ od 1 – 7 % u vodenoj fazi i posledični rast u fazi pelete ukazujući da formulacije generalno mogu da održe CBZ u solubilizovanom obliku. Kod adsorbenasa na bazi magnezijum-aluminometasilikata količina CBZ u fazi pelete zavisi pre svega od SMEDDS/adsorbens odnosa, a ne od specifične površine pri čemu što je odnos veći manji je sadržaj CBZ u fazi pelete i posledično veći u vodenoj fazi.



# LITERATURA

Abdalla, A. and Mader, K., 2007. Preparation and characterization of a self-emulsifying pellet formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 220–226.

Agarwal, V., Alayoubi, A., Siddiqui, A., Nazzal, S., 2013. Powdered self-emulsified lipid formulations of meloxicam as solid dosage forms for oral administration. *Drug. Develop. Ind. Pharm.* 39 (11): 1681-1689.

Agarwal, V., Siddiqui, A., Ali, H., Nazzal, S., 2009. Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *Int J Pharm.* 366, 44–52.

Ahuja, G., Pathak, K., 2009. Porous carriers for controlled/modulated drug delivery. *Indian J. Pharm. Sci.* 71 (6): 599-607.

Alany, R.G., El Maghraby, G.M.M., Krauel-Goellner, K., Graf, A., 2009. Microemulsion, systems and their Potential as Drug carriers, in: Fanun, M. (Ed.), *Microemulsion: Properties and Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. pp 247-291.

Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12(3), 413-20.

Anglin, E.J., Cheng, L., Freeman, W.R., Sailor, M.J., 2008. Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 60, 1266-1277.

Antunes, F., Thuresson, K., Lindman, B., Miguel, M., 2003. A rheological investigation of the association between a non-ionic microemulsion and hydrophobically modified PEG. Influence of polymer architecture, *Colloid. Surf. A.* 215 (1-3), 87-100.

Arai, H., Shinoda, K., 1967. The effect of mixing of oils and of nonionic surfactants on the phase inversion temperatures of emulsions. *J. Colloid Interf. Sci.* 25, 396-400.

Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., Lairon, D., 1992. Effects of droplet size triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase – an in vitro study. *J. Nutr. Biochem.* 3, 333–341.

Attama, A.A. i sar., 2003. The use of solid self-emulsifying systems in the delivery of diclofenac. *Int. J. Pharm.* 262, 23–28.

Attwood, D., Florence, A.T., 1983. *Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology*, Chapman and Hall, London.

Aulton, M.E., 2002. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Aw, S.M., Simovic, S., Jonas A.M., Losic, D., 2011. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine.* 6, 159-1173.

Aw, S.M., Simovic, S., Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2012. Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications, *Powd. Techn.* 223, 52-58.

Bahl, D., Bogner, R.H., 2006. Amorphization of Indomethacin by Co-Grinding with Neusilin US2: Amorphization Kinetics, Physical Stability and Mechanism. *Pharm. Res.* 23, 2317 – 2325.

Beg, S., Jena, S.S., Patra, C.N., Rizwan, M., Swain, S., Sruti, J., Rao, M.E.B., Singh, B., 2013. Development of solid self-nanoemulsifying granules (SSNEGs) of ondansetron hydrochloride with enhanced bioavailability potential. *Colloid. Surf. B.* 101, 414-423.

Behme, R.J., Brooke, D., 1991. Heat of fusion measurement of a low melting polymorph of carbamazepine that undergoes multiple-phase changes during differential scanning calorimetry analysis. *J. Pharm. Sci.* 80 (10), 986–990.

Bhagwat, A., D'Souza, I., 2012. Development of Solid Self Micro Emulsifying Drug Delivery System with Neusilin® US2 for Enhanced Dissolution Rate of Telmisartan. *Int. J. Drug Dev. & Res.* 4(4), 398-407.

Bhise, S.B., Rajkumar, M., 2010. Influence of Simulated Gastrointestinal Fluids on Polymorphic Behavior of Anhydrous Carbamazepine Form III and Biopharmaceutical Relevance. *PDA. J. Pharm. Sci. Tech.* 64, 28 – 36.

Biradar, S., Dhumal, R., Paradkar, A., 2009. Rheological Investigation of Self-emulsification Process: Effect of Co-surfactant. *Pharm. Pharmaceut. Sci.* 12 (2), 164-174.

Blackberg, L., Hernell, O., Bengtsson, G., Olivecrona, T., 1979. Colipase enhances hydrolysis of dietary triglycerides in the absence of bile salts. *J. Clin. Invest.* 64, 1303–1308.

Borel, P., Armand, M., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., Lairon, D., 1994. Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in-vitro – effect on pancreatic lipase activity. *J. Nutr. Biochem.* 5, 124–133.

Caliph, S., Charman, W.N., Porter, C.J.H., 2000. Effect of short-, medium- and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J. Pharm. Sci.* 89, 1073–84.

Cauda, V., Onida, B., Platschek, B., Mühlstein, L., Bein, T., 2008. Large antibiotic molecule diffusion in confined mesoporous silica with controlled morphology. *J. Mater. Chem.* 18, 5888- 5899.

Cauda, V., Mühlstein, L., Onida, B., Bein, T., 2009. Tuning drug uptake and release rates through different morphologies and pore diameters of confined mesoporous silica. *Micropor. Mesopor. Mat.* 118, 435-442.

Ceoline, R., Toscani, S., Gardette, M., Agafonov, V.N., Dzyabchenko, A.V., Bachet, B., X-ray characterization of the triclinic polymorph of carbamazepine. *J. Pharm. Sci.* 86 (9), 1062–1065.

Charman, W.N., 1992. Lipid vehicle and formulation effects on intestinal lymphatic drug transport. In: Chasmar WN, Stella VJ, editors. *Lymphatic Transport of Drugs*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 113 – 79.

Charman, W.N., Stella, V.J., 1991. Transport of lipophilic molecules by the intestinal lymphatic system. *Adv. Drug Del. Rev.* 7, 1–14.

Christensen, J.O., Schultz, K., Mollgaard, B., Kristensen, H.G., Mullertz, A., 2004. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium and long-chain triacylglycerols. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23, 287–296.

Cole, E.T. i sar., 2008. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60, 747–756.

Cole, G. (Editor), 2002. *Pharmaceutical Coating Technology*, Taylor & Francis e-Library, British Library, ISBN 0-203-01435-9 Master e-book ISBN.

Constantinides, P.P., 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.* 12, 1561–1572.

Craig, D.Q.M., 1993. The use of self-emulsifying systems as a means of improving drug delivery. *B T Gattefosse.* 86, 21–31.

Craig, D.Q.M., Barker, S.A., Banning, D., Booth, S.W., 1995. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 114, 103–110.

Cuine, J.F., McEvoy, C.L., Charman, W.N., Pouton, C.W., Edwards, G.A., Benameur, H., Porter, C.J., 2008. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *J. Pharm. Sci.* 97, 993–1010.

Dabros, T., Yeung, A., Masliyah, J., Czarnecki, J., 1999. Emulsification through area contraction. *J. Colloid. Interf. Sci.* 210, 222–224.

Dahan, A., Hoffman, A., 2006. Use of a dynamic in vitro lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: correlation with in vivo data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. *Pharm. Res.* 23, 2165–2174.

Dahan, A., Hoffman, A., 2007. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of in vitro lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 96–105.

Dressman, J.B., Amidon, G.L., Reppas, C., Shah, V.P., 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm. Res.* 15 (1), 11–22.

Dressman, J.B., Reppas, C., 2000. In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2), S73–S80.

Đekić, Lj., Formulaciona istraživanja nejonskih mikroemulzija kao potencijalnih nosača za lokalnu primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2011.

Đekić, Lj., Ibrić, S., Primorac, M., 2008. The application of artificial neural networks in the prediction of microemulsion phase boundaries in PEG-8 caprylic/capric glycerides based systems. *Int. J. Pharm.* 361, 41–46.

Embleton, J.K., Pouton, C.W., 1997. Structure and function of gastrointestinal lipases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 15–32.

Fahr, A., Liu, X., 2007. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 4, 403–416.

Fatouros, D.G., Bergenstahl, B., Mullertz, A., 2007. Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 31, 85–94.

Fatouros, D.G., Roshan, G.R., Lise, A. et al, 2007a. Structural Development of Self Nano Emulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) During In Vitro Lipid Digestion Monitored by Small-angle X-ray Scattering. *Pharm. Resear.* 24, 1844–1853.

FDA, 1995. Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms –Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD.

FDA, 1997a. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD.

FDA, 1997b. Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms – Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD.

Fehér, A., Urbán, E., Erős, I., Szabó-Révész, P., Csányi, E., 2008. Lyotropic liquid crystal pre-concentrates for the treatment of periodontal disease. *Int. J. Pharm.* 358, 23 – 26.

Fernandez, S., Chevrier, S., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carriere, F., Jannin, V., 2009. In vitro gastrointestinal lipolysis of four formulations of piroxicam and cinnarizine

with the self emulsifying excipients labrasol (R) and gelucire (R) 44/14. *Pharm. Res.* 26, 1901–1910.

Fernandez, S., Jannin, V., Rodier, J.D., Ritter, N., Mahler, B., Carriere, F., 2007. Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol(R), medium chain glycerides and PEG esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 633–640.

Franceschinis, E. i sar.. 2005. Self-emulsifying pellets prepared by wet granulation in high-shear mixer: influence of formulation variables and preliminary study on the in vitro absorption. *Int. J. Pharm.* 291, 87–97.

Friberg, S.E., Aikens, P.A., 2009. A Phase Diagram Approach to Microemulsions, in: fanun, M. (Ed.), *Microemulsion: Properties and Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. Pp 1-15.

Gattefossé, S.A., 1994. *Microemulsions: Formulation Guide*, publication No. PF9225 A, Saint-Priest Cedex, France.

Georgakopoulos, E., Farah, N., Vergnault, G., 1992. Oral anhydrous non-ionic microemulsions administered in softgel capsules. *B T Gattefosse.* 85, 11–20.

Gershanik, T., Benita, S., 2000. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 179–88.

Gillin, F.D., Boucher, S.E., Rossi, S.S., Reiner, D.S., 1989. Giardia lamblia: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp. Parasitol.* 69, 164–174.

Goddereris, C., Cuppo, F., Reynaers, H., Bouwman, W.G., Van den Mooter, G., 2006. Light scattering measurements on microemulsions: estimation of droplet sizes. *Int. J. Pharm.* 312, 187–195.

Gosselin, P., Lacasse, F.X., Preda, M., Thibert, R., Clas, S.D., McMullen, J.N., 2003. Physicochemical Evaluation of carbamazepine microparticles produced by rapid expansion of supercritical solutions and by spray-drying. *Pharm. Dev. Technol.* 8, 11-20.

Graca, M., Bongaerts, J.H.H., Stokes, J.R., Granick, S., 2009. Nanotribology, standard friction, and bulk rheology properties compared for a Brij microemulsion, *J. Colloid. Interf. Sci.* 333(2), 628-634.

Griffin, W.C., 1949. Classification of Surface Active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1, 311-326.

Grzesiak, A.L., Lang, M., Kim, K., Matzger, A.J., 2003. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *J. Pharm. Sci.* 92, 2260.

Gupta, M.K., Tseng, Y.C, Goldman, D., Bogner, R.H., 2002. Hydrogen bonding with adsorbent during storage governs drug dissolution from solid-dispersion granules. *Pharm. Res.* 19, 1663–1672.

Gupta, M., Adam, V., Bogner, R., 2003. Formation of Physically Stable Amorphous Drugs by Milling with Neusilin<sup>®</sup>. *J Pharm Sci.* 92, 536-551.

Gupta, M.K. i sar.. 2001. Enhanced drug dissolution and bulk properties of solid dispersions granulated with a surface adsorbent. *Pharm. Dev. Technol.* 6, 563–572.

Gupta, M.K. i sar.. 2002a. Hydrogen bonding with adsorbent during storage governs drug dissolution from solid-dispersion granules. *Pharm. Res.* 19, 1663–1672.

Gursoy, R.N. and Benita, S., 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* 58, 173–182.

Hämäläinen, M.D., Frostell-Karlsson, A., 2004. Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads. *Drug Discov. Today Technol.* 1, 397-405.

Harris, R.K., Ghi, P.Y., Puschmann, H., Apperley, D.C., Griesser, U.J., Hammond, R.B., Ma, C., Roberts, K.J., Pearce, G.J., Yates, J.R., Pickard, C.J., 2005. Structural Studies of the Polymorphs of Carbamazepine, Its Dihydrate, and Two Solvates. *Org. Process Res. Dev.* 9(6), 902-910.

Hauss, D.J., Fogal, S.E., Ficorilli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A., Keirns, J.J., 1998. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorlywater-soluble LTB4 inhibitor. *J. Pharm. Sci.* 87, 164–9.

Hench, L., West, J., 1990. The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33-72.

Hentzschel, C.M., Alnaief, M., Smirnova, I., Sakmann, A., Leopold, C.S., 2012. Enhancement of griseofulvin release from liquisolid compacts, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (1), 130-135.

Holm, R., Porter, C.J.H., Müllertz, A., Kristensen, H.G., Charman, W.N., 2002. Structured triglyceride vehicles for oral delivery of halofantrine: examination of intestinal lymphatic transport and bioavailability in conscious rats. *Pharm. Res.* 9, 1354–61.

Horcajada, P., Ramila, A., Perez-Pariente, J., Vallet-Regi, M., 2004. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Micropor. Mesopor. Mat.* 68,105–109.

Hugger, E.D., Novak, B.L., Burton, P.S., Audus, K.L., Borchardt, R.T., 2002. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro, *J. Pharm. Sci.* 91, 1991–2002.

Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J, Ninham, B.W., 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* 72, 1525-1568.

- Ito, Y., Kusawake, T., Ishida, M., Tawa, R., Shibata, N., Takada, K., 2005. Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent, *J. Controll. Rel.*, 105, 23-31.
- Ito, Y., Kusawake, T., Prasad, Y.V.R., Sugioka, N., Shibata, N., Takada, K., 2006. Preparation and evaluation of oral solid heparin using emulsifier and adsorbent for in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 317 (2), 114-119.
- Jakubowicz, J., Smardz, K., Smardz, L., 2007. Characterization of porous silicon prepared by powder technology. *Physica. E. Low Dimens. Syst. Nanostruct.* 38, 139-143.
- Jannin, V. i sar., 2008. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60, 734–746.
- Jeirani, Z., Jan, B.M., Ali, B.S., Noor, I.M., Hwa, S.C., Saphanuchart, W., 2012. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 112, 1-7.
- Kahlweit, M., 1999. Microemulsions, *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C95*, 89 – 115.
- Kallakunta, V.R., Bandari, S., Jukanti, R., Veerareddy P.R., 2012. Oral self emulsifying powder of lercanidipine hydrochloride: Formulation and evaluation. *Powd. Techn.* 221, 375-382.
- Kaneniwa, N., Ichikawa, J.I., Yamaguchi, T., Hayashi, K., Watari, N., Sumi, M., Zasshi, Y., 1987. Dissolution behavior of carbamazepine polymorphs. 107, 808–813.
- Kanuganti, S., Jukanti, R., Veerareddy, P.R., Bandari, S., 2012. Paliperidone-Loaded Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) for Improved Oral Delivery. *J. Disper. Sci. Techn.* 33 (4), 506-515.
- Katzhendler, I., Azoury, R., Friedman, M., 1998. Crystalline properties of carbamazepine in sustained release hydrophilic matrix tablets based on hydroxypropyl methylcellulose. *J. Control. Rel.* 54, 69–85.
- Kaukonen, A.M., Boyd, B.J., Porter, C.J.H., Charman, W.N., 2004b. Drug solubilization behavior during in vitro digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. *Pharm. Res.* 21, 245–253.
- Kerns, E.H., Di, L., 2003. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 8, 316-323.
- Khansili, A., Bajpai, M. 2013. Formulation, evaluation and characterization of solid self-micro emulsifying drug delivery system (solid smedd) containing nifedipine. *Res. J. Pharm. Tech.* 6 (3), 278-284.
- Kim, K., Frank, M., Henderson, N., 1985. Application of differential scanning calorimetry to the study of solid drug dispersions. *J. Pharm. Sci.* 74, 283 – 285.



- Kimura, M., Shizuki, M., Miyoshi, K., Skai, T., Hidaka, H., Takamura, H., Matoba, T., 1994. Relationship between the molecular structures and emulsification properties of edible oils. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1258–61.
- Kinnari, P., Mäkilä, E., Heikkilä, T., Salonen, J., Hirvonen, J., Santos, H.A., 2011. Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica materials as drug carriers for itraconazole. *Int. J. Pharm.* 414 (1 – 2), 148 – 156.
- Kleberg, K., Jacobsen, J., Mullertz, A., 2010. Characterising the behaviour of poorly water soluble drugs in the intestine: application of biorelevant media for solubility, dissolution and transport studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1656–1668.
- Kobayashi, Y., Ito, S., Itai, S., Yamamoto, K., 2000. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int. J. Pharm.* 193, 137–146.
- Kogan, A., Aserin, A., Garti, N., 2007. Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution. *J. Colloid. Interf. Sci.* 315, 637 – 647.
- Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K., 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int. J. Pharm.* 212, 233–246.
- Krahn, F.U., Mielck, J.B., 1987. Relations between several polymorphic forms and the dihydrate of carbamazepine. *Pharma. Acta. Helv.* 62, 247-254.
- Kresge, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C., Beck, J.S., 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359, 710-712.
- Krupa, A., Majda, D., Jachowicz, R., Mozgawa, W., 2010. Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin® US2. *Thermochim Acta.* 509 (1-2), 12-17.
- Kuentz, M., 2012. Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs, *Drug Discov Today: Technologies* 9, 97 - 104.
- Kumar, S.S.C. (Ed.), 2007. *Nanomaterials for medical diagnosis and therapy*, Weinheim: Wiley-VCH. Strana 289.
- Kumar, P., Mittal, K.L. (Eds.), 1999. *Handbook of Microemulsion: Science and Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, pp. 357 – 387.
- Larsen, A., Holm, R., Pedersen, M.L., Mullertz, A., 2008. Lipid-based formulations for danazol containing a digestible surfactant labrafil M2125CS: in vivo bioavailability and dynamic in vitro lipolysis. *Pharm. Res.* 25(12), 2769-77.

- Larsen, A., Jensen, L., Kleberg, K., Mullertz, A., 2010. Selection of a lipase for development of an in vitro gastric lipid digestion model. In: Poster presented at American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting , New Orleans, LA, USA.
- Larsen, A., Sassene, P., Müllertz, A., 2011. In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 417, 245– 255.
- Lauwers, A., Scharpé, S., 1997. *Pharmaceutical Enzymes, Drugs and Pharmaceutical Sciences*. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, Volume 84.
- Lehmann, V., Stengl, R., Luigart, A., 2000. On the morphology and the electrochemical formation mechanism of mesoporous silicon. *Mater. Sci. Eng., B* 69-70, 11-22.
- Lefebvre, C., Guyot-Herman, A.M., Draguet-Brughmans, M., Bouche, R., Guyot, J.C., 1986. Polymorphic transitions of carbamazepine during grinding and compression. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12, 1913–1927.
- Leinen, K.M., Labuza, P.M., 2006. Crystallization inhibition of an amorphous sucrose system using raffinose. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7(2), 85–89.
- Leuner, C., Dressman, J., 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 47 – 60.
- Li, P., Ghosha, A., Wagner, F.R., Krillb, S., Joshia, M.Y., Serajuddina, T.M.A., 2005. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.* 288, 27 – 34.
- Li, Y., Han, J., Zhang, G., Grant, D., Saryanarayanan, R., 2000. In situ Dehydration of CBZ Dihydrate: A Novel technique to Prepare Amorphous Anhydrous Carbamazepine. *Pharm. Dev. Tech.* 5(2), 257 – 266.
- Lim, L.H., Tan, A., Simovic, S., Prestidge, C.A., 2011. Silica-lipid hybrid microcapsules: Influence of lipid and emulsifier type on in vitro performance. *Int. J. Pharm.* 409, 297-306.
- Lindenberg, M., Kopp, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 265–278.
- Lindmark, T., Nikkila, T., Artursson, P., 1995. Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 958–64.
- Lipinski, C., 2002. Poor aqueous solubility—an industry wide problem in drug discovery. *Am. Pharm. Rev.* 5, 82–85.
- Litvinova, L. B., and T. V. Fedorchenko. 1994. The effect of plant oils on the female reproductive system [translation]. *Eksp Klin Farmakol.* 57, 49–51.

Lowes, M., Caira, M., Lotter, A., Van Der Watt, J., 1987. Physicochemical properties and X-ray structural studies of the trigonal polymorph of carbamazepine. *J. Pharm. Sci.* 76 (9), 744–752.

Macdonald, R.L., McLean, M.J., 1986. Anticonvulsant drugs: mechanisms of action. *Adv. Neur.* 44, 713-736.

MacGregor, K.J., Embleton, J.K., Lacy, J.E., Perry, E.A., Solomon, L.J., Seager, H., Pouton, C.W., 1997. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 33–46.

Matsuda, Y., Akazawa, R., Teraoka, R., Otsuka, M., 1994. Pharmaceutical Evaluation of carbamazepine modifications: comparative study for photostability of carbamazepine polymorphs by using Fourier-transformed reflection-absorption infrared spectroscopy and colorimetric measurement. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 162–167.

Meyer, T., Waidelich, D., Frahm, A.W., 2002. Separation and first structure elucidation of Cremophor EL-components by hyphenated capillary electrophoresis and delayed extraction-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 23, 1053–106.

McMahon, L.E., Timmins, P., Williams, A.C., York, P., 1996. Characterization of dihydrates prepared from carbamazepine polymorphs. *J. Pharm. S.* 85, 1064-1069.

Melo, R.A.A., L Giotto, M.V., Rocha, J.; 1999. Urquieta Gonzalez, E.A. MCM- 41 ordered mesoporous molecular sieves synthesis and characterization. *Mater. Res.*, 2 (3), 173 – 179.

Miura, H., Kanebako, M., Shirai, H., Nakao, H., Inagi, T., Terada, K., 2011. Stability of amorphous drug, 2-benzyl-5-(4-chlorophenyl)-6-[4-(methylthio)phenyl]-2H-pyridazin-3-one, in silica mesopores and measurement of its molecular mobility by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 410, 61-67.

Nair, R., Gonen, S., Hoag, S.W., 2002. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. *Int. J. Pharm.* 240, 11–22.

Nazzal, S., Khan, M., 2006. Controlled release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: Stability assessment and optimization of some processing parameters, *Int. J. Pharm.* 315, 110–121.

National Toxicology Program (NTP). 1992. NTP technical report on the toxicity studies of castor oil (CAS No. 8001-79-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (dosed feed studies). NTIS Report No. PB93151439.

Noguchi, N., Suemune, I., 1993. Luminescent porous silicon synthesized by visible light irradiation. *Appl Phys Lett.* 62, 1429-1431.

- Otsuka, M., Hasegawa, H., Matsuda, Y., 1999. Effect of polymorphic forms of bulk powders on pharmaceutical properties of carbamazepine granules. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 852–856.
- Palmer, A.M., 2003. New horizons in drug metabolism, pharmacokinetics and drug discovery. *Drug News Perspect.* 16, 57–62.
- Pan, X.S., 2002. The application of porous adsorbents to increase the dissolution rate of low solubility drugs. In *Pharmaceutical Sciences*; University of Maryland. Strana 15.
- Parmar, N., Singla, N., Amin, S., Kohli, K., 2011. Study of cosurfactant effect on nanoemulsifying area and development of lercanidipine loaded (SNEDDS) self nanoemulsifying drug delivery system, *Colloid. Surf. B.* 86 (2), 327-338.
- Patel, M., Patel, R., Parikh, J., Bhatt, K., 2007. Microemulsions : As Novel Drug Delivery Vehicle. *Pharm. Rev.* 5 (6).
- Pedersen, B.L., Brøndsted, H., Lennerna's, H., Christensen, F.N., Mu'llertz, A., Kristensen, H.G., 2000. Dissolution of hydrocortisone in human and simulated fluids. *Pharm. Res.* 17 (2), 183–189.
- Phadnis, N., Cavatur, R., Suryanarayanan, R., 1997. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15(7), 929-943.
- Planinsek, O., Kovacic, B., Vrecer, F., 2011. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm.* 406, 41-48.
- Pocock, D.M.E., Vost, A., 1974. DDT absorption and chylomicron transport in rat. *Lipids* 9, 374–81.
- Porter, C.J.H., Kaukonen, A.M., Taillardat-Bertschinger, A., Boyd, B.J., O'Connor, J.M., Edwards, G.A., Charman, W.N., 2004. Use of in vitro lipid digestion data to explain the in vivo performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: studies with halofantrine. *J. Pharm. Sci.* 93, 1110–1121.
- Porter, C.J.H., Trevaskis, N.L., Charman, W.N., 2007. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Rev. Drug Disc.* 6, 231-248.
- Porter, C.J.H., Pouton, C.W., Cuine, J.F., Charman, W.N., 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 60, 673-691.
- Porter, C.J., Charman, W.N., 2001. *In vitro* assessment of oral lipid based formulations. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 50(1). S127-47.
- Poul, B.K., Moulik, S., 2000. The viscosity behaviors of microemulsions: an overview. *PINSA*, 66A(5), 499-519.

Pouton, C.W., 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 47-58.

Pouton, C.W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, S93-S98.

Pouton, C.W., 2006, Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 278–287.

Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategie. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 625 – 637.

Prajapati, B.G., Patel, M.M., 2007. Conventional and alternative pharmaceutical methods to improve oral bioavailability of lipophilic drugs. *Asian J. Pharm.* 1, 1–8.

Rang, M.J., Miller, C.A., 1999. Spontaneous emulsification of oils containing hydrocarbon, non-ionic surfactant, and oleyl alcohol. *J. Colloid. Interf. Sci.* 209, 179–92.

Razdan, R., Devarajan, P.V., 2003. Microemulsions, *Indian Drugs*, 40 (3), 139 – 146.

Reiss, H., 1975. Entropy-induced dispersion of bulk liquids. *J. Colloids Interf. Sci.* 53, 61–70.

Ritschel, W.A., 1992. The LADMER system: liberation, absorption, distribution, metabolism, elimination and response. In: Ritschel, W.A. (Ed.), *Handbook of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications*. Drug Intelligence, Hamilton, pp. 19–24.

Roberts, R.J., Rowe, R.C., 1996. Influence of polymorphism on the Young's modulus and yield stress of carbamazepine, sulfathiazole, and sulfanilamide. *Int. J. Pharm.* 129, 79–94.

Rojas, O., Tiersch, B., Frasca, S., Wollenberger, U., Koetz, J., 2010. A new type of microemulsion consisting of two halogen-free ionic liquids and one oil component, *Colloid. Surf. A.* 369 (1-3), 82-87.

Rosen, J.M., 2004. Micelle formation by Surfactants in: Rosen, J.M., *Surfactants and interfacial phenomena.*, John Wilie & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 105 – 178.

Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S,C. (editors), 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5<sup>th</sup> edition, Pharmaceutical Press, London.

Rustichelli, C., Gamberini, G., Ferioli, V., Gamberini, M.C., Ficarra, R., Tommasini, S., 2000. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. *J. Pharmaceut. Biomed.* 23, 42 – 54.

Salonen, J., Björkqvist, M., Laine, E., Niinistö, L., 2000. Effects of fabrication parameters on porous p+-type silicon morphology. *Phys. Status Solidi A.* 182, 249-254.

- Salonen, J., Laitinen, L., Kaukonen, A.M., Tuura, J., Björkqvist, M., Heikkilä, T., Vähä-Heikkilä, K., Hirvonen, J., Lehto, V.P., 2005. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs. *J. Control. Rel.* 108, 362–374.
- Sander, C., Holm, P., 2009. Porous magnesium aluminometasilicate tablets as carrier of a cyclosporine self-emulsifying formulation. *AAPS PharmSciTech.* 10 (4), 1388-1395.
- Sasseine, P., Knopp, M., Hesselkilde, J., Koradia, V., Larsen, A., Rades, T., Mullertz, A. 2010 Precipitation of a Poorly Soluble Model Drug during In Vitro Lipolysis: Characterization and Dissolution of the Precipitate. *J. Pharm. Sci.* 99 (12), 4982 – 4991.
- Schelly, Z.A., 1997. Organized assemblies of surfactants in solution, and the dynamic of w/o microemulsions. *J. Mol. Liq.* 72, 3-13.
- Schott, H., 2000 Colloidal Dispersion In Remington: The science and practice of pharmacy, Twentieth Edition; Ed: Gennaro, A.F.; Lippincott Williams and Wilkins. 1, 313 – 314.
- Sehić, S., Betz, G., Hadzidedić, S., El-Arini, S.K., Leuenberger, H., 2010. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. *Int. J. Pharm.* 386, 77-90.
- Sek, L., Porter, C.J., Kaukonen, A.M., Charman, W.N., 2002. Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behavior of their lipolytic products. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 29–41.
- Seo, A. i sar.. 2003. The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *Int. J. Pharm.* 259, 161–171.
- Shah, N.H., Carvajal, M.T., Patel, C.I., Infeld, M.H., Malick, A.W., 1994. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 106, 15–23.
- Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Liu, J.P., 1999. In vitro dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor,  $f_2$ , *Pharm. Res.* 15, 889-896.
- Shanmugam, S., Park, J.H., Kim, K.S., Piao, Z.Z., Yong, C.S., Choi, H.G., Woo, J.S. 2011. Enhanced bioavailability and retinal accumulation of lutein from self-emulsifying phospholipid suspension (SEPS). *Int. J. Pharm.* 412, 99-105.
- Shegokar, R., Müller, R.H., 2010. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm.* 399, 129-139.
- Shinoda, K., Kunieda, H., 1973. Conditions to produce so-called microemulsions: Factor to increase mutual solubility of oil and water by solubilizer. *J. Colloid. Interf. Sci.* 42, 381-387.

Snow, R., Allen T., Ennis, B., Litster. J., 1997. Size Reduction and Size Enlargement, in: Perry, R., Green, D. (Eds.), Perry's Chemical Engineers' Handbook, 7th ed. McGraw-Hill, New York, Section 20, pp 8.

Speybroeck, M.V., Williams, D.H., Nguyen, Tri-H., Anby, M.U., Porter, C.J.H., Augustijns, P., 2012. Incomplete Desorption of Liquid Excipients Reduces the *in Vitro* and *in Vivo* Performance of Self-Emulsifying Drug Delivery Systems Solidified by Adsorption onto an Inorganic Mesoporous Carrier. *Mol. Pharm.* 9, 2750–2760.

Strickley, R.G., Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drugs products and excipients, in: Hauss, D.J. (Ed.), Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs, Informa Healthcare, Inc., New York, 2007, pp. 1–31.

Strickley, R.G., Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations, 2004. *Pharm. Researc*, 21 (2), 201-230.

Taguchi, A., Schuth, F., 2005. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Micropor. Mesopor. Mat.* 77, 1–45.

Takeuchi, H., Nagira, S., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2005. Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles by using spray-drying method. *Int J Pharm.* 293, 155–164.

Tang, B., Cheng, G., Gu Jian-C., Xu, Cai-H., 2008. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms, *Drug Discovery Today*, 13, Numbers 13/14.

Uchida, S.O.A., Kuriyama, K., Nakamura, T., Seto, Y., Kato, M., Hatanaka, J., Tanaka, T., Miyoshi, H., Yamada, S., 2012. Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q<sub>10</sub> with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors. *Eur J Pharm Sci*, 46, 492–499.

Vallet-Regi, M., Doadrio, J.C., Doadrio, A.L., Izquierdo-Barba, I., Perez-Pariente, J., 2004. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics.* 172, 435–439.

Varma, R.K., Kaushal, R., Junnarkar, A.Y., et al, 1985. Polysorbate 80: a pharmacological study. *Arzneimittelforschung.* 35, 804–808.

Verreck, G. and Brewster, M.E., 2004. Melt extrusion-based dosage forms: excipients and processing conditions for pharmaceutical formulations. *Bull. Tech. Gattefosse.* 97, 85–95.

Wagner, C., Jantratid, E., Kesisoglou, F., Vertzoni, M., Reppas, C., Dressman, J., 2012. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 127–138.

- Wakerly, M.G., Pouton, C.W., Meakin, B.J., Morton, F.S., 1986. Selfemulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixtures. ACS Symp Series. 311, 242–55.
- Won, C.W., Nersisyan, H.H., Shin, C.Y., Lee, J.H., 2009. Porous silicon microparticles synthesis by solid flame technique. *Microp. Mes. Mater.* 126, 166-170.
- Yoshihashi, Y., Yonemochi, E., Terada, K., 2002. Estimation of Initial Dissolution Rate of Drug Substance by Thermal Analysis: Application for Carbamazepine. *Pharm. Dev. Technol.* 7 (1), 89 – 95.
- Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2009. Development of nanocolloidal diatomaceous earth particles into advanced material for water treatment applications. Presented at: CHEMECA. Perth, Australia, Conference paper 0108, September 2009, 27–30.
- Yu, Y., Addai-Mensah, J., Losic, D., 2010. Synthesis of self-supporting gold microstructures with 3-d morphologies by direct replication of diatom templates. *Langmuir.* 26, 14068–14072.
- Zangenberg, N.H., Mullertz, A., Kristensen, H.G., Hovgaard, L., 2001a. A dynamic in vitro lipolysis model I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 115–122.
- Zangenberg, N.H., Mullertz, A., Kristensen, H.G., Hovgaard, L., 2001b. A dynamic in vitro lipolysis model II: evaluation of the model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 237–244.
- Zerrouk, N., Toscani, S., Gines-Dorado, J.M., Chemtob, C., Ceólin, R., Dugué, J., 2001. Interactions between carbamazepine and polyethylene glycol (PEG) 6000: Characterisations of the physical, solid dispersed and eutectic mixtures. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 395 – 404
- Zhang, Q., Jiang, X., Jiang, W., Lu, W., Su, L., Shi, Z., 2004. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. *Int. J. Pharm.* 275, 85 – 96.
- Zhang, X., Sun, N., Wu, B., Lu, Y., Guan, T., Wu, W., 2008. Physical characterization of lansoprazole/PVP solid dispersion prepared by fluid-bed coating technique. *Powd. Tech.* 182, 480–485.
- Zhao, X., Xu, J., Zheng, L., Li, X., 2007. Preparation of temperature-sensitive microemulsion-based gels formed from a triblock copolymer, *Colloid. Surf. A.* 307(1-3), 100-107.
- Zhao, D., Feng, J., Huo, Q., Melosh, N., Fredrickson, G.H., Chmelka, B.F., Stucky, G.D., 1998. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 Angstrom pores. *Science.* 279, 548-552.
- Zhou, P., Labuza, T.P., 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Ed. Elsevier Ltd, 256 – 263.



Elektronske baze podataka

*i* - <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=176.170> ,  
Poslednji pristup 21.05.2013.

*ii* - <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=176.180> ,  
Poslednji pristup 21.05.2013.

*iii* - <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=176.210> ,  
Poslednji pristup 21.05.2013.

*v* - <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=178.3910> ,  
Poslednji pristup 21.05.2013.

*vix* - FDA (US Food and Drug Administration). Polysorbate 80. 21CFR172.840; 2006:  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm> Poslednji  
pristup 21.05.2013.

*vix* - Guidance for Industry ICH Q3A - Impurities in New Drug Substance, FDA, CDER,  
CBER, Revision 2, 2008.  
<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm127984.pdf> , Posledni  
pristup 22.05.2013.

*vxi* - ICH Q1B harmonized tripartite guideline stability testing – Photostability Testing of  
New Drug Substances and Products, Current *Step 4* version, 1996 .  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1  
B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf) , Posledni pristup 22.05.2013.

*vxi* - CFR - Code of Federal Regulations, Part 184 - Direct Food substances affirmed as  
Generally Recognized as Safe, Subpart B - Listing of specific substances Affirmed as  
GRAS, Section 184.1400.  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1400> , Poslednji  
pristup 18.09.2013.

## BIOGRAFIJA

Mladen Milović je rođen 10.08.1986. godine u Rijeci, Republika Hrvatska. Osnovnu školu „Dušan Jerković“ i srednju Medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, je završio u Užicu. Dobitnik je Vukove diplome i proglašen đakom generacije srednje Medicinske škole. Farmaceutski fakultet u Beogradu je upisao 2005/2006. godine. Diplomirao je 2010 sa ocenom 10 i prosečnom ocenom studiranja 9,69. Takođe je dobitnik Nagrade fonda „Ivan Berkeš“ za studenta generacije Farmaceutskog fakulteta. Dobitnik je stipendije Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, stipendije grada Užica za talentovane studente, stipendije poslovnog kluba „Privrednik“ za vredne i talentovane đake i studente („Hemofarm A.D.“), stipendije fonda za mlade talente Republike Srbije i mnogih drugih nagrada. Doktorske akademske studije je upisao na Farmaceutskom fakultetu školske 2010/11 godine iz farmaceutske tehnologije. Od januara 2011. do avgusta 2012. godine bio je zaposlen na Farmaceutskom fakultetu kao istraživač-pripravnik. Od avgusta 2012. godine radi kao stručni saradnik u Nacionalnoj Kontrolnoj Laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva.

*Mladen Milović was born on August 10<sup>th</sup> 1986 in Rijeka, Republic of Croatia. He finished elementary and high school in Uzice. He enrolled in the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade in 2005/2006 and graduated in 2010 with average grade 9,69 and his diploma thesis was graded with 10. During studies, as student of generation, Mladen has received a reward from fund „Ivan Berkeš“, scholarship of Republic foundation for development of science and art at offsprings, scholarship of Fund for young talents, scholarship for talented students from town Uzice, scholarship of Serbian Business Club „Privrednik“ for talented and hardworking pupils and students (Hemofarm A.D.) and many more rewards. He started his PhD studies in the field of pharmaceutical technology at the Faculty of Pharmacy in Belgrade, in 2010/2012. From January 2011 till August 2012, he was working at Faculty of Pharmacy as researcher prentice. From August 2012 he is working in National Control Laboratory of Medicine and medical devices agency of Republic of Serbia.*

## PRILOZI

### Prilog A – Karakteristike surfaktanata koji se koriste prilikom izrade samodispergujućih formulacija

#### 1. PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi

Kaprilno/kaprinski makrogol gliceridi (*sin.* kaprilno/kaprinski polioksilgliceridi) predstavljaju PAM nejonskog tipa. Dobijaju se parcijalnom hidrolizom triacilglicerola srednje dužine lanca makrogolima, esterifikacijom masnih kiselina srednje dužine lanaca sa glicerolom i makrogolima ili mešanjem estara glicerola i kondezata etilenoksida i kaprilne i kaprinske kiseline. Predstavljaju mešavine monoestara, diestara i triestara glicerola i monoestara i diestara makrogola sa prosečnom relativnom molekulskom masom od 200 – 400. Procentualni udeo pojedinih frakcija masnih kiselina prikazan je u Tabeli 1.1 (Ph. Eur).

**Tabela 1.1 - Udeo frakcija masnih kiselina koje ulaze u sastav kaprilno/kaprinskih makrogolglicerida (Ph. Eur)**

<b>Masna kiselina</b>	<b>(% m/m)</b>
Kaprinska kiselina	$\leq 2,0$
Kaprilna kiselina	50,0 – 80,0
Kaprinska kiselina	20,0 – 50,0
Laurinska kiselina	$\leq 3,0$
Miristinska kiselina	$\leq 1,0$

Kaprilno/kaprinski gliceridi predstavljaju uljaste tečnosti bledežute boje, brzo disperzibilne u vrućoj vodi i lako rastvorljive u metilenhloridu. Prema Ph. Eur sadržaj etilenoksida ne sme biti veći od 1 ppm, dok sadržaj dioksana ne sme biti veći od 10 ppm. Relativna gustina im je oko 1,0, a indeks refrakcije (na 20°C) je oko 1,4. Mogu da sadrže i makrogole u slobodnom obliku.

Prilikom imenovanja ovih nejonskih PAM obavezno se u nazivu dodaje broj etilenoksidnih jedinica u polioksietilenskom lancu molekula estra ili relativna molekulska masa makrogola upotrebljenog za esterifikaciju.

PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (polietilenglikol-8 gliceril kaprilat/kaprat) je farmaceutski ekscipijens dobijen alkoholizom srednjolančanih triglicerida kokosovog ulja sa polietilenglikolom 400. Predstavlja smešu: mono- i di- i triacilglicerola C8 i C10 zasićene masne kiseline (30 %), mono- i di-estara PEG 400 (50 %) sa srednjelančanim zasićenim masnim kiselinama i slobodnog PEG 400 (20 %). Dostupan je u komercijalno obliku<sup>17</sup>.

Ova nejonska površinsko aktivna materija ima visoku HLB vrednost (HLB = 14) i predstavlja efikasan solubilizator teško rastvorljivih lekovitih supstanci. Prvenstveno se koristi kao primarni surfaktant prilikom formulacije lipidnih sistema samodispergujućeg tipa kao što su saomikroemulgujući sistemi (eng. *Self-Micro-Emulsifying Drug Delivery Systems* - SMEDDS) i samoemulgujućeg tipa (eng. *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems* – SEDDS).

Imajući u vidu da je polietilenglikol-8 gliceril kaprilat/kaprat uvršten u FDA IIG<sup>18</sup> listu ekscipijenasa (eng. *Food and Drug Administration Inactive Ingredient Guide, FDA IIG*) za upotrebu u farmaceutskim preparatima tipa rastvora i kapsula za peroralnu primenu i ne iznenađuje činjenica da postoji intenzivan porast zainteresovanosti za potencijalnu upotrebu ovog tenzida prilikom istraživanja brojnih lipidnih sistema, posebno tipa SEDDS i SMEDDS za peroralnu upotrebu kako u tečnom tako i u čvrstom obliku. Pored toga ovaj nejonski tenzid pokazuje visoku efikasnost za solubilizaciju teško rastvorljivih jedinjenja i poseduje potencijal da poveća permeabilnost bioloških membrana i samim tim poveća biološku raspoloživost teško rastvorljivih lekovitih

---

<sup>17</sup> Labrasol® (Gattefosse, Francuska); Acconon® CC-400 (Abitec Corporation SAD).

<sup>18</sup> FDA IIG navodi supstance koje su odobrene za upotrebu kao pomoćne supstance u farmaceutskim preparatima na tržištu SAD

## 2. PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje

Prema Ph. Eur PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje odgovara monografiji makrogolglicerol-hidroksistearata. Makrogolglicerol-hidroksistearat se uglavnom sastoji od trihidroksistearil-glicerola etoksilovanog sa 7 – 60 molekula etilen-oksida (nominalna vrednost). Sadrži male količine makrogol-hidroksistearata i odgovarajućih slobodnih glikola. Predstavljaju široku grupu nejonskih PAM. Prilikom imenovanja pojedinačnog člana grupe obavezno se navodi nominalna vrednost.

PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje u svom komercijalnom obliku<sup>19</sup> se dobija reagovanjem 40 - 45 mol-a etilen-oksida sa 1 mol-om hidrogenizovanog ricinusovog ulja. Glavni sastojak je glicerol polietilenglikol-oksistearat, koji zajedno sa masnim kiselinama iz glicerol poliglikol-estara predstavlja hidrofobni deo proizvoda. Hidrofilni deo proizvoda se sastoji od polietilenglikola i glicerol-etoksilata.

Osobine ovog nejonskog surfaktanta prikazane su u Tabeli 2.1.

**Tabela 2.1 - Osobine PEG – 40 hidrogenizovanog ricinusovog ulja**

Izgled	<i>bela do žućkasta meka pasta</i>
Tačka očvršćavanja	<i>20 – 28 °C</i>
Hidroksilni broj	<i>60 - 75</i>
Jodni broj	<i>≤ 1</i>
pH vrednost 10 % vodenog rastvora	<i>6 - 7</i>
Viskozitet, Hoespeler, na 25 °C, 30 % vodeni rastvor	<i>20 – 40 mPas</i>
Teški metali	<i>10 ppm</i>
Saponifikacioni broj	<i>50 – 60</i>
Kiselinski broj	<i>≤ 1</i>
Sadržaj vode, K. Fisher	<i>≤ 2 %</i>
Intezitet boje 10 % vodenog rastvora (Ph. Eur.)	<i>žuta max 6</i>
Ostatak, pepeo	<i>≤ 0,25%</i>

<sup>19</sup> Cremophor®RH 40 (BASF, Nemačka); Kolliphor® RH 40 (Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka) i drugi.

PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje je nejonska PAM visoke HLB vrednosti (HLB = 14 – 16). Rastvara se u vodi (>490 g/l, na 25 °C), etanolu, 2-propanolu, n-propanolu, etilacetatu, hloroformu, ugljentetrahloridu, toluenu i ksilenu formirajući bistre rastvore, međutim sa povećanjem temperature rastvori se zamute. Ima vrlo slab miris i ukus. Meša se bistro sa masnim kiselinama i masnim alkohima zbog čega je vrlo pogodan za formulaciju lipidnih sistema tipa SEDDS i SMEDDS.

Pošto se dobija iz ricinusovog ulja kompleksnog sastava PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje predstavlja smešu različitih jedinjenja. Prema Ph. Eur sastav ricinusovog ulja je sledeći (Tabela 2.2)

**Tabela 2.2 - deo frakcija masnih kiselina u ricinusovom ulju (Ph. Eur)**

<b>Masna kiselina</b>	<b>(% m/m)</b>
Ricinolna kiselina	85 – 95
Oleinska kiselina	6-2
Linoleinska kiselina	5-1
Linolenska kiselina	1-0,5
Stearinska kiselina	1-0,5
Palmitinska kiselina	1-0,5
Dihidroksistearinska kiselina	0,5-0,3

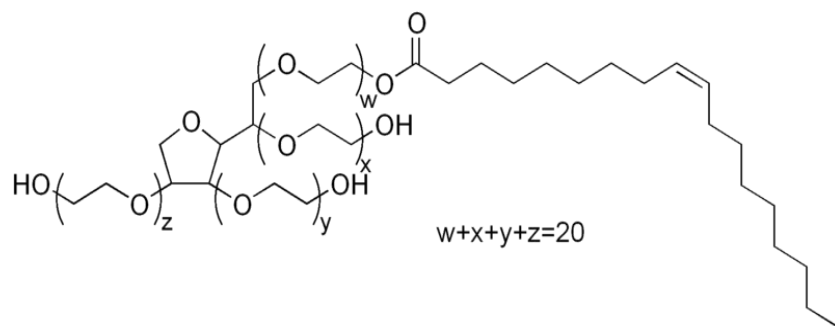
Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) nije nijedan od sastojaka ovog proizvoda koji su prisutni u koncentracijama  $\geq 0,1\%$  definisala kao materiju koja je verovatno, moguće ili potvrđeno kancerogena za ljude.. Brojnim ispitivanjima je pokazano da ne postoji značajna, toksičnost, mutagenost ili kancerogenost ricinusovog ulja (Litvinova i Fedorchenko, 2004; NTP, 1992).

Iz predhodno navedenih razloga može se zaključiti da PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje predstavlja pogodan ekscipijens za formulaciju peroralnih tečnih i čvrstih lipidnih sistema, pre svega SEDDS sistema, ali i SMEDDS sistema (Strickley, 2004).

### 3. Polisorbat – 80

Polisorbati predstavljaju grupu nejonskih tenzida. Sadrže mešavinu etoksilovanih estara različitih masnih kiselina. Međusobno se razlikuju po broju etoksi ostataka u polioksietilenskom lancu, kao i po broju i vrsti masnih kiselina.

Poliosorbat 80<sup>20</sup> (*sin.* polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat; POE-(20)-sorbitanmonooleat), CAS [9005-65-6], predstavlja mešavinu parcijalnih estara različitih masnih kiselina (Tabela 3.1), pre svega oleinske kiseline, sa sorbitolom i njegovim anhidridima koji su etoksilovani sa 20 mol – a etilen-oksida po jednom mol – u sorbitola i sorbitol-anhidrida (Elektronska baza podataka *vix*), (The Merc Index, monography No. 7742) (Slika 3.1)



Slika 3.1 - Strukturna formula Polisorbata – 80

**Tabela 3.1 - Udeo frakcija masnih kiselina u polisorbatu 80 (Ph. Eur)**

Masna kiselina	(% m/m)
Miristinska kiselina	max. 5,0
Palmitinska kiselina	max. 16,0
Palmitoleinska kiselina	max. 8,0
Stearinska kiselina	max 6,0
Oleinska kiselina	min. 58,0
Linolna kiselina	max. 18,0
Linolenska kiselina	max. 4,0

<sup>20</sup> Dostupan je u komercionalnom obliku : Emsorb<sup>®</sup> 6900 (Emery), Liposorb<sup>®</sup> O-20 (Lipo Chem.), Monitan<sup>®</sup> (Ives), Sorlate<sup>®</sup> (Abbott), T-Maz<sup>®</sup> 80 (Mazur), Tween<sup>®</sup> 80 (ICI).

Varma i saradnici su ispitivali neurotoksičnost polisorbata 80 kao i njegov bihejvioralni uticaj na miševе (Varma i sar., 1985). U svom radu su izjavili da polisorbat 80 kod miševa, nakon peroralne primene, prouzrokuje pad lokomotorne aktivnosti i hipertermiju pri dozi od 2 mg/kg, a pokazuje paralitičku aktivnost pri dozi od 10 mg/kg. Takođe, nakon intraperitonealne primene polisorbata 80 kod miševa u dozi od 2 mg/kg primećen je pad lokomotorne aktivnosti, depresija i potencijacija vremena spavanja uzrokovanog fenobarbitonom. Prilikom ispitivanja toksičnosti kod mačaka primećene su bihejvioralne i neurohemijske promene nakon intraperitonealne primene polisorbata 80. Međutim ove koncentracije polisorbata 80 daleko prevazilaze one koje se koriste prilikom formulisanja SEDDS i SMEDDS sistema, tako da nema bojazni od ispoljavanja toksičnih efekata prilikom peroralne primene ovih sistema. Upravo iz tog razloga FDA je odobrila široku primenu polisorbata 80. Koristi se kao emulgator, antipeneće sredstvo, sredstvo za dispergovanje i kao stabilizator u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (21CFR172.840).

Osnovne karakteristike polisorbata 80 prikazane su u Tabeli 3.2.

**Tabela 3.2 - Osobine Polisorbata 80 (Ph.Eur)**

Izgled	<i>Žućkasta ili braonkaso-žućkasta uljasta tečnost</i>
Relativna sustina	<i>1.10</i>
Hidroksilni broj	<i>65 - 80</i>
Kiselinski broj	<i>2,0</i>
Viskozitet, na 25 °C,	<i>oko 400 mPas</i>
Saponifikacioni broj	<i>45 - 55</i>
Sadržaj vode, K. Fisher	<i>≤ 3 %</i>
Sadržaj oksietilena	<i>65 – 69.5 %</i>
Peroksidni broj	<i>≤ 10</i>
Sadržaj etilen-oksida	<i>≤ 1 ppm</i>
Sadržaj dioksana	<i>≤ 10ppm</i>
Teški metali	<i>10 ppm</i>



Imajući u vidu da je kritična micelarna koncentracija (KMK) polysorbata 80 u vodi niska i iznosi oko 0.012 mM i da je HLB vrednost visoka (HLB = 15) ne iznenađuje činjenica da se ovaj surfaktant široko koristi prilikom formulisanja novijih SEDDS i SMEDDS sistema, bilo kao primarni ili kao sekundarni tenzid, koji nakon razblaživanja sa spoljašnom vodenom fazom brzo formiraju U/V emulzije ili mikroemulzije.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Младен Миловић

Број уписа 25/10

Студијски програм докторске академске студије из фармацеутске технологије

Наслов рада Развој, израда и карактеризација чврстих самодиспергујућих  
формулација за оралну примену

Ментор Др наука Светлана Ибрић

Потписани


изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 01.12.2014.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Младен Миловић

број уписа 25/10

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој, израда и карактеризација чврстих самодиспергујућих формулација за  
оралну примену

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.12.2014

Mladen Mladen

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развој, израда и карактеризација чврстих самодиспергујућих формулација за оралну примену

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 01.12.2014

Потпис докторанда

