

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 11.09.2014. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Mladena Milovića, pod naslovom:

Razvoj, izrada i karakterizacija čvrstih samodispergujućih formulacija za oralnu primenu

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sc. Zorica Đurić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Liljana Đekić, docent, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Dragana Vasiljević, docent, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
5. Dr sc. Branka Grujić, naučni saradnik, Galenika a.d., Beograd

je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta Mladena Milovića, pod naslovom: „**Razvoj, izrada i karakterizacija čvrstih samodispergujućih formulacija za oralnu primenu**“, napisana je na 166 strana, u 8 celina koje obuhvataju: *Uvod, Opšti deo, Ciljeve istraživanja, Eksperimentalni deo, Zaključke, Literaturu, Biografiju autora i Priloge*. Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Sam tekst disertacije pisan je jasnim, preglednim stilom i dokumentovan sa 32 tabele, 46 grafičkih prikaza, kao i sa 198 literaturna navoda koji se tiču razmatrane problematike, kao i 8 elektronskih baza podataka.

Opšti deo obuhvata 8 odeljaka: Lipidne formulacije za peoralnu primenu, Lipidni ekscipijensi, Studije faznog ponašanja, Čvrsti samodispergujući sistemi (*eng. Solid*

Self(Micro)Emulsifying Drug Delivery Systems) – SS(M)EDDS, Savremeni porozni adsorbensi, *In vitro* model lipolize, Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje upotreba karbamazepina i Tehnike karakterizacije čvrstih samodispergujućih sistema za oralnu primenu.

U **Opštem delu** su opisane karakteristike lipidnih formulacija i lekovite supstance od kojih zavisi brzina oslobađanja i resorpcije lekovite supstance. Opisane su prednosti formuliranih lipidnih sistema u poređenju sa konvencionalnim farmaceutskim oblicima u pogledu poboljšanja resorpcije leka. Sumirani su mehanizmi kojima lipidni ekscipijensi povećavaju apsorpciju leka i opisan je sistem klasifikacije lipidnih formulacija u kome su lipidne formulacije podeljene na osnovu sastava i odnosa lipidnih ekscipijenasa. Opisana je podela samodispergujućih formulacija, sa posebnim osvrtom na samoemulgujuće i samomikroemulgujuće sisteme, njihove sličnosti i razlike, kao i mehanizam nastanka emulzije odnosno mikroemulzije nakon dispergovanja u vodi. U delu *Lipidni ekscipijensi* navedena je podela lipidnih ekscipijenasa, osnovne karakteristike i pobrojani su faktori na osnovu kojih se vrši izbor lipidnih ekscipijenasa prilikom formulacije lipidnih sistema. Opisan je uticaj kosurfaktanta i korastvarača na karakteristike lipidne formulacije. U delu *Studije faznog ponašanja* opisana su dva osnovna pristupa ispitivanja faznog ponašanja lipidnih formulacija, istaknute njihove prednosti i nedostaci. Opisan je postupak kreiranja ternernog i pseudo-ternernog faznog dijagrama. U delu *Čvrsti samodispergujući sistemi* istaknute su njihove prednosti u odnosu na tečne lipidne formulacije. Opisani su osnovni postupci izrade čvrstih samodispergujućih sistema. U delu *Savremeni porozni adsorbensi* istaknut je sastav savremenih poroznih adsorbenasa i opisane osnovne karakteristike pomoću kojih se vrši odabir prilikom formuliranja čvrstih samodispergujućih sistema. Data je podela poroznih adsorbenasa na osnovu porekla, kao i na osnovu veličine pora i istaknuta su dva osnovna principa prilikom njihovog sintetisanja. Prikazane su osnovne fizičko-hemijske karakteristike mezoporoznih adsorbenasa kao i poroznih adsorbenasa na bazi silicijum-dioksida i magnezijum-aluminometasilikata. Opisan je mehanizam poboljšanja brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci korišćenjem poroznih adsorbenasa kao i mogućnost funkcionalizacije njihove površine. Ukazano je na prednosti prirodnih adsorbenasa u odnosu na sintetske i opisane karakteristike i prednost potencijalnog korišćenja diatomitnih mikrokapsula. U delu *In vitro model lipolize* opisana su dva osnovna pristupa u izvođenju *in vitro* testa lipolize i ukazano je na neophodnost primene ovog testa kao vida karakterizacije lipidnih formulacija u cilju tačnijeg predviđanja ponašanja lipidnog sistema *in vivo*. Opisani su eksperimentalni uslovi tri osnovna modela lipolize. Detaljno je prikazana uloga svake komponente medijuma u kome se vrši test. Objasnjen je postupak određivanja sadržaja aktivne supstance iz uzoraka uzetih tokom izvođenja testa i prikazan je mehanizam nastajanja i sastav faza koje se u uzorku formiraju. U delu *Fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina* istaknute su fizičko-hemijske osobine, stabilnost, delovanje i upotreba karbamazepina. Prikazani su polimorfni oblici anhidrovanog karbamazepina kao i uticaj određenih ekscipijenasa i tehnoloških postupaka na polimorfni prelaz. U delu *Tehnike karakterizacije čvrstih samodispergujućih sistema za oralnu primenu*, opisana je karakterizacija samodispergujućih formulacija osnovnim tehnikama u cilju utvrđivanja veličine prečnika kapi nakon dispergovanja, identifikacije polimorfnog oblika lekovite supstance nakon adsorbovanja na porozan adsorbens i brzine rastvaranja lekovite supstance iz kapsula punjenih praškom čvrstog samodispergujućeg sistema.

Ciljevi istraživanja - Ciljevi istraživanja obuhvataju formulaciju i sveobuhvatnu karakterizaciju različitih čvrstih samodispergujućih sistema. Istraživanje se sastoji iz četiri dela i ima za cilj: (1) formulisanje i karakterizaciju čvrstog samomikroemulgujućeg sistema (SSMEDDS) sa karbamazepinom kao model teško rastvorljive lekovite supstance, (2) formulisanje i karakterizaciju čvrste samoemulgujuće fosfolipidne suspenzije (SSEPS) sa karbamazepinom kao model supstancom, (3) formulisanje i karakterizaciju samoemulgujućih peleta, (4) ispitivanje predhodno izrađenih čvrstih samomikroemulgujućih formulacija metodom *in vitro* dinamičke lipolize.

Prvi deo istraživanja - U delu *Materijali i metode* prikazani su svi materijali koji su korišćeni prilikom formulisanja različitih samomikroemulgujućih sistema, postupak konstruisanja pseudoternernog faznog dijagrama, određivanje adekvatnog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta (K_m) kao i odnosa surfaktantne i uljane faze, kao i metode karakterizacije tečnog samomikroemulgujućeg sistema. Prikazan je postupak određivanja rastvorljivosti karbamazepina u komponentama samomikroemulgujućeg sistema adekvatnom HPLC metodom. Prikazana je detaljno izrada čvrstih samomikroemulgujućih sistema kao i tehnike koje su korišćene za fizičko-hemijsku karakterizaciju karbamazepina iz čvrstih samomikroemulgujućih formulacija.

Fizičko-hemijska karakterizacija tečne samomikroemulgujuće formulacije obuhvata:

- Metodu titracije homogene smeše ulja, surfaktanta i kosurfaktanta sa vodom, pri čemu je korišćen fiksni odnos surfaktanta i kosurfaktanta 1:1 (surfaktantna faza). Smeše surfaktane faze i ulja u odnosima od 9:1 do 1:9 titrirane su sa vodom i praćene su promene u sistemu, pri čemu su kao mikroemulzije smatrani samo jednofazni, transparentni, nisko viskozni sistemi. Nakon titracije konstruisan je pseudoternerni fazni dijagram.

- Ispitivanje reološkog ponašanja odabrane tečne samomikroemulgujuće formulacije sa i bez lekovite supstance pri različitim udelima vode korišćenjem rotacionog reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) sa Z3 DIN dodatkom za ispitivanje tečnih formulacija i MP 50 dodatkom (dijametar 12 mm, 1° ugao, rastojanje 50 μ m) za ispitivanje polučvrstih formulacija.

- Određivanje veličine prečnika kapi kao i raspodele veličine kapi, primenom fotonske korelacione spektroskopije prilikom razblaživanja SMEDDS sistema sa i bez karbamazepina sa vodom 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° .

Fizičko-hemijska karakterizacija čvrstih samomikroemulgujućih formulacija obuhvata:

- Diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC), korišćenjem uređaja Shimadzu DSC-50 (Shimadzu Korporacija, Japan). U temperaturnom opsegu od 20 – 220 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min i brzini protoka azota od 50 ml/min, praćene su termalne promene u uzorku u cilju utvrđivanja prisustva određenog polimorfnog oblika karbamazepina.

- FT-IR spektroskopiju skeniranjem čvrstih formulacija u opsegu talasnog broja 600–4000 cm^{-1} korišćenjem FT-IR spektrometra Shimadzu IR-Prestige-21, udruženog sa horizontalnim Golden Gate MKII ATR sistemom sa jednostrukom refleksijom (Specac, Velika Britanija) i Zn Se sočivom. Svaki spektar predstavlja prikaz srednjih vrednosti intenziteta od 32 skeniranja, pri rezoluciji snimanja od 4 cm^{-1} .

- *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz različitih SSMEEDS formulacija 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, volumen medijuma 300 ml, brzina okretanja rotirajućeg elementa 100 o/min.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

Drugi deo istraživanja - U delu *Materijali i metode* prikazani su svi materijali koji su korišćeni prilikom formulisanja različitih čvrstih samoemulgujućih fosfolipidnih suspenzija, postupak određivanje adekvatnog odnosa surfaktanta i kosurfaktanta (K_m) kao i odnosa surfaktantne i uljane faze, metode izrade čvrstih samoemulgujućih fosfolipidnih suspenzija (SSEPS) i metode fizičko-hemijske karakterizacije SSEPS.

Fizičko-hemijska karakterizacija tečne samoemulgujuće fosfolipidne suspenzija obuhvata:

- Određivanje veličine prečnika kapi kao i raspodele veličine kapi, primenom fotonske korelacione spektroskopije (PCS) korišćenjem Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Engleska) uređaja u opsegu vrednosti od 0,6 nm do 3 μm na temperaturi od $20 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

- Optičku analizu SEPS formulacija korišćenjem optičkog mikroskopa Axioscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Nemačka) sa integrisanom kamerom i integralnim softverom za analizu fotografija. Meren je Martinov dijametar čestica karbamazepina.

Fizičko-hemijska karakterizacija čvrstih samoemulgujućih fosfolipidnih suspenzija obuhvata:

- Diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC) ispitivanih uzoraka korišćenjem uređaja DSC 821 (Mettler Toledo AG, Nemačka). Odmerena količina uzorka je zagrevana u temperaturnom opsegu 20 – 250 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C/min u struji azota N₂. Postojanje određene kristalne forme karbamazepina (CBZ) potvrđeno je prisustvom endotermnih i/ili egzotermnih pikova.

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

- *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ispitivanih SSEPS formulacija korišćenjem VanKel 700 (Vankel Industries, Edison, SAD) aparata sa ispitivanje brzine rastvaranja sa rotirajućim korpicama. Kao medijum je korišćen fosfatni pufer pH = 6,8 na 37°C ± 0,5°C.

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

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

Treći deo istraživanja - U delu *Materijali i metode* prikazani su svi materijali koji su korišćeni prilikom formulisanja samoemulgujućih peleta, postupak izrade samoemulgujućih peleta kao i metode fizičko-hemijske karakterizacije.

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

Fizičko-hemijska karakterizacija samoemulgujućih peleta obuhvata:

- Optičku mikroskopiju samoemulgujućih peleta pomoću optičkog mikroskopa Axioscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Nemačka) sa integrisanom kamerom i integralnim softverom Easy-Measur (Inteq Informationstechnik GmbH, Nemačka) za analizu fotografija.

- Određivanje veličine prečnika kapi i raspodele veličine kapi primenom fotonske korelacione spektroskopije (PCS) 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° .

- Diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC) peleta obloženih samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom karbamazepina korišćenjem uređaja DSC 821 (Mettler Toledo AG, Nemačka). Uzorci su zagrevani u temperaturnom opsegu $20 - 220^{\circ}\text{C}$ pri brzini zagrevanja od $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ u struji azota. Postojanje određene kristalne forme karbamazepina potvrđeno je prisustvom endotermnih i/ili egzotermnih pikova.

- Difrakciju X – zraka (XRD) uzoraka peleta korišćenjem uređaja Bruker D8 Advance difraktometra opremljenog sa bakarnom katodom ($\lambda = 0,15418\text{ nm}$, 40 kV, 20 mA). Merenja su vršena pri širini koraka merenja od $0,02^{\circ}$ na 2θ između 4° i 40° , na temperaturi od 25°C . Postojanje karakterističnih pikova ukazuje na prisustvo određene kristalne forme karbamazepina.

- *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz samoemulgujućih peleta korišćenjem VanKel 700 (Vankel Industries, SAD) aparata sa ispitivanje brzine rastvaranja sa rotirajućim korpicama. Kao medijum je korišćena 0,1 M HCl na $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Četvrti deo istraživanja - U delu *Materijali i metode* prikazani su svi materijali koji su korišćeni prilikom izvođenja testa dinamičke *in vitro* lipolize kao i za određivanja sadržaja karbamazepina iz različitih faza koje se formiraju prilikom centrifugiranja uzoraka uzetih u određenim vremenskim intervalima u toku lipolize. Detaljno je opisan postupak izvođenja testa koji predstavlja modifikovan model lipolize istraživačke grupe iz Kopenhagena.

Određivanje sadržaja karbamazepina iz uzoraka uzetih u određenim vremenskim intervalima u toku lipolize obuhvata:

- Određivanje sadržaja karbamazepina iz različitih faza korišćenjem adekvatne HPLC metode. Uzorci vodene faze su pre injektovanja razblaženi sa mobilnom fazom kako bi koncentracija karbamazepina bila u opsegu kalibracione krive. Uzorcima faze pelete dodato

je 10 ml etanola i 50 μ l 1 M HCl, nakon čega su ostavljeni na ultrazvučnom 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.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

B. Opis postignutih rezultata

U **Prvom delu istraživanja** je formulisan i okarakterisan tečni samomikroemulgujući sistem, definisana metoda izrade pet različitih čvrstih samomikromulgujućih sistema i urađena njihova fizičko-hemijska karakterizacija. Definisan je pseudoternerni fazni dijagram za voda (V)/polisorbata 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje(C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) sistem pri vrednosti S/C odnosa (K_m) 1:1. Pokazano je da se mikroemulzioni sistem formira samo pri razblaživanju sistema sa SC/O odnosom 8:2 i većim, dok sistemi sa nižim SC/O odnosom, nakon razblaženja sa vodom, formiraju emulzije ili druge termodinamički nestabilne sisteme. Rastvorljivost karbamazepina je ispitivana u cilju utvrđivanja kapaciteta solubilizacije praznog samomikroemulgujućeg (SMEDDS) sistema, SC/O odnos 8:2, za karbamazepin. Rastvorljivost CBZ je ispitivana i u tečnim ekscipijensima kako bi se utvrdio njihov pojedinačni kapacitet solubilizacije za CBZ. Rastvorljivost karbamazepina je najveća u polisorbata 80, čak 328 puta veća nego u 0,1 M HCl i 14,52 puta veća nego u trigliceridima srednje dužine. Na osnovu ovih rezultata moguće je zaključiti da je za visok kapacitet solubilizacije tečne SMEDDS formulacije za karbamazepin najverovatnije odgovoran polisorbata 80. Reološka merenja su vršena na ispitivanom SMEDDS sistemu bez i sa karbamazepinom, 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. Pokazano je da su uzorci bez karbamazepina sa 10, 20 i 60 % V (m/m), kao i uzorci sa karbamazepinom sa 10 i 20 % vode V (m/m) pokazali tipičan Njutnovski tip proticanja, sa linearnim odnosom napona smicanja (τ) i brzine smicanja ($\dot{\gamma}$), koji predstavlja najčešći tip proticanja za mikroemulzije. Uzorci sa karbamazepinom sa 10 i 20 % vode V (m/m) pokazuju više vrednosti dinamičkog viskoziteta u odnosu na uzorke bez karbamazepina. Ispitivani uzorak sa karbamazepinom sa 60 % V (m/m), za razliku od odgovarajućeg uzorka bez karbamazepina je pokazao Bingamov tip proticanja. Bingamov tip proticanja karakteriše linearna zavisnost napona smicanja (τ) od brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) nakon inicijalnog praga napona smicanja (τ_0). Uzorci sa 30 i 40 % V (m/m) su pokazali tiksotropno ponašanje pri čemu su uzorci sa karbamazepinom pokazali nešto niže vrednosti dinamičkog viskoziteta. Uzorci sa 50 % V (m/m) bez i sa karbamazepinom su pokazali Ostvaldov tip proticanja koga karakteriše pad viskoziteta pri većim brzinama smicanja. Fotonska korelaciona spektroskopija polisorbata 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje(C)/trigliceridi srednje dužine lanca (O) sistem SC/O = 8/2 pri sadržaju vode od 95 % (m/m) je vršena kako bi se odredila veličina prečnika kapi i raspodela veličine kapi. Ispitivani sistem je pokazao monomodalnu raspodelu veličine bez obzira da li sadrži karbamazepin ili ne, sa prosečnom veličinom prečnika kapi od oko 19 nm, što odgovara mikroemulzijama. SMEDDS sistem sa karbamazepinom je pokazao više vrednost indeksa polidisperznosti (PdI) u odnosu na odgovarajući sistem bez karbamazepina ($0,203 \pm 0,027 > 0,128 \pm 0,01$). DSC analiza čistog karbamazepina je pokazala da termogram odgovara P – monokliničkom polimorfnom obliku karbamazepina (karakterističan pik topljenja na 175,5°C, koji odgovara tački topljenja P – monokliničkog polimorfnog oblika, a zatim egzotermni pik rekristalizacije na 181,3°C u karbamazepin formu I, posle kog je sledio endotermni pik topljenja ove forme na 192,6°C). DSC krive fizičkih smeša karbamazepina i adsorbensa (Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylsya[®] 350 i Sylsya[®] 320) su pokazale odsustvo pikova, što ukazuje da je CBZ prešao u amorfni oblik. To je potvrđeno FT-IR analizom, pri čemu je primećena deformacija karakterističnog pika u FT-IR spektrima za karbamazepin formu III na 1605 i 1593 cm⁻¹ (–C=O vibracija i –NH deformacija) ukazujući da je formiranju amorfnog oblika karbamazepina doprinela vodonična veza između karbonilne grupe karbamazepina i silanolne grupe adsorbensa. DSC analize pet različitih SSMEDDS formulacija takođe pokazuju

odsustvo karakterističnih pikova topljenja, a FT-IR analizom SSMEDDS formulacija takođe nisu pokazani karakteristični pikovi za karbamazepin, pa se samim tim može zaključiti da je karbamazepin u ispitivanim SSMEDDS formulacijama u amorfnom obliku. *In vitro* brzina rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS formulacija je pokazala znatno brže oslobađanje karbamazepina. Međutim, različite SSMEDDS formulacije su pokazale različitu brzinu oslobađanja. SSMEDDS formulacije sa Sylysia[®] 350 i Sylysia[®] 320 adsorbensima su pokazale oslobađanje karbamazepina preko 90 % u prvih 15 minuta trajanja testa. Za razliku od njih, formulacije sa Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 adsorbensima su pokazale sporije oslobađanje. SSMEDDS formulacija sa Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnosom 1:2 pokazuje brzo oslobađanje u prvih 20 minuta trajanja testa (oko 75 %) nakon čega se oslobađanje znatno usporava, dok SSMEDDS formulacija sa Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnosom 1:1 pokazuje brzo oslobađanje karbamazepina (do 45 %) u prvih 20 minuta, nakon čega se brzina oslobađanja karbamazepina usporava. SSMEDDS formulacija sa Neusilin[®] FL2/SMEDDS odnosom 1:1 pokazuje rezultate brzine rastvaranja karbamazepina slične SSMEDDS formulaciji Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnos 2:1. Različiti rezultati brzine rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS formulacija sa adsorbensima Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 mogu se objasniti različitom specifičnom površinom i količinom formulacije koja ostaje „zarobljena” unutar pora adsorbensa. Kod SSMEDDS formulacija sa Sylysia[®] 350 i Sylysia[®] 320 adsorbensima to se ne dešava, usled različite prirode i strukture pora.

U **Drugom delu istraživanja** formulisana je i okarakterisana tečna samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija (SEPS) i definisane metode izrade čvrstih samoemulgujućih fosfolipidnih suspenzija (SSEPS) kao i tehnike njihove fizičko-hemijske karakterizacije. Definisan je PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/lecitin/propilen-glikol (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca (O) 4,8/1,6/1,6/2 samoemulgujući sistem i u njemu je dispergovan karbamazepin tako da je konačan sadržaj karbamazepina bio 40 % (m/m). Ispitivani su sistemi sa SC/O odnosom 7:3, 8:2 i 9:1 pri S/C odnosu 2:1, 3:2 i 1:1 pri čemu je na osnovu prosečne veličine prečnika kapi, indeksa polidisperznosti i stabilnosti nakon 100x razblaženja sa vodom i sadržaja lecitina sistem sa SC/O odnosom 8:2 pri S/C odnosu 3:2 odabran za dalja ispitivanja zato što je ovaj sistem pokazao veličinu prečnika kapi ispod 200 nm, monomodalnu raspodelu veličine kapi, stabilnost nakon 100x razblaženja utvrđenu centrifugiranjem uzoraka i visok sadržaj lecitina. Fotonska korelaciona spektroskopija (PCS) SEPS formulacije bez karbamazepina i supernatanta SEPS sa karbamazepinom nakon 100 x razblaženja sa vodom su pokazali prosečnu veličinu prečnika kapi manju od 200 nm sa monomodalnom distribucijom veličine. Sadržaj karbamazepina u supernatantu je određen spektrofotometrijski na 287 nm i iznosi 6 % m_{cbz}/m_{ukupna} . Nakon razblaženja, supernatant SEPS formulacije sa karbamazepinom pokazuje nešto više vrednosti za veličinu prečnika kapi i indeks polidisperznosti. Pomoću optičke mikroskopije utvrđeno je da veličina čestica karbamazepina u tečnoj SEPS nije homogena, međutim nije pokazano prisustvo znatno velikih čestica karbamazepina. Prosečna vrednost Martinovog dijametra, merenog i aksijalno i radialno u odnosu na osu čestice kristala karbamazepina u tečnoj SEPS formulaciji je oko 7,66 μ m. XRD analiza čistog karbamazepina je potvrdila da se nalazi u formi III (P – monokliničan polimorfni oblik) sa karakterističnim pikovima na 2θ – 13,02; 15,02; 19,42; 23,82 i 24,62. SSEPS₁ formulacija izrađena prema metodi A (metoda direktne adsorpcije) pokazuje pikove karakteristične za P – monokliničan oblik karbamazepina što ukazuje da prilikom ove metode izrade SSEPS ne dolazi do polimorfnog prelaza karbamazepina. XRD analizom SSEPS₂ formulacije izrađene prema metodi B (evaporacijom rastvarača) uočeni su se nešto drugačiji pikovi, 2θ – 8,62; 13,22; 18,42; 20,22; 25,02 i 26,62, koji su karakteristični

za trigonalni oblik karbamazepina (karbamazepin forma II), što ukazuje da ukoliko se SSEPS formulacija izrađuje uparavanjem etanolnog rastvora komponenti sa dispergovanim dijetomitnim mikrokapsulama na 40 °C (metod B), karbamazepin 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 karbamazepin forma III, zbog čega prisustvo trigonalnog oblika u SSEPS₂ formulaciji izrađenoj prema metodi B predstavlja nedostatak ove metode. XRD analiza fizičke smeše karbamazepina i dijetomitnih mikrokapsula pokazuje prisustvo pikova karakterističnih za P - monokliničan oblik karbamazepina (forma III), 2θ – 13,02; 15,02; 19,42; 23,82 i 24,62, međutim oni su manjeg intenziteta, što ukazuje da je deo karbamazepina prešao u amorfan oblik. XRD analiza čvrste disperzije karbamazepina i dijetomitnih mikrokapsula, korišćenjem etanolnog rastvora karbamazepina, ne pokazuje pikove karakteristične za P-monokliničan, ni bilo koji drugi polimorfni oblik, što potvrđuje da je u čvrstoj disperziji karbamazepin prvobitno u amorfnom obliku. DSC analize obe vrste SSEPS formulacije pokazuju odsustvo pika topljenja karbamazepina. Pošto je XRD analizom pokazano da se karbamazepin u SSEPS formulacijama nalazi u kristalnom obliku, može se zaključiti da u toku DSC analize dolazi do rastvaranja karbamazepina u tečnim komponentama SSEPS sistema, što je potvrđeno i DSC analizom tečne SEPS, koja takođe ne pokazuje pikove topljenja karakteristične za P - monokliničan karbamazepin. SEM analiza SSEPS formulacije pripremljene prema metodi A pokazuje da tečna SEPS formulacije nije ravnomerno raspoređena po površini adsorbensa, dok SSEPS formulacija pripremljena prema metodi B pokazuje uniformnu raspodelu tečne SEPS na površini dijetomitnih mikrokapsula, pri čemu je tečna SEPS većim delom prisutna unutar pora adsorbensa. Međutim, velika, centralna šupljina nije kompletno ispunjena sa tečnom SEPS. Prisustvo amorfnog karbamazepina detektovanog XRD kao i prisustvo adsorbensa velike specifične površine je razlog znatno veće brzine rastvaranja karbamazepina iz čvrste disperzija karbamazepina i dijetomitnih mikrokapsula kao i fizičke smeše. Brzina rastvaranja karbamazepina iz SSEPS₁ 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 dijetomitnih mikrokapsula u etanolnom rastvoru komponenti SEPS tokom 24h na 40°C) je pokazala najveću brzinu rastvaranja usled prisustva tečne SEPS unutar pora dijetomitnih mikrokapsula. Međutim, prisustvo trigonalnog oblika u SSEPS₂ formulaciji pripremljenoj metodom B, iako pokazuje veću brzinu rastvaranja, predstavlja nedostatak ove metode izrade, jer jedini polimorfni oblik karbamazepina koji ima prihvatljivu farmaceutsku primenu je P-monokliničan oblik (forma III), čime metoda pripreme A dobija na značaju. Nakon izvedenih studija stabilnosti (40°C i 70% RH, 10 nedelja) ne dolazi do promene polimornog oblika karbamazepina u ispitivanim SSEPS formulacijama ukazujući na sposobnost PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi/lecitin/propilen-glikol/ trigliceridi srednje dužine lanca sistema sa dijetomitnim mikrokapsulama kao adsorbensima da održi prvobitan polimorfni oblik karbamazepina. Takođe ne dolazi ni do značajne promene brzine rastvaranja (vrednost faktora razlike f_1 u intervalu od 0 – 15 i vrednost faktora sličnosti f_2 u intervalu od 50 – 100).

U **Trećem delu istraživanja** formulisane su i okarakterisane samoemulgujuće pelete, definisan postupak izrade kao i tehnike fizičko-hemijske karakterizacije. Posmatranjem peleta obloženih samoemulgujućom fosfolipidnom suspenzijom karbamazepina pomoću svetlosnog

mikroskopa uočene su kristali karbamazepina na njihovoj površini. Fotonska korelaciona spektroskopija razblaženja formulacije 100x sa vodom (u odnosu na sadržaj lipidnih ekscipijenasa) je pokazala monomodalnu raspodelu veličine prečnika kapi sa prosečnom vrednošću oko 300 nm, što je još uvek u opsegu emulzija. DSC analiza samoemulgujućih peleta sa i bez karbamazepina 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 karbamazepina. XRD dijagram samoemulgujućih peleta bez CBZ pokazuje karakteristične pikove kristala saharoze koji se delimično preklapaju sa pikovima karakterističnim za P-monoklinički karbamazepin. Međutim, između XRD dijagrama samoemulgujućih peleta bez karbamazepina i dijagrama samoemulgujućih peleta sa karbamazepinom uočene su male razlike odnosno postojanje novih malih pikova, kao i deformacija postojećih. Uzimajući u obzir količinu prisutnog karbamazepina na vrednostima 2θ u opsegu $2\theta = 15 - 19$ i $2\theta = 26 - 29$ ukazuje da je karbamazepin prisutan u P – monokliničkom polimorfnom obliku. Brzina rastvaranja karbamazepina iz samoemulgujućih peleta je znatno veća u odnosu na čist karbamazepin. Prisustvo samoemulgujućeg sistema, bogatog surfaktantima, svakako doprinosi većoj brzini rastvaranja karbamazepina, ali značajan doprinos ima i velika površina peleta.

U **Četvrtom delu istraživanja** prikazan je dinamički *in vitro* test lipolize čvrstih samomikroemulgujućih sistema okarakterisanih u prvom delu istraživanja. Vršena je uporedna analiza profila stepena lipolize i profila brzine rastvaranja. Lipoliza se intenzivnije dešava u SSMEDDS formulacijama sa Sylysia[®] 350 i Sylysia[®] 320 poroznim adsorbensima u odnosu na SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 adsorbensima zbog drugačije strukture i hemijskog sastava površine adsorbensa. Stepem lipolize (% oslobođenih masnih kiselina) je u dobroj korelaciji sa količinom rastvorenog karbamazepina (%) oslobođenog prilikom *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja ($R > 0,9$ izuzev kod SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnosom 1:1 gde je $R=0,87$). Pri radnim uslovima dinamičkog *in vitro* modela lipolize karbamazepin se brzo oslobađa iz formulacija, iako se lipoliza postepeno dešava, uzrokujući da kod skoro svih SSMEDDS formulacija koncentracija karbamazepina u vodenoj fazi već u prvih 5 minuta bude najveća i da kako lipoliza odmiče, koncentracija karbamazepina u ovoj fazi postepeno opada. Stepem lipolize kod SSMEDDS formulacija sa Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 adsorbensima je u dobroj korelaciji sa specifičnom površinom, pri čemu veća specifična površina uzrokuje na manji stepen lipolize. Može se primetiti da se u toku trajanja testa količina karbamazepina blago povećava u fazi pelete, a smanjuje u vodenoj fazi što ukazuje da se prilikom lipolize smanjuje kapacitet solubilizacije polisorbit 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca (O) SMEDDS fomulacije za karbamazepin, ali to povećanje, odnosno smanjenje, nije veliko i iznosi od 1 – 7 %. Intenzivnija lipoliza uzrokuje veći sadržaj karbamazepina u fazi pelete kod SSMEDDS formulacija sa Sylysia[®] 350 i Sylysia[®] 320 adsorbensima. SSMEDDS formulacija sa Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnosom 2:1 pokazuje najmanji udeo karbamazepina u fazi pelete, najverovatnije usled najveće koncentracije tečne SMEDDS (i posledično surfaktanata) i najmanjeg udela adsorbensa.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Gastrointestinalna apsorpcija karbamazepina, nakon peroralne primene, je slaba i često nepredvidljiva, što dovodi do nepotpune biološke raspoloživosti (Gavini i sar., 2006; Kobayashi i sar., 2000). Prema Biofarmaceutskom klasifikacionom sistemu (BKS) karbamazepin, kao supstanca slabo rastvorljiva u vodi (0,17 mg/ml na 24 °C) (El-Zein i sar., 1998), sa visokom permeabilnošću pripada klasi II BKS klasifikacije (Lindenberg i sar., 2004). Pošto je rastvorljivost karbamazepina ograničavajući faktor za njegovu apsorpciju, ova aktivna komponenta je idealan kandidat za model supstancu prilikom formulacije lipidnih sistema (Pouton, 2000). Formulacijom lipidnih sistema sa karbamazepinom može se postići veća brzina rastvaranja (Do Thi i sar., 2009). Uspešna komercijalizacija preparata ciklosporina pod nazivom Neoral Sandimmun[®], koji predstavlja lipidni sistem, ukazuje da je tržište otvoreno za nove lipidne formulacije (Vanderscher i Meinzer, 1994). Samomikroemulgujući sistem (SMEDDS) predstavljaju izotropnu smešu ulja, surfaktanta, kosurfaktanta i ponekad korastvarača i lekovite supstance (Pouton i Porter, 2008) koje nakon dispergovanja u spoljašnjoj fazi formiraju termodinamički stabilan sistem sa veličinom kapi manjom od 50 nm (Gursoy i Benita, 2004). Međutim, pošto su razvijene i sintetisane brojne PAM, rastvarači i ulja različitih osobina, nije moguće davati opšte zaključke u pogledu izbora vrste i koncentracije surfaktanta i uljane faze, već je neophodno ispitati svaki sistem ponaosob. Poznate su samomikroemulgujuće formulacije različitog sastava (Pather i sar., 2001; Cannon, 2005) međutim, polisorbat 80 (S)/PEG – 40 hidrogenizovano ricinusovo ulje(C)/ trigliceridi srednje dužine lanca (O), SC/O odnos 8/2 pri S/C odnosu (Km) 1:1, SMEDDS formulacija je prvi put okarakterisana u ovoj doktorskoj disertaciji, kao i formulisanje čvrstih SMEDDS (SSMEDDS) korišćenjem Neusilin[®] UFL2, Neusilin[®] FL2, Sylsya[®] 350 i Sylsya[®] 320 adsorbenasa. SSMEDDS formulacije su dodatno okarakterisane korišćenjem dinamičkog *in vitro* modela lipolize. Ovaj model simulira varenje lipidnih komponenti samodispergujućih sistema, prilikom čega se može ispitati uticaj varenja na kapacitet solubilizacije lipidnog sistema za aktivnu komponentu. Predstavlja jednu od savremenih i sve više neophodnih tehnika karakterizacije lipidnih formulacija u cilju adekvatne procene ponašanja sistema *in vivo* nakon peroralne primene (Zangenberg i sar., 2001a, 2001b). Prilikom lipolize ispitivanih SSMEDDS formulacija dolazi do blagog pada kapaciteta solubilizacije (1-7 %), što je u skladu sa rezultatima Speybroeck i saradnika koji su *in vitro* modelom lipolize ispitivali SSEDSS sistem, sa Neusilin[®] - om US2 kao nosačem i danazolom kao model supstancom, i pokazali smanjene koncentracije danazola u vodenoj fazi (za 25 – 30 %) i posledično povećane koncentracije u fazi pelete (Speybroeck i sar., 2012).

Iako lipidne formulacije mogu znatno da poboljšaju apsorpciju lekovite supstance, ove formulacije često sadrže visok sadržaj surfaktanata koji mogu potencijalno uzrokovati iritaciju. Kako bi se to sprečilo, prilikom formulacije samoemulgujućih sistema, poželjno je koristiti surfaktante iz GRAS grupe (*Generally Recognized As Safe*) kao što su fosfolipidi, pre svega lecitin (CFR, odeljak 184, pododeljak B). U literaturi se prvi put pominje termin samoemulgujuća fosfolipidna suspenzija (SEPS) u radu Shanmugam i saradnika - Phosal[®] 53 MCT/Tween 80/Capryol TMD-a/Tokoferol/Glicerin SEPS formulacija luteina (40 % lutein (m/m)) (Shanmugam i sar., 2011). PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/lecitin/propilenglikol (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca (O) pri SC/O odnosu 8:2 i S/C odnosu (Km) 3:2, SEPS formulacija karbamazepina (karbamazepin 40 % (m/m)) je prvi put formulisana i okarakterisana u ovoj doktorskoj disertaciji. Dijatomitne mikrokapsule, kao prirodni porozni

adsorbensi, dobijaju se jednostavnim prečišćavanjem uzoraka iz prirode i dostupne su u velikim količinama u rudarskoj industriji. Poseduju kompleksnu 3d strukturu sa visoko uređenom makro- i mikroporoznom strukturom, pri čemu im je i cena relativno niska (300 dolara po toni materijala). Potencijal dijamitnih mikrokapsula kao poroznih adsorbenasa za indometacin i gentamicin opisan je erativno skoro u literaturi (Aw i sar., 2011; Losic i sar., 2009, 2010; Simovic i sar., 2011). Međutim, upotreba dijamitnih mikrokapsula kao adsorbenasa prilikom formulisanja čvrstih SEPS (SSEPS) formulacija, kao i karakterizacija istih, prvi put je opisana u ovoj doktorskoj disertaciji.

Formulacija samoemulgujućih peleta nanošenjem PEG-8 kaprilno/kaprinski gliceridi (S)/lecitin/propilen-glikol (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca (O), pri SC/O odnosu 8:2 i S/C odnosu (Km) 3:2 SEPS formulacije korišćenjem komore sa fluidizirajućim protokom vazduha sa tačno definisanim procesnim parametrima prvi put je opisana u ovoj doktorskoj disertaciji. Iako su samoemulgujuće pelete poznate već duže vreme, prilikom njihove izrade retko se koristi komora sa fluidizirajućim protokom vazduha, jer zahteva definisanje procesnih parametara od formulacije do formulacije, kao i korišćenje dodatnih ekscipijenasa koji omogućavaju nanošenje tečnog samoemulgujućeg sistema na površinu pelete kao i upotrebu sredstva protiv lepljenja (Lei i sar., 2011).

Literatura

- [1] 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.
- [2] Cannon JB, 2005. Oral solid dosage forms of lipid-based drug delivery systems. *Am. Pharm. Rev.* 8, 108–115.
- [3] CFR, 2011. 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, 21CFR184.1400, p. 3.
- [4] Do Thi T, Speybroeck MV, Barillaro V, Martens J, Annaert P, Augustijns P, Humbeeck JV, Vermant J, Mooter GV, 2009. Formulate-ability of ten compounds with different physicochemical profiles in SMEDDS. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 479–548.
- [5] El-Zein H, Riad L, Abd El-Bary A, 1998. Enhancement of carbamazepine dissolution: in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 168, 209–220.
- [6] Gavini E., Hegge AB, Rassu G, Sanna V, Testa C, Pirisino G, Karlsen J, Giunchedi P., 2006. Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: in vitro/in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 307, 9–15.
- [7] 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.
- [8] Kobayashi, Y., Ito, S., Itai, S., Yamamoto, K., 2000. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int. J. Pharm.* 193, 137–146.
- [9] Lei Y., Lu Y., Qi J., Nie S., Hu F., Pan W., Wu W., 2011. Solid self-nanoemulsifying cyclosporin A pellets prepared by fluid-bed coating: preparation, characterization and in vitro redispersibility. *Int J Nanomedicine*. 6: 795–805.
- [10] Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB, 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.
- [11] Losic D, Mitchell JG, Voelcker NH, 2009. Diatomaceous lessons in nanotechnology and advanced materials. *Adv. Mater.* 21, 2947–2958.
- [12] Losic D, Yu Y, Sin Aw M, Simovic S, Thierry B, Addai-Mensah J, 2010. Surface functionalization of diatoms with dopamine modified iron oxide nanoparticles: toward magnetically guided drug microcarriers with biologically derived morphologies. *Chem. Commun.* 46, 6323–6325.
- [13] Pather SI, Gupte SV, Khankari K, Hontz J, Robinson JR, Eichman JD, Kumbale R, 2001. Microemulsions as solid dosage forms for oral administration. US Patent 6,280,770 B1.
- [14] 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.
- [15] 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.

- [16] 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.
- [17] 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. *Molecular pharmaceutics*. 9, 2750–2760.
- [18] Vanderscher J, Meinzer A, 1994. Rationale for the development of Sandimmune Neoral. *Transplant. Proc.* 26, 2925–2927.
- [19] 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.
- [20] 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.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

[1] Milović M, Djuriš J, Djekić LJ, Vasiljević D, Ibrić S. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int. J. Pharm.* 436:58-65, 2012.

[2] Milović M, Simović S, Lošić D, Dashevskiy A, Ibrić S. Solid self-emulsifying phospholipid suspension (SSEPS) with diatom as a drug carrier. *Eur. J.Pharm. Sci.* 63: 226-232, 2014.

Saopštenja na konferencijama

[1] Milović M, Simović S, Lošić D, Dashevskiy A, Ibrić S. Diatomite as carrier for solid self-amulsifying phospholipid suspension (SSEPS). 8th world meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 19-22 March 2012. Istanbul, Turkey.

[2] Milović M, Đurić Z, Ibrić S. Dinamička in vitro lipoliza čvrstih samomikroemulgujućih sistema za peroralnu primenu. VI Kongres farmaceuta Srbije. 15-19 oktobar, 2014. Beograd, Srbija.

E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

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 fotonom korelacionom spektroskopijom kod sistema sa $95\% vode (m/m)$, pri čemu je veličina prečnika kapi odgovarala veličini za mikroemulzije. Rastvorljivost CBZ u polisorbatu 80 je 328 puta veći nego u $0,1 M HCl$ kao i 14,52 puta veći nego u trigliceridi srednje dužine lanca. Tečna SMEDDS formulacija, SC/O 8/2 i K_m 1:1, pokazuje rastvorljivost za karbamazepin od $33771 \pm 41,05 \mu g/ml$ koji je 276 puta veći nego u $0,1 M HCl$, ukazujući da formulisana SMEDDS poseduje značajno veću rastvorljivost za karbamazepin u odnosu na $0,1 M HCl$. Određivanje tipa proticanja i vrednosti dinamičkog viskoziteta voda/polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca pseudoternernih sistema bez i sa karbamazepina, pri različitim udelima vode, su pokazali da karbamazepin ima značajan uticaj na reološko ponašanje sistema. Sistemi sa 10% i 20% vode (m/m) su pokazali Njutnovski tip proticanja, koji je tipičan za mikroemulzione sisteme, pri čemu su sistemi sa karbamazepinom pokazali veću vrednost viskoziteta ukazujući da karbamazepin utiče na interakciju među kapima unutrašnje faze i posledično veće vrednosti dinamičkog viskoziteta. Sistemi sa 30% i 40% vode (m/m) su pokazali tiksotropno ponašanje (gelska faza). Pseudoternerni sistemi bez i sa karbamazepinom sa 50% vode (m/m) su pokazali Ostvaldovo ponašanje ukazujući da su kapi unutrašnje faze nepravilnog oblika, zbog narušavanja strukture slične gelu, i da se pri povećanju brzine smicanja kapi postavljaju u odgovarajući položaj kako bi napon smicanja bio najmanji. Pseudoternerni sistem bez karbamazepina sa 60% vode (m/m) pokazuje Njutnovski tip proticanja ukazujući da je se formirala U/V mikroemulzija dok odgovarajući sistem sa CBZ pokazuje Bingamov tip proticanja. Fotonska korelaciona spektroskopija voda/polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca pseudoternernog sistema sa i bez karbamazepina pokazuje da karbamazepin utiče na veličinu prečnika kapi (Z-Ave) i vrednost indeksa polidisperznosti (PdI) dovodeći do formiranja većih kapi sa širom distribucijom veličine, ukazujući da karbamazepin kao molekul sa malom hidrofilnom glavom i relativno velikim hidrofobnim repom uzrokuje intenzivniju interakciju među kapima. Na osnovu kapaciteta adsorpcije formulisano je 5 različitih SSMEDDS sistema sa 4 različita adsorbensa: dva na bazi magnezijum-aluminometasilikata (Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2) i dva na bazi silicijum-dioksida (Sylsia[®] 320 i Sylsia[®] 350), pri čemu je za polisorbat 80 (S)/PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje (C)/ trigliceridi srednje dužine lanca SMEDDS sistem Neusilin[®] UFL2 pokazao najveći kapacitet adsorpcije. Nakon adsorpcije, DSC i FT-IR analize su pokazale da nije došlo do rekristalizacije karbamazepina, odsustvovanjem karakterističnog pika topljenja kao i pikova karakterističnih vibracija, dobijenih analizom čistog karbamazepina. Takođe, u fizičkim smešama nije pokazan pik topljenja, ali je prisutna deformacija na 1605 i $1593 cm^{-1}$ ($-C=O$ vibracija i $-NH$ deformacija), koja ukazuje na formiranje vodonične veze između karbamazepina i adsorbensa, što je razlog stvaranja amorfnog oblika karbamazepina. Intenzitet deformacije kod fizičke smeše sa Neusilin[®] FL2 je manjeg intenziteta u odnosu na

fizičke smeše karbamazepina i ostalih adsorbensa. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz SSMEDDS formulacija je pokazalo znatno brže rastvaranje karbamazepina kod svih formulacija u odnosu na čistu supstancu. Najbrže rastvaranje su pokazale SSMEDDS formulacije sa Sylysia[®] 320 i Sylysia[®] 350 adsorbensima, dok su SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 pokazale sporije rastvaranje sa nižim stepenom oslobađanja. Brzina rastvaranja karbamazepina iz SMEDDS formulacija, kod adsorbensa 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. Fizičke smeše su pokazale brzo oslobađanje CBZ usled prisustva amorfnog oblika karbamazepina. Najsporije oslobađanje je pokazala fizička smeša sa Neusilin[®] FL2 adsorbensom usled najmanjeg intenziteta interakcije sa površinom adsorbensa.

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 100 puta razblaženja sa vodom formira kapi najmanjeg prečnika i distribucije veličine kapi. Veličina prečnika kapi odgovara vrednostima za emulziju. 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 % karbamazepina, posedovala je čestice čiji je Martinov dijametar oko 7,66 μm . Supernatant ove suspenzije pokazuje blago više vrednosti veličine prečnika kapi i indeksa polidisperznosti u odnosu na sistem bez karbamazepina, ukazujući da karbamazepin utiče na fluidnost međupovršinskog filma formiranih kapi unutrašnje faze emulzije i da povećava interakciju između njih. Adsorpcijom SEPS na dijamitne mikrokapsule direktnim adsorbovanjem (SSEPS₁) 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 dijamitne mikrokapsule (SSEPS₂), gde je SEPS formulacija većim delom prisutna unutar pora adsorbensa (odnos SEPS/dijamitne mikrokapsule 1:1). Ovo je potvrđeno SEM analizom. Prilikom direktne adsorpcije ne dolazi do promene polimorfnog oblika CBZ, što je potvrđeno DSC i XRD analizom. Odsustvo karakterističnog pika topljenja karbamazepina u obe SSEPS je usled rastvaranja karbamazepina 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 dijamitne mikrokapsule dolazi do promene polimorfnog oblika karbamazepina iz P-monoklinskog (forma III) u trigonalni oblik (forma I) koji prema Evropskoj farmakopeji nije farmaceutski prihvatljiv polimorfni oblik. U fizičkoj smeši CBZ i dijamitnih mikrokapsula pokazano je prisustvo prvobitne kristalčnosti karbamazepina (forma III), ali u manjem intenzitetu u odnosu na intenzitet odgovarajuće količine čiste supstance, dok je u čvrstoj disperziji karbamazepina i dijamitnih mikrokapsula dobijenoj uparavanjem etanolnog rastvora, pod uslovima istim kao pri dobijanju SSEPS₂, prisutan amorfn oblik karbamazepina. *In vitro* brzina rastvaranja karbamazepina SSEPS formulacija u fosfatnom puferu pH = 6,8 je pokazala da formulacija dobijena uparavanjem etanolnog rastvora pokazuje brže rastvaranje u odnosu na SSEPS formulaciju dobijenu direktnim adsorbovanjem, dok obe pokazuju znatno brže rastvaranje u odnosu na čist karbamazepin. Brže rastvaranje karbamazepina iz SSEPS₂ u odnosu na SSEPS₁ je usled lokalizacije adsorbovane SEPS unutar pora, čime se ograničava kontakt karbamazepina sa površinom adsorbensa i izbegavaju interakcije koje otežavaju desorpciju i oslobađanje aktivne komponente. Takođe, u SSEPS₂ karbamazepin je prisutan u formi I koja

poseduje veću rastvorljivost u odnosu na formu III. Fizička smeša i čvrsta disperzija karbamazepina i diatomitnih mikrokapsula pokazuju sličnu brzinu rastvaranja karbamazepina, koja je značajno veća u odnosu na čistu supstancu. Nakon ubrzanih studija stabilnosti SSEPS₁, SSEPS₂ 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 karbamazepina, 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 diatomitnim mikrokapsulama kao čvrstim nosačem, u stanju da održi prvobitni polimorfni oblik karbamazepina. Kod čvrste disperzije primećen je porast kristaličnosti, jer same diatomitne mikrokapsule nisu u stanju da održe prvobitni amorfni oblik aktivne supstance. Ipak, poređenjem profila *in vitro* brzine rastvaranja model nezavisnim pristupom, formulacije pre i posle studija stabilnosti nisu pokazale značajnu razliku u brzini rastvaranja.

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 % karbamazepina, u komori sa fluidizirajućim protokom vazduha pri sledećim uslovima: radna temperatura 60–65 °C; izlazna temperatura 40 °C; protok vazduha 60–70 m³/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 karbamazepin ($m_{\text{HPMC}}/m_{\text{CBZ}} \times 100$) odnosno 0,25 % m/v, dok optimizovana količina Aerosil[®] - a 200, kao sredstva protiv lepljenja, iznosi 16 % u odnosu na karbamazepin ($m_{\text{aerosil}}/m_{\text{CBZ}} \times 100$), odnosno 1 % m/v. Samoemulgujuće pelete, nakon 100 puta razblaženja lipidnih komponenti sa vodom, pokazuju vrednosti veličine prečnika kapi koje odgovaraju emulzijama, pri čemu karbamazepin utiče na fluidnost međupovršinskog filma povećavajući intenzitet interakcija što dovodi do viših vrednosti za veličinu kapi kao i do šire distribucije veličine kapi u poređenju sa vrednostima dobijenim za samoemulgujuće pelete bez CBZ. Nakon adsorbovanja SEPS sistema na šećerne pelete pokazano je XRD analizom da je karbamazepin prisutan u P – monokliničkom obliku (forma III), što predstavlja veliku prednost ove metode jer je ova forma prema Evropskoj farmakopeji jedina prihvatljiva za farmaceutsku upotrebu. *In vitro* brzina rastvaranja samoemulgujućih peleta je pokazala znatno brže rastvaranje karbamazepina u 0,1 M HCl, u odnosu na čistu supstancu. Brže rastvaranje CBZ je usled prisustva SEPS sistema, bogatog surfaktantima, kao i velike površine lako rastvorljivih šećernih peleta. Dinamički *in vitro* model lipolize SSMEDDS formulacija je pokazao da stepen lipolize zavisi od vrste adsorbensa, pri čemu SSMEDDS formulacije sa Sylysia[®] 320 i Sylysia[®] 350 adsorbensima (silicijum-dioksid) pokazuju znatno veći stepen lipolize, nakon 30 min 100% lipoliza, u odnosu na SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®] UFL2 i Neusilin[®] FL2 adsorbensima (magnezijum-aluminometasilikat), gde je stepen lipolize od 50 – 80 % za 30 min. Pokazano je da je koeficijent korelacije između rastvorenog karbamazepina (%) iz *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja i stepena lipolize (%) iz *in vitro* dinamičke lipolize značajan ($R > 0,9$), izuzev kod SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®] UFL2/SMEDDS odnosom 1:1 gde je $R \approx 0,85$. Pokazano je da stepen lipolize kod adsorbensa 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. U toku dinamičkog *in vitro* modela lipolize ispitivanih SSMEDDS, formulacija karbamazepina se vrlo brzo raspodeli između vodene faze i faze pelete (već u

prvih 5 min), pri čemu SSMEDDS formulacije sa Sylysia[®] 320 i Sylysia[®] 350 adsorbensima pokazuju veći udeo karbamazepina u fazi pelete u odnosu na SSMEDDS formulacije sa Neusilin[®]UFL2 i Neusilin[®]FL2 adsorbensima. U toku lipolize sve formulacije pokazuju pad koncentracije karbamazepina od 1 – 7 % u vodenoj fazi i posledični rast u fazi pelete ukazujući da formulacije generalno mogu da održe karbamazepin u solubilizovanom obliku. Kod adsorbenasa na bazi magnezijum-aluminometasilikata, količina karbamazepina u fazi pelete zavisi pre svega od SMEDDS/adsorbens odnosa, a ne od specifične površine, pri čemu što je odnos veći manji je sadržaj karbamazepina u fazi pelete i posledično veći u vodenoj fazi.

Uvidom u rezultate završene disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste kategorije M21 (*International Journal of Pharmaceutics* i *European Journal of Pharmaceutical Sciences*). Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve u doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Razvoj, izrada i karakterizacija čvrstih samodispergujućih formulacija za oralnu primenu**“, te predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati Izveštaj i omogući kandidatu dipl. farm. Mladenu Miloviću da odbrani doktorsku disertaciju.

Beograd, 11.12. 2014. god

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Zorica Đurić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ljiljana Đekić, docent,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Dragana Vasiljević, docent,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

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