

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Bojan R. Čalija

**FUNKCIONALNOST HITOZANA U FORMULACIJI
ALGINAT-HITZAN MIKROČESTICA KAO
NOSAČA ZA NESTEROIDNE
ANTIINFLAMATORNE LEKOVE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Bojan R. Čalija

**FUNKCIONALNOST HITOZANA U FORMULACIJI
ALGINAT-HITZAN MIKROČESTICA KAO
NOSAČA ZA NESTEROIDNE
ANTIINFLAMATORNE LEKOVE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Bojan R. Čalija

**FUNCTIONALITY OF CHITOSANS IN
FORMULATION OF ALGINATE-CHITOSAN
MICROPARTICLES AS DRUG CARRIERS FOR
NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS**

PhD Thesis

Belgrade, 2013

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta, a deo istraživanja izveden je u laboratoriji Razvoja i kontrole kvaliteta DCP Hemigal u Leskovcu.

MENTOR

Dr Jela Milić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr Snežana Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Viktor Nedović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

3. _____
Dr Nebojša Cekić, docent,
Univerzitet u Nišu-Tehnološki fakultet

4. _____
Dr Danina Krajišnik, docent,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Datum odbrane _____

Veliku zahvalnost na ukazanom povjerenju, posvećenosti i podršci tokom svih faza izrade disertacije dugujem mentoru prof. dr Jeli Milić.

Najiskrenije se zahvaljujem doc. dr Nebojši Cekiću, čiji su iskustvo u eksperimentalnom radu i veliko angažovanje bili od neprocjenjivog značaja za izradu ove disertacije.

Prof. dr Snežani Savić dugujem veliku zahvalnost na savjetima i sugestijama koji su nesumnjivo doprinijeli kvalitetu objavljenih publikacija i same disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Viktoru Nedoviću na korisnim sugestijama i iskrenoj saradnji tokom izrade disertacije.

Doc. dr Danini Krajišnik se zahvaljujem na angažovanju u izvođenju reoloških mjerenja i sugestijama tokom pisanja disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Rolfu Danielsu i Klausu Weyhingu sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Tübingenu, kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju, Katedre za analitiku lekova i Katedre za fiziologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za pomoć u realizaciji dela eksperimentalnog rada i sugestijama koje su bile od velike pomoći u tumačenju dobijenih rezultata.

Iskreno se zahvaljujem svojim kolegicama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na podršci i kolegijalnom razumijevanju. Posebnu zahvalnost dugujem kolegicama doc. dr Jeleni Đuriš za podršku i pomoć tokom izrade doktorske disertacije i farm. teh. Biljani Glogovac za pomoć u rješavanju tehničkih poteškoća sa kojima sam se suočavao tokom eksperimentalnog rada.

Najveću zahvalnost dugujem porodici, a naročito roditeljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tokom školovanja.

FUNKCIONALNOST HITOZANA U FORMULACIJI ALGINAT-HITIZAN MIKROČESTICA KAO NOSAČA ZA NESTEROIDNE ANTIINFLAMATORNE LEKOVE

REZIME

Prednosti mikročestica u odnosu na konvencionalne nosače lekovitih supstanci ogledaju se u sferičnom obliku, velikom odnosu površine i volumena, mikrometarskim dimenzijama, raznovrsnosti materijala za njihovu izradu i postupaka mikroinkapsulacije. Poseban značaj imaju mikročestice izrađene od prirodnih, biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera, poput alginata, koji formiraju gelove u prisustvu Ca^{2+} jona. Međutim, poroznost Ca-alginatnih hidrogel mikročestica i osetljivost na prisustvo sekvestrirajućih jona može uzrokovati brzo otpuštanje inkapsulirane lekovite supstance. Ove nedostatke je moguće prevazići tretiranjem Ca-alginatnih gelova sa katjonskim polimerima, poput hitozana, koji sa alginatima obrazuju pH osetljive polielektrolitne komplekse.

U predstavljenom radu izvršena je fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija Ca-alginatnih mikročestica izrađenih metodom eksternog geliranja i tretiranih hitozanima različitih molekulskih masa, u cilju poboljšanja karakteristika konvencionalnih Ca-alginatnih mikročestica. Posebna pažnja usmerena je ka ispitivanju uticaja molekulske mase hitozana na njihovu funkcionalnost u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove.

U prvoj fazi korišćeni su hitozani velike molekulske mase (50 – 375 kDa). Rezultati karakterizacije mikročestica podvrgnuti su analizi primenom eksperimentalnog dizajna, kako bi se došlo do zaključaka o uticaju molekulske mase hitozana i drugih formulacionih faktora na karakteristike mikročestica, kao i njihovih međusobnih interakcija. Primenom hitozana velikih molekulskih masa izrađene su mikročestice blago deformisanog sferičnog oblika, mikrometarskih dimenzija, sa relativno visokom efikasnošću inkapsulacije (> 75 %) i profilima oslobađanja koji se odlikuju zanemarljivim oslobađanjem naproksena u kiseloj sredini. Međutim, rezultati

ove faze su otkrili da primenu hitozana velike molekulske mase otežavaju izražen viskozitet njihovih vodenih rastvora i dužina lanaca koji ograničavaju njihovo vezivanje na površinu Ca-alginatne mikročestica.

U drugoj fazi Ca-alginatne mikročestice su inkubirane u neviskozim rastvorima oligohitozana molekulske mase 2 – 3 kDa. Mikroskopska analiza je potvrdila sposobnost ovog oligomera da zahvaljujući malim dimenzijama prodire u jezgro mikročestica, a ninhidrinskom reakcijom je pokazano da se oligohitozan vezuje za alginat znatno intenzivnije u odnosu na hitozane velike molekulske mase. Izrađene mikročestice su imale blago deformisan sferičan oblik, mikrometarske dimenzije, a postignute su visoke efikasnosti inkapsulacije (> 78 %). Potvrđena je pH osetljivost kompleksa alginat-oligohitozan, koja omogućava usporeno oslobađanje inkapsuliranog naproksena u slabo baznoj sredini. Pokazano je da primena oligohitozana omogućava pojednostavljenje i skraćenje postupka inkapsulacije bez značajnijeg uticaja na njihove fizičko-hemijske i farmaceutsko-tehnološke karakteristike.

U trećoj fazi rada potvrđena je mogućnost istovremene interakcije oligohitozana sa dva anjonska polimera: alginatom i Eudragit[®]-om L 100-55. Tretiranje alginat-oligohitozan mikročestica Eudragit[®]-om L 100-55 nije značajnije uticalo na morfološke karakteristike, efikasnost inkapsulacije i sadržaj naproksena u mikročesticama, a pokazalo se da polielektrolitni kompleks oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 pruža efikasnu zaštitu mikročesticama u kiseloj sredini, što je od ključnog značaja za postizanje usporenog oslobađanja naproksena nakon izmene medijuma praćene porastom pH vrednosti.

Ključne reči: hitozan, oligosaharidni hitozan, natrijum-alginat, polielektrolitni kompleks, mikročestice, naproksen, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, produženo oslobađanje, pH osetljivost, ekperimentalni dizajn

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.015.4 : 615.276 (043.3)

615.011 : 658.512.2,7.05 (043.3)

FUNCTIONALITY OF CHITOSANS IN FORMULATION OF ALGINATE-CHITOSAN MICROPARTICLES AS DRUG CARRIERS FOR NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS

ABSTRACT

In comparison with conventional drug delivery systems microparticles offer several advantages such as: micrometric dimensions, spherical shape and great surface to volume ratio. Furthermore, numerous materials and different encapsulation techniques can be used to obtain microparticles with desired characteristics. There is growing interest for microparticles consisted of natural, biodegradable and biocompatible polymers such as alginates, which can form gels in presence of Ca^{2+} ions. However, Ca-alginate hydrogels are porous and sensitive on presence of sequestering agents, which can cause fast release of encapsulated drug. In order to overcome these limitations Ca-alginate microparticles can be treated with cationic polymers such as chitosan.

In the presented work alginate-chitosan microparticles were prepared by ionotropic gelation followed by polyelectrolyte complexation and subjected to detail physicochemical, biopharmaceutical and pharmaceutical characterization with the aim to investigate the ability of chitosan to improve characteristics of conventional Ca-alginate microparticles. The special interest was to assess the influence of chitosan molecular weight on chitosan functionality in formulation of alginate-chitosan microparticles as drug delivery systems for NSAILs.

In the first phase Ca-alginate microparticles were treated with high molecular weight chitosans (50 – 375 kDa). Experimental design analysis was used to investigate the effect of chitosan molecular weight, other formulation factors and their interactions on microparticles properties. Obtained particles exhibited micrometric size, slightly deformed spherical shape and relatively high encapsulation efficiencies (> 75 %). Release of encapsulated naproxen in simulated gastric fluid was negligible. However, the obtained results revealed some disadvantages of high molecular weight chitosans, such as: high viscosity of their water solutions and their limited ability to form polyelectrolyte complex (PEC) with alginate only on particles surface.

In the second phase Ca-alginate microparticles were incubated in nonviscous chitosan oligosaccharide (COS, 2 – 3 kDa) water solutions. SEM analysis confirmed that COS has ability to diffuse in microparticles core due to its short chain length, while the ninhydrin assay revealed that binding of this oligomer for Ca-alginate matrix was more intensive than that of high molecular weight chitosans. Obtained particles exhibited micrometric size, slightly deformed spherical shape and relatively high encapsulation efficiencies (> 78 %). Swelling and drug release studies confirmed pH-sensitivity of alginate-COS PEC, which allowed sustained drug release in simulated intestinal fluid. It was shown that use of COS allows simplification of microencapsulation procedure with no significant effect on microparticles properties.

In the third phase the ability of COS to interact simultaneously with two polyanions: alginate and Eudragit[®] L 100-55 was investigated and confirmed. Additional treatment of alginate-COS particles with Eudragit[®] L 100-55 had no significant effect on morphology, encapsulation efficiencies and drug loading capacity of alginate-COS particles. However, it was shown that COS-Eudragit[®] L 100-55 PEC provides effective protection of particles against protonation under acidic conditions. This was crucial to achieve sustained release of encapsulated drug in simulated intestinal fluid after previous incubation in simulated gastric fluid.

Key words: chitosan, chitosan oligosaccharide, sodium alginate, polyelectrolyte complex, microparticles, naproxen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, sustained release, pH sensitivity, experimental design

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.015.4 : 615.276 (043.3)

615.011 : 658.512.2,7.05 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. MIKROČESTICE.....	4
2.1.1. Definicija i podela.....	4
2.1.2. Istorijski razvoj mikroinkapsulacije.....	5
2.1.3. Razlozi za inkapsulaciju.....	6
2.1.4. Metode inkapsulacije	9
2.1.4.1. Hemijske metode inkapsulacije	10
2.1.4.2. Fizičke metode inkapsulacije.....	13
2.1.4.3. Kriterijumi za izbor metode inkapsulacije.....	15
2.2. ALGINATI	17
2.2.1. Hemijska struktura alginata	17
2.2.2. Osobine alginata.....	18
2.2.3. Dobijanje alginata	20
2.2.4. Biomedicinska primena alginata.....	21
2.3. Ca-ALGINATNE MIKROČESTICE	23
2.3.1. Osobine Ca-alginatnih mikročestica	23
2.3.2. Dobijanje Ca-alginatnih mikročestica.....	25
2.3.2.1. Ekstruzija/eksterno geliranje.....	26
2.3.2.2. Emulgovanje/interno geliranje.....	28
2.4. HITIZANI	30
2.4.1. Hemijska struktura hitozana	30
2.4.2. Osobine hitozana.....	31
2.4.2.1. Fizičko-hemijske osobine hitozana	31
2.4.2.2. Biološka svojstva hitozana.....	33
2.4.3. Dobijanje hitozana	34
2.4.4. Biomedicinska primena hitozana	36
2.5. ALGINAT-HITIZAN MIKROČESTICE	38
2.5.1. Osobine polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan	38
2.5.2. Dobijanje alginat-hitozan mikročestica	42

2.6. EUDRAGIT® L 100-55	43
2.6.1. Polielektrolitni kompleks hitozan-Eudragit® L 100-55	43
2.7. NAPROKSEN	44
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	47
4. EKSPERIMENTALNI DEO	50
4.1. MATERIJALI.....	50
4.2. METODE.....	52
4.2.1. Izrada mikročestica	52
4.2.1.1. <i>Air jet</i> uređaj sa koaksijalnim cilindrom.....	53
4.2.1.2. Izrada alginat-hitozan mikročestica jednostepenim postupkom	54
4.2.1.3. Izrada alginat-hitozan mikročestica dvostepenim postupkom.....	55
4.2.1.4. Izrada alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica trostepenim postupkom.....	56
4.2.2. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u prvoj fazi eksperimentalnog rada	58
4.2.3. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u drugoj fazi eksperimentalnog rada	58
4.2.4. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u trećoj fazi eksperimentalnog rada	58
4.2.5. Reološka ispitivanja	63
4.2.6. Merenje veličine mikročestica	63
4.2.7. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica	63
4.2.8. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza (TGA/DSC).....	64
4.2.9. Infracrvena spektroskopska analiza (FT-IR).....	64
4.2.10. Određivanje sadržaja model lekovite supstance	64
4.2.11. Određivanje efikasnosti inkapsulacije	65
4.2.12. Određivanje sadržaja hitozana	66
4.2.13. Ispitivanje sposobnosti bubrenja.....	68
4.2.14. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica	68
4.2.15. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance	69
4.2.16. Primena eksperimentalnog dizajna u proceni uticaja formulacionih/procesnih parametara na karakteristike alginat-hitozan mikročestica.....	72

5. REZULTATI I DISKUSIJA	75
5.1. REZULTATI PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	75
5.1.1. Reološka ispitivanja disperzije model lekovite supstance u rastvoru natrijum-alginata.....	75
5.1.2. Merenje veličine mikročestica	75
5.1.3. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica	76
5.1.4. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza	80
5.1.5. Infracrvena spektroskopska analiza	85
5.1.6. Određivanje sadržaja model lekovite supstance	88
5.1.7. Određivanje efikasnosti inkapsulacije	89
5.1.8. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica	92
5.1.9. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica.....	99
5.2. REZULTATI DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA.....	101
5.2.1. Reološka ispitivanja rastvora hitozana različitih molekulskih masa	101
5.2.2. Merenje veličine mikročestica	102
5.2.3. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica	103
5.2.4. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza ..	113
5.2.5. Infracrvena spektroskopska analiza	118
5.2.6. Određivanje sadržaja model lekovite supstance	121
5.2.7. Određivanje efikasnosti inkapsulacije	122
5.2.8. Određivanje sadržaja hitozana	123
5.2.9. Ispitivanje sposobnosti bubrenja.....	129
5.2.10. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica	142
5.2.11. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica.....	151
5.3. REZULTATI TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA.....	156
5.3.1. Merenje veličine mikročestica	156
5.3.2. Ispitivanje morfologije i površinskih karakteristika mikročestica	157
5.3.3. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza ..	159
5.3.4. Infracrvena spektroskopska analiza	161
5.3.5. Određivanje sadržaja model lekovite supstance	164

5.3.6. Određivanje efikasnosti inkapsulacije	165
5.3.7. Ispitivanje sposobnosti bubrenja	166
5.3.8. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica	169
6. ZAKLJUČAK	173
7. LITERATURA.....	182
8. Prilozi	195
8.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije.....	195
8.2. Biografija autora	198

1. UVOD

Otkriće novih hemijskih entiteta koji ispoljavaju farmakološko dejstvo je samo prvi korak u složenom procesu razvoja novih lekova. Da bi se postigla optimalna farmakološka aktivnost lekovite supstance, neophodno je obezbediti njenu efikasnu isporuku do mesta delovanja odgovarajućom brzinom, što je moguće postići inkorporiranjem lekovite supstance u adekvatne nosače, odnosno sisteme za isporuku lekova (eng. *drug delivery systems*) (Xiaoling i Jasti, 2006). Iako se konvencionalni farmaceutski oblici, poput tableta i kapsula, koriste u terapiji različitih obolenja sa manje ili više uspeha decenijama unazad, razvoj novih proizvodnih tehnologija i metoda za karakterizaciju doveo je do pojave novih, sofisticiranih nosača lekova nano- i mikrometarskih veličina.

Značaj ovakvih nosača ne ogleda se samo u mogućnosti njihove primene za isporuku nosintetisanih lekovitih supstanci, nego i onih koje se godinama primenjuju inkorporirane u konvencionalne nosače. Usklađivanjem sastava, kao i odgovarajućeg načina/uslova proizvodnje ovih nosača sa fizičko-hemijskim, farmakodinamičkim i farmakokinetičkim osobinama lekovite supstance moguće je modifikovati mesto i/ili vreme oslobađanja lekovite supstance, sa ciljem da se postigne optimalan terapijski efekat i poboljša komplijansa uz istovremeno smanjenje neželjenih efekata.

Mikročestice, kao čvrsti nosači lekova, poslednje dve decenije privlače interesovanje brojnih istraživača i postale su jedan od najznačajnijih sistema za kontrolisano oslobađanje lekova zahvaljujući mikrometarskim dimenzijama, manje ili više pravilnom sferičnom obliku i velikom odnosu površine i volumena (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007). Posebna pažnja prilikom izbora materijala za izradu mikročestica poklanja se prirodnim, netoksičnim i biodegradabilnim polimernim materijalima kao što su albumini, želatin, hitozani, derivati skroba, dekstrani, lipidi i alginati (Kumar, 2000; Milić i Petrović, 2003; Tran i sar., 2011).

Izrada mikročestica na bazi alginata zasnovana je na njihovom svojstvu da u vodenim rastvorima u prisustvu dvo- i trovalentnih katjona (izuzev Mg^{2+} jona) obrazuju hidrogelove. Naročito je ispitana mogućnost primene Ca^{2+} jona za dobijanje ovakvih

gelova s obzirom na njihovu netoksičnost i znatno pravilniji, sferičan oblik Ca-alginatnih mikročestica u odnosu na mikročestice izrađene primenom drugih gelirajućih jona (Gonzalez-Rodriguez i sar., 2002). Ovaj fenomen je označen kao jonotropno geliranje (eng. *ionotropic gelation*), a postoji nekoliko tehnika za postizanje sferičnog oblika i mikrometarskih dimenzija nastalih alginatnih gelova (Prüsse i sar., 2008; Tran i sar., 2011).

Izrazita poroznost i sposobnost bubrenja Ca-alginatnih gelova nakon *per os* primene mogu imati za posledicu naglo oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance pre nego što dospe u donje delove gastrointestinalnog trakta (GIT). U cilju smanjenja prevremenog oslobađanja leka i poboljšanja stabilnosti, Ca-alginatne mikročestice se mogu ojačati polikatjonskim polimerima poput hitozana, netoksičnog biodegradabilnog polimera koji ima sposobnost formiranja polielektrolitnog kompleksa sa alginatima (Murata i sar., 1993; Polk i sar., 1994; Huguet i Dellacherie, 1996). Prema literaturnim podacima, kompleks između alginata i hitozana egzistira u formi gela pri nižim pH vrednostima, dok u neutralnoj i slabo baznoj sredini počinje da bubri i erodira, oslobađajući inkapsulirani lek (Tonessen i Karlsen, 2002; Simsek-Ege i sar., 2003). Takvu pH osetljivost polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan je moguće iskoristiti za postizanje odloženog oslobađanja lekovite supstance nakon *per os* primene. Faktori koji ograničavaju ovakvu primenu hitozana su njegova slaba rastvorljivost u vodi i izražen viskozitet njegovih vodenih rastvora. Izražen viskozitet rastvora hitozana i dužina lanaca ovog polimera imaju za posledicu otežani prodor hitozana u unutrašnjost mikročestica, što njegovo vezivanje za mikročestice dominantno ograničava na površinu mikročestica (Polk i sar., 1994). Dosadašnja istraživanja su ukazala da je ovaj fenomen manje izražen nakon primene hitozana male (50 – 190 kDa) u odnosu na hitozane velike molekulske mase (310 – 375 kDa). Upravo zbog navedenih nedostataka nisko- i visokomolekularnih hitozana, sve veća pažnja istraživača usmerena je ka ispitivanju potencijala oligosaharidnih hitozana male molekulske mase (svega nekoliko kDa). Ovi oligomeri se dobijaju hidrolizom dugih lanaca hitozana, a lako se rastvaraju u vodi pri neutralnoj pH vrednosti obrazujući rastvore niskog viskoziteta (Jeon i sar., 2000). Pomenute prednosti oligosaharidnih hitozana još uvek nisu šire ispitane za izradu hitozan-alginatnih mikročestica, a naročito u pogledu njihovog uticaja na pH zavisno oslobađanje inkapsuliranih lekovitih supstanci.

Često kontradiktorne literaturne podatke u pogledu uticaja molekulske mase, koncentracije hitozana u rastvoru za oblaganje i viskoziteta tih rastvora na fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska svojstva Ca-alginatnih mikročestica, moguće je objasniti pojedinačnim sagledavanjem pomenutih faktora i zanemarivanjem njihovih potencijalnih interakcija, ali i potencijalnim uticajem inkapsuliranih lekovitih supstanci na stepen i brzinu kojom se formira polielektrolitni kompleks alginat-hitozan. Otuda proizilazi potreba da se istovremenim sagledavanjem uticaja svih pomenutih faktora, primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, prouče i njihove eventualne interakcije, što je predmet istraživanja prvog dela ovog rada.

U drugom delu rada prikazano je ispitivanje mogućnosti modifikovanja Ca-alginatnih mikročestica primenom oligosaharidnog hitozana uz istovremenu procenu mogućnosti primene ovako modifikovanih Ca-alginatnih mikročestica kao nosača za *per os* primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova koristeći naproksen kao model lekovitu supstancu.

U trećem delu rada detaljno je ispitana mogućnost istovremene interakcije oligosaharidnog hitozana sa dva anjonska polimera: alginatom i Eudragit[®]-om L 100-55, a sa ciljem da se alginat-oligohitozan mikročestice stabilizuju u kiseloj sredini dodatnim polielektrolitnim kompleksom oligohitozan-Eudragit[®]-L 100-55.

2. OPŠTI DEO

2.1. MIKROČESTICE

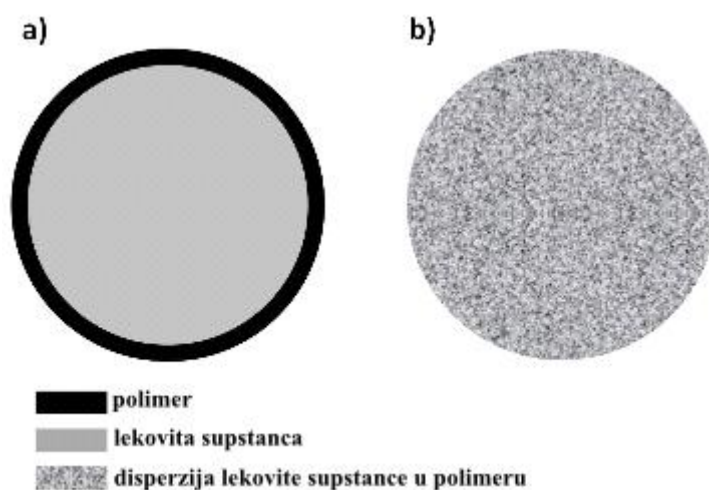
2.1.1. Definicija i podela

Iako ne postoji jedinstvena definicija opšteprihvaćeno je da su mikročestice čvrste čestice, sferičnog ili približno sferičnog oblika, čiji se dijametar kreće u opsegu između 1 i 1000 μm (Xiaoling i Jasti, 2006; Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007). Iz definicije se nameće zaključak da se mikročestice čiji se dijametri primiču donjoj granici ovog intervala mogu posmatrati kao koloidni sistemi (Burges i Hickey, 2007). Najčešće se izrađuju od prirodnih polimera, voskova, ali i drugih zaštitnih materijala, poput biodegradabilnih sintetskih polimera i modifikovanih prirodnih proizvoda (skrobovi, gume, proteini, masti i voskovi). Među sintetskim polimerima najčešće se upotrebljavaju polilaktid (PLA), poliglikolid (PGL), polilaktid-poliglikolid (PLGA), etilceluloza (EC), polialkilcijanoakrilat (PACA), polimetakrilat (PMMA), polistiren i drugi (Milić i Petrović, 2003; Vilos i Velasquez, 2012). U literaturi se umesto termina mikročestice često koriste termini mikrokapsule, mikrosfere i mikromatriksi. Svi pomenuti termini se odnose na sisteme koji se uklapaju u definiciju mikročestica, a njihovom upotrebom se preciznije definišu njihova svojstva. Zajednički su im sferičan, ili blago deformisan sferičan oblik, i mikrometarske dimenzije, a razlikuju se prema načinu na koji je aktivni sastojak (lekovita supstanca) raspoređena u njima. Ovo je ujedno i osnovni kriterijum koji se koristi za klasifikaciju mikročestica na ***mikrokapsule*** i ***mikrosfere (mikromatrikse)***.

Mikrokapsule (slika 2.1a) se definišu kao mikročestice kod kojih je aktivna supstanca smeštena u jezgro okruženo sa jednim ili više slojeva zaštitnog materijala (ljuska, zid mikrokapsule), sačinjenog najčešće od makromolekularne ili polimerne supstance (Park i Yeo, 2007). Aktivna supstanca može biti čista, rastvorena u ulju, ili adsorbovana na čvrstom poroznom materijalu. Zid kapsule je inertan u odnosu na sastojke koji se nalaze u unutrašnjosti (jezgro mikrokapsule). Čvrstina zida treba da bude dovoljna da spreči raspadanje mikrokapsula i oslobađanja njihovog sadržaja tokom procesa proizvodnje, transporta i primene. Izbor materijala za izradu zida mikrokapsula

je ključni faktor koji će uticati na mehanizam oslobađanja sadržaja jezgra tj. aktivne supstance. Sadržaj se obično zadržava u kapsuli sve dok se ne oslobodi procesom koji ima za posledicu lomljenje, gnječenje, topljenje, rastvaranje, eroziju ili pucanje zida kapsule. Drugi način oslobađanja aktivnih sastojaka je proces difuzije aktivnih sastojaka kroz zid kapsule (Hawkins i sar., 2005; Park i Yeo, 2007).

Mikrosfere (slika 2.1b) se definišu kao matriksne mikročestice, obično sferičnog oblika, kod kojih je aktivna supstanca homogeno ili heterogeno dispergovana u polimernom materijalu, koji ispunjava celi volumen kapsule (najčešće sintetski polimeri i kopolimeri glikolne i mlečne kiseline i prirodni polisaharidni polimeri) (Milić i Petrović, 2003; Burges i Hickey, 2007). Aktivna supstanca inkorporirana u mikrosfere se može osloboditi difuzijom kroz matriks nakon njenog rastvaranja, ili nakon erozije/degradacije polimera. Mikrosfere se još nazivaju mikromatriksi i multiježgarne (multinuklearne) mikro kapsule (Thies, 1996).



Slika 2.1. Shematski prikaz građe: a) mikro kapsule i b) mikrosfere (mikromatriksa)

2.1.2. Istorijski razvoj mikroinkapsulacije

Fenomen mikroinkapsulacije je prvi zapazio i opisao holandski hemičar Bungenberg de Jong 1932. godine, kada je tokom eksperimenta sa koloidnim sistemima uočio pojavu mikroskopskih koacervata nalik ćelijama (Bungenberg de Jong, 1932). Prvi patentirani postupak mikroinkapsulacije datira iz 1957. godine i korišćen je za proizvodnju papira za kopiranje impregniranog mikročesticama sa inkapsuliranom bojom (Green i

Schleicher, 1957). Ubrzo se javlja i ideja o primeni polimernih mikročestica kao sistema za isporuku lekova (Chang, 1964), a 1989. godine na tržište je plasiran depo preparat Lupron® Depot, sa leuprorelinacetatom inkapsuliranim u mikročestice na bazi poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) polimera (Siepmann i Siepmann, 2006). Nakon ovog leka, na tržištu su se pojavili i drugi farmaceutski preparati sa mikročesticama, namenjeni uglavnom za parenteralnu primenu (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Primeri registrovanih lekova na svetskom tržištu koji sadrže mikročestice (preuzeto i prilagođeno iz Siepmann i Siepmann, 2006)

Aktivna supstanca	Zaštićeni naziv leka	Farmaceutski oblik	Proizvođač	Primena
Leuprorelinacetat	Lupron *	Prašak za suspenziju za injekciju	Takeda	Kancer prostate
Leuprorelinacetat	Trenantone	Prašak za suspenziju za injekciju	Takeda	Kancer prostate
Rekombinantni humani hormon rasta	Nutropin Depot	Prašak za suspenziju za injekciju	Genetech – Alkermes	Deficijencija hormona rasta
Goserelinacetat	Zoladex *	Implant	I.C.I.	Kancer prostate
Oktreotidacetat	Sandostatin LAR depot *	Prašak za suspenziju za injekciju	Novartis	GH supresija
Triptorelin	Decapeptyl	Prašak za suspenziju za injekciju	Debiopharm	Kancer
Risperidon	RispoleptConsta *	Prašak za suspenziju za injekciju	Cilag AG	Šizofrenija

* proizvođač poseduje dozvolu za stavljanje leka u promet na tržište R. Srbije (izvor: Agencija za lekove i medicinska sredstva R. Srbije)

2.1.3. Razlozi za inkapsulaciju

Osnovne prednosti mikročestica u odnosu na konvencionalne nosače lekova ogledaju se u sferičnom obliku (koji može u izvesnoj meri biti deformisan), mikrometarskim dimenzijama i velikom odnosu površine i volumena. Otrkiće i primena brojnih metoda za karakterizaciju, tehnika mikroinkapsulacije (2.1.4), novih biokompatibilnih sintetskih i polusintetskih polimera doveli su do pojave mikročestica „naprednih“ karakteristika. Ove karakteristike se uglavnom odnose na pravilan, sferičan oblik, ujednačen sadržaj

lekovite supstance, stabilnost u *in vitro* i *in vivo* uslovima, pogodan profil oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance i visoku selektivnost za mesto delovanja.

Najčešći razlozi za mikroinkapsulaciju u farmaceutskoj industriji su:

- *Zaštita inkapsuliranih sastojaka.* Inkapsulacija je efikasan način da se nestabilne aktivne supstance zaštite od nepovoljnog uticaja okruženja (vlaga, svetlost, vazduh, toplota), tokom proizvodnih procesa, pakovanja, čuvanja (*in vitro*), ali i nakon aplikacije (*in vivo*) (Park i Yeo, 2007; Almeida, 2010).
- *Sprečavanje isparavanja.* Inkapsulacijom lako isparljivih supstanci (u čvrstom i tečnom agregatnom stanju, ređe gasova) moguće je sprečiti gubitke uzrokovane njihovim isparavanjem (Burges i Hickey, 2007; Avanco i Bruschi, 2009).
- *Inkapsulacija tečnosti u čvrste nosače.* Mikročestice su kao čvrsti nosači pogodnije za dalju manipulaciju tokom proizvodnog procesa sve do dobijanja konačnog proizvoda - leka, ali i za jednostavnije čuvanje i aplikaciju (Burges i Hickey, 2007).
- *Poboljšanje protočnosti.* Inkapsulacijom supstanci loše protočnosti (nepravilan oblik, široka distribucija veličine, površinsko naelektrisanje) u čestice sferičnog oblika, glatke površine i ujednačenih dimenzija, znatno se poboljšava protočnost. Na taj način se olakšava dalja manipulacija tokom proizvodnog procesa (npr. punjenje u kapsule) i postiže uniformnost sadržaja (Burges i Hickey, 2007; Healy i sar., 2008).
- *Sprečavanje inkompatibilija.* Čest problem u formulacionoj fazi istraživanja predstavljaju inkompatibilije aktivnih supstanci i ekscipijena, ali i inkompatibilija između samih aktivnih supstanci, kao i inkompatibilija sa ambalažom. Fizičkim razdvajanjem sastojaka leka polimernom membranom moguće je sprečiti da dođe do pomenutih neželjenih interakcija (Burges i Hickey, 2007; Avanco i Bruschi, 2009).
- *Produženje roka trajanja konačnog proizvoda.* Zaštitom od nepovoljnog uticaja okruženja, prevencijom evaporacije i inkompatibilija dobija se konačan proizvod zadovoljavajućeg roka trajanja.
- *Korigovanje organoleptičkih osobina.* Mogućnost korigovanja ukusa, mirisa i boje ima naročito značajno mesto u kozmetičkoj industriji (Hawkins i sar., 2005), ali se

danas i u farmaceutskoj industriji poklanja sve veća pažnja postizanju prihvatljivih organoleptičkih osobina leka (Shah i sar., 2008; Yang i sar., 2009).

- *Mogućnost parenteralne primene korišćenjem standardnih igala i tehnika* zahvaljujući mikrometarskim dimenzijama i sferičnom obliku (Siepmann i Siepmann, 2006).

- *Zaštita organizma od neželjenog delovanja aktivnih sastojaka.* Nekada je potrebno zaštititi organizam od neželjenog delovanja aktivne supstance, što je moguće postići sprečavanjem njenog oslobađanja i delovanja na mestima koja nisu ciljna. Najbolji primer za to je inkapsulacija antineoplastika koji su shodno mehanizmu svog delovanja toksični ne samo za maligne ćelije već i za zdrave ćelije, naročito one koje se intenzivno dele (kostna srž, reproduktivne ćelije odnosno njihovi prekursori, crevni epitel i dr.) (Xie i sar., 2009; Cerroni i sar., 2011). Tu su i primeri inkapsulacije potencijalno ulcerogenih ili iritantnih lekova (naproksen-natrijum u obliku mikrokapsula komprimovanih u tablete u *Intestinal Protective Drug Absorption System*) (Verma i Garg, 2001; Dey i sar., 2008).

- *Modifikovanje oslobađanja aktivnih sastojaka.* Nakon primene konvencionalnih nosača lekova često dolazi do naglog oslobađanja lekovite supstance, što nosi rizik da se njena koncentracija u plazmi približi potencijalno toksičnim vrednostima. Osim toga, koncentracija lekovite supstance sa kratkim poluvremenom eliminacije u plazmi brzo pada ispod nivoa koji je neophodan za postizanje terapijskog efekta, pa je kod takvih supstanci neophodno učestalo uzimanje leka, što naročito predstavlja veliki problem pacijentima koji boluju od hroničnih obolenja. Mikroinkapsulacijom lekovite supstance, ili njenim dispergovanjem u mikromatrikse sačinjene od odgovarajućih polimera, ali i pravilnim izborom metoda i uslova inkapsulacije, moguće je modifikovati profil oslobađanja lekovite supstance. Krajnji cilj je postizanje usporenog oslobađanja (čime se smanjuje potreba za učestalim uzimanjem leka i poboljšava komplijansa) i smanjenje fluktuacije koncentracije leka u plazmi (čime se postiže efikasnije delovanje, smanjuje mogućnost da nivo leka padne ispod efektivnog ili pak pređe granicu toksičnosti) (Freiberg i Zhu, 2004; Park i Yeo, 2007).

- *Dijagnostičke svrhe.* Vezivanjem površinski modifikovanih mikročestica (npr. antigen specifičnim antitelima) sa inkapsuliranim dijagnostičkim sredstvima, moguća je detekcija ciljnih tkiva/organa. (Xie i sar., 2009; Slomkowski i Basinska, 2010; Ahn i sar., 2011).

2.1.4. Metode inkapsulacije

Pod metodama mikroinkapsulacije podrazumevaju se različiti procesi tokom kojih se čvrste supstance, tečnosti ili gasovi okružuju polimernom membranom ili matriksom, na način koji dovodi do formiranja čvrstih, sferičnih ili približno sferičnih čestica mikrometarskih dimenzija. Tehnike koje se koriste za dobijanje mikročestica variraju od jednostavnih postupaka, koji podrazumevaju mešanje polimera i lekovite supstance, pa do složenih postupaka polimerizacije kojima prethodi nakupljanje monomera u fazi koja je bogata lekovitom supstancom.

S obzirom na raznovrsnost i brojnost postupaka inkapsulacije, ne postoji jedinstven i opšteprihvaćen sistem njihove klasifikacije. Iako su postupci inkapsulacije složeni i zasnovani na različitim fizičkim i hemijskim procesima koji dovode do formiranja mikročestica, jedan od tih procesa je često dominantan. Na osnovu prirode tog procesa postupak inkapsulacije može se uslovno svrstati u hemijske ili fizičke metode inkapsulacije (Thies, 1996). Pregled najznačajnijih metoda inkapsulacije dat je u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Pregled najznačajnijih metoda koje se koriste za dobijanje mikročestica

Hemijske metode inkapsulacije	Fizičke metode inkapsulacije
Koacervacija (prosta i složena)	Sušenje raspršivanjem
Polimer-polimer inkompatibilije	Sušenje zamrzavanjem
Polimerizacija na granici faza	Uklanjanje rastvarača
<i>In situ</i> polimerizacija	Oblaganje raspršivanjem
Jonotropno geliranje i polielektrolitno kompleksiranje	Desolvatacija raspršivanjem
	Inkapsulacija topljenjem

2.1.4.1. Hemijske metode inkapsulacije

Koacervacija. Koacervacija je prvi opisan postupak mikroinkapsulacije i jedna od prvih metoda koja je primenjena za industrijsku proizvodnju mikročestica. Zasnovana je na razdvajanju rastvora jednog ili više hidrofilnih polimera na dve faze: viskoznu fazu bogatu polimerom (u vidu gustih sitnih kapljica), i tečnu fazu koja je okružuje. U zavisnosti od broja polimera koji su uključeni u ovaj proces, koacervacija može biti *prosta* i *kompleksna*.

- *Prosta koacervacija.* Prosta koacervacija je zasnovana na primeni jednog polimera (najčešće želatina, polivinilalkohol, karboksimetilceluloza), a do razdvajanja faza dolazi u procesima koji dovode do desolvatacije (dehidratacije) rastvora polimera. Desolvatacija je najčešće posledica dodatka tečnosti koje se mešaju sa vodom, ali ne i polimerom, poput etanola, dioksana, acetona, propanola i izopropanola, zatim dodatka neorganskih soli (tzv. efekat isoljavanja, eng. *salting out*) i izmena temperature (Park i Yeo, 2007).
- *Kompleksna (složena) koacervacija.* Ovaj proces je zasnovan na primeni suprotno naelektrisanih, u vodi rastvornih polimera. Kada se dva suprotno naelektrisana hidrofilna polimera nađu u vodi, usled njihovog elektrostatičkog privlačenja dolazi do formiranja faze bogate polimerima tzv. kompleksnog koacervata. Drugu fazu čini voda, tačnije razblaženi vodeni rastvor polimera koji okružuje kapljice koacervata, pa se zato označava kao kontinuirana faza. Ukoliko se u rastvoru jednog polimera disperguje u vodi nerastvoran lek (aktivna supstanca), nakon dodatka suprotno naelektrisanog polimera (ili izmene pH vrednosti rastvora, promene temperature) dolazi do formiranja nove faze - koacervata koji kvasi/okružuje lek. Najpoznatiji primer kompleksne koacervacije je koacervacija usled elektrostatičkog privlačenja arapske gume (anjonski polimer) i želatine (katjonski polimer) (Thies, 1996). Postoji veliki broj faktora koji utiču na formiranje mikročestica kompleksnom koacervacijom, a najznačajniji su: pH vrednost, jonska jačina, molekulska masa, koncentracija i odnos masa polimera (Burges i Hickey, 2007). Podložnost uticaju velikog broja faktora je sa jedne strane nedostatak ove metode inkapsulacije, jer podešavanje i kontrolisanje uslova čine postupak komplikovanim, ali sa druge strane

postoje brojne mogućnosti za podešavanje procesnih parametara u cilju optimizacije i dobijanja mikročestičnih nosača optimalnih karakteristika. Nedostaci ove metode su osetljivost nastalih membrana na vlagu i nedovoljna mehanička otpornost, zbog čega je neophodno vršiti naknadno umrežavanje. Za umrežavanje se obično koriste hemijski agensi koji su neprihvatljivi za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, što dodatno ograničava primenu ove metode inkapsulacije. Čest ograničavajući faktor je povišena temperatura, naročito kada je reč o inkapsulaciji bioloških lekova i ćelija (Burges i Singh, 1993; Thies, 1996; Burgess i Hickey, 2007).

Polimer-polimer inkompatibilije. Sličnost ovog metoda sa koacervacijom ogleda se u faznoj separaciji koja prethodi nastanku mikročestica, ali osnovna razlika je uzrok separacije faza. Za razliku od kompleksne koacervacije gde mikročestice obrazuju dva polimera koja se privlače, kod polimer-polimer inkompatibilije do fazne separacije dolazi upravo zbog inkompatibilije dva polimera koji se rastvaraju u istom rastvaraču, ali se međusobno ne mešaju. Kao posledica odbijanja dva polimera nastaju dve faze, jedna bogata jednim polimerom, a druga drugim, pri čemu jedan od polimera služi za inkapsulaciju, a drugi samo za razdvajanje faza. Međutim, ovaj polimer se često javlja u nastalim mikročesticama kao nečistoća (Thies, 1996). Primeri komercijalno dostupnih mikročestica dobijenih ovom metodom su mikročestice sa kalijum-hloridom i acetilsalicilnom kiselinom (Bakan, 1986). Ograničavajući faktori za širu upotrebu ove metode u farmaciji su primena organskih rastvarača koje je teško u potpunosti ukloniti iz mikročestica, povišene temperature i prisustvo drugog polimera kao nečistoće. Zahvaljujući velikom rasponu dijametara ovako dobijenih mikročestica moguće ih je koristiti u preparatima za *per os*, ali i parenteralnu primenu (Thies, 1996).

Polimerizacija na granici faza. Ovaj metod inkapsulacije je klasičan primer dobijanja mikročestica hemijskim procesom. Njegova specifičnost se ogleda u reakciji polikondenzacije između dva komplementarna monomera na granici koja razdvaja dve faze koje se ne mešaju. Svaki od ova dva monomera je najvećim delom prisutan u jednoj od dve faze tako da u kontakt dolaze upravo na granici između faza, gde dolazi do reakcije polikondenzacije (Thies, 1996; Park i Yeo, 2007; Jyothi i sar., 2010). Ukoliko se rezultujući polimer rastvara u kapljicama (fazi) koje okružuje onda će nastati mikrosfere, a ukoliko nije rastvoran u njima, zadržava se na površini mikrokapljica

obrazujući na taj način mikrokapsule (Arshady, 1989). Ovim postupkom se mogu dobiti sferične mikročestice, glatke površine i dijametra između 20 i 30 μm , pa i manje (Thies, 1996). Ovaj postupak se najčešće koristi u proizvodnji poliamidnih (najlonskih) mikročestica koje se mogu koristiti za inkapsulaciju boja, pesticida, proteina i različitih lekovitih supstanci (Arshady, 1989; Thies, 1996).

In situ polimerizacija. Ovaj metod dobijanja mikročestica je najbliži polimerizaciji na granici faza. Osnovna razlika je što se reaktanti kod *in situ* polimerizacije ne mešaju sa materijalom koji se inkapsulira, već se nalaze isključivo u spoljašnjoj, kontinuiranoj fazi, dok se kod međupovršinske polimerizacije jedan od reaktanata nalazi i u unutrašnjoj fazi. Prvo se formiraju pre-polimeri male molekulske mase u kontinuiranoj fazi, koji se zatim daljom polimerizacijom uvećavaju i nakupljaju spolja, na površini dispergovanih čestica jezgra obrazujući mikrokapsule (Thies, 1996; Jyothi i sar., 2010). Ovaj metod je naročito pogodan za inkapsulaciju tečnosti, ali uz odgovarajuće izmene može se koristiti za inkapsulaciju čvrstih materijala. Jedan od primera koji je našao komercijalnu primenu su mikročestice nastale polimerizacijom uree i formaldehida u vodenom medijumu (Thies, 1996).

Jonotropno geliranje i polielektrolitno kompleksiranje. Jonotropno geliranje je fenomen zasnovan na osobini pojedinih polimera da u kontaktu sa jonima metala obrazuju gelove. Metode za inkapsulaciju koje su zasnovane na ovom fenomenu razlikuju se po načinu izvođenja, a cilj je da nastali gelovi budu sferični i mikrometarskih dimenzija. Najčešće su to ukapavanje rastvora polimera u rastvor gelirajućih jona (2.3.2.1) ili oslobađanje gelirajućih jona iz njihovih soli okruženih polimerom (2.3.2.2), obično u kapima unutrašnje faze emulzije. Lekovita supstanca koju treba inkapsulirati obično se rastvara/disperguje u rastvoru/disperziji polimera pre nego što dođe u kontakt sa gelirajućim jonima. Ređe se aktivna supstanca uvodi kroz pore u nastale mikročestice nakon njihovog formiranja difuzijom iz koncentrovanih rastvora. Sličan fenomen je kompleksiranje polielektrolita, koji je zasnovan na interakciji između dva elektrolita (najčešće suprotno naelektrisana) što rezultuje nastankom polielektrolitnog kompleksa, najčešće na dodirnoj površini. Postoji mogućnost istovremenog kombinovanja ova dva postupka, o čemu će više reči biti u poglavlju 2.5.2. Osim pomenutog para polimera, koriste se i drugi polimer/ion ili

polimer/polimer parovi za dobijanje mikročestica poput hitozan/trifosfat, karboksimetilceluloza/aluminijum (ili hitozan), karagen/kalijum (ili hitozan), pektin/kalcijum i alginat/kalcijum parova (Park i Yeo, 2007).

2.1.4.2. Fizičke metode inkapsulacije

Sušenje raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem je postupak kojim se tečnost u vidu sitnih kapljica uvodi u struju zagrejanog gasa koji dovodi do brzog formiranja čvrstih čestica (Gharsalloui i sar., 2007). Tečnost koja se uvodi u komoru može da bude rastvor, emulzija ili disperzija supstance koja se inkapsulira i jednog ili više polimera. Najčešće korišćen rastvarač je voda, s obzirom da su organski rastvarači obično lako zapaljivi, lako isparljivi i toksični (Thies, 1996). Kao zagrejani gas u koji se uvode kapljice tečnosti najčešće se koristi vazduh, ali ukoliko je potrebno postići inertnu atmosferu koriste se gasovi poput azota (Gharsalloui i sar., 2007).

Postupak mikroinkapsulacije zasnovan na ovoj metodi odvija se u četiri faze. U prvoj fazi priprema se emulzija ili disperzija sa lekovitom supstancom, zatim se vrši njeno homogenizovanje. Nakon toga, homogena tečnost se upotrebom posebnih prskalica (atomizera) u vidu sitnih kapljica uvodi u struju zagrejanog gasa, a u poslednjoj, četvrtoj fazi, dolazi do dehidratacije/desolvatacije i nastanka čvrstih čestica (Shahidi i Han, 1993). U zavisnosti od uslova, ovim postupkom moguće je dobiti mikročestice veličine od svega par mikrometara. Osnovne prednosti sušenja raspršivanjem su jednostavnost, veliki kapacitet proizvodnje i mogućnost komercijalne primene. Osim toga, mogućnost dobijanja mikročestica u zatvorenim sistemima čini ih pogodnim za upotrebu u gotovim lekovima koji moraju da ispune zahtev sterilnosti. Sa druge strane, postoje brojni nedostaci među kojima su relativno mali kapacitet inkapsulacije (obično 20 - 30 %), ograničen izbor polimera za inkapsulaciju i lekovitih supstanci koje je moguće inkapsulirati (Thies, 1996). Ova ograničenja uglavnom se odnose na osetljivost lekovite supstance na povišenu temperaturu, njenu rastvorljivost u vodi i drugim prihvatljivim rastvaračima. Prilikom izbora polimera za inkapsulaciju potrebno je razmotriti reološke karakteristike njegovih rastvora. Izrazito viskozni rastvori polimera za inkapsulaciju, naročito u kombinaciji sa visokim sadržajem lekovite supstance, u velikoj meri ograničavaju mogućnost dobijanja sitnih kapi u raspršivačima,

a time dobijanje mikročestica zadovoljavajuće veličine i pravilnog oblika. Na veličinu nastalih mikročestica utiču brzina kojom se disperzija uvodi u komoru, sastav disperzije (udeo materijala jezgra, polimera za oblaganje i njihove osobine), karakteristike raspršivača i komore, kao i proizvodna temperatura (Park i Yeo, 2007).

Oblaganje raspršivanjem (eng. *fluid bed coating*). Ovo je još jedan postupak za dobijanje mikročestica koji se primenjuje u industriji, a najbliži je sušenju raspršivanjem. Osnovna razlika između ova dva metoda inkapsulacije je što se kod sušenja raspršivanjem u komoru za sušenje uvode kapljice koje sadrže jezgro i rastvor polimera za oblaganje, dok se kod metode fluidizacije u komoru odvojeno uvodi materijal koji se inkapsulira i rastvor/rastop/disperzija polimera za oblaganje. Ovim postupkom se mogu inkapsulirati čvrste supstance, a izuzetak su jedino tečnosti prethodno vezane za porozni nosač (Park i Yeo, 2007). Prvo se u komoru uvodi materijal koji treba inkapsulirati. Nošene strujom vazduha (ili inertnog gasa) čestice se ponašaju slično tečnostima, pa otuda i naziv fluidizacija. Nakon ovog suspendovanja čestica jezgra u struji gasa, u komoru *fluid bed* uređaja se pomoću specijalno dizajniranih prskalica uvodi rastvor/rastop/disperzija polimera za oblaganje. Prednost ovakvog načina inkapsulacije ogleda se u tome da se rastvor/rastop/disperzija polimera nanosi u više slojeva, jer se čestice nošene strujom gasa u komori vraćaju na dole i opet ka vrhu komore. Na ovaj način postiže se ravnomerno oblaganje, a postoji mogućnost oblaganja sa više različitih polimera izmenom disperzije/rastvora za oblaganje, tokom proizvodnog procesa (npr. oblaganje polisaharidnog omotača enterosolventnim i sl) (Thies, 1996; Park i Yeo, 2007).

Sušenje zamrzavanjem. Ovaj postupak mikroinkapsulacije se sastoji iz tri faze. Prva faza obuhvata pripremu emulzije čiju unutrašnju fazu čine polimer i lekovita supstanca u rastvaraču. Zatim se sublimacijom prvo uklanja rastvarač kontinuirane faze, a u poslednjoj fazi kapljice unutrašnje faze prevode se u polimerne mikročestice. Da bi ovo bilo izvodljivo neophodno je da rastvarači obe faze imaju različite tačke mržnjenja (Burges i Hickey, 2007).

Desolvacija raspršivanjem. Ovaj metod se zasniva na postupku desolvacije do koga dolazi kada se kapljice rastvora polimera i supstance koja se inkapsulira preko prskalica nanose na tečnost koja uklanja rastvarač.

Uklanjanje (ekstrakcija i evaporacija) rastvarača. Ovaj postupak se zasniva na uklanjanju rastvarača iz rastvora koji sadrži polimer i supstancu koja se inkapsulira. Osnovna razlika između ovih postupaka je u načinu uklanjanja rastvarača. U oba slučaja prvo se priprema emulzija kod koje kapljice unutrašnje faze čini rastvor polimera i lekovite supstance u određenom rastvaraču. Zatim se rastvarač iz unutrašnje faze uklanja dodatkom tečnosti za ekstrakciju (ekstrakcija rastvarača), odnosno zagrevanjem emulzije (evaporacija rastvarača) (O'Donell i McGinity, 1997; Freitas i sar., 2005). U oba slučaja neophodno je obezbediti brzo uklanjanje rastvarača unutrašnje faze, jer u suprotnom može doći do formiranja mikročestica deformisanog oblika, izraženog poroziteta i široke raspodele po veličini (Park i Yeo, 2007).

Inkapsulacija topljenjem. Postupak se zasniva na mešanju rastopa polimera sa čvrstom/tečnom lekovitom supstancom. Potom se pri temperaturi od par stepeni iznad tačke topljenja polimera, rastvoru/disperziji lekovite supstance u rastopu polimera dodaje tečnost sa kojom se ona ne meša, te se uz intenzivno mešanje formira emulzija tako da se rastop polimera nađe u unutrašnjoj fazi. Nakon naglog hlađenja kapljice unutrašnje faze očvršćavaju obrazujući mikročestice (Jaspart i sar., 2005; Park i Yeo, 2007).

2.1.4.3. Kriterijumi za izbor metode inkapsulacije

Prilikom izbora načina i uslova izvođenja inkapsulacije neophodno je razmotriti fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakodinamičke i farmakokinetičke karakteristike supstance koja se inkapsulira, ali i svojstva polimera koji se koriste za inkapsulaciju. Polimer za inkapsulaciju i postupak inkapsulacije treba odabrati tako da sledeće karakteristike mikročestica odgovaraju njihovoj nameni:

- *Veličina i distribucija veličine.* Veličina je svojstvo koje treba da odgovara načinu primene mikročestica. Iako se oralno mogu primeniti sve mikročestice nezavisno od njihove veličine (1 do 1000 μm), utvrđeno je da smanjenje veličine od 7,2 do 2,1 μm može udvostručiti gastrointestinalnu resorpciju (Gaumet i sar., 2009). Ukoliko se želi postići lokalno delovanje i produžiti vreme zadržavanja u određenim delovima GIT-a veličina mikročestica može imati presudnu ulogu. Tako npr. za postizanje ciljanog

delovanja u kolonu optimalna veličina mikročestica je između 4 i 15 μm (Lamprecht i sar., 2001). Veličina mikročestica pogodna za pulmonalnu primenu je oko 3 μm , dok je za intramuskularnu, subkutanu i intravitrealnu primenu preporučena veličina u opsegu od 10 do 250 μm , kako bi se sprečila makrofagna fagozitocita i smanjila inflamatorna reakcija nakon primene (Thomas i sar., 2010). Osim što je značajna za put primene, veličina mikročestica se može dovesti u direktnu vezu sa brzinom kojom se inkapsulirana supstanca oslobađa iz mikročestica. Manje mikročestice imaju veću ukupnu površinu, pa je brže i oslobađanje inkapsulirane supstance, dok je kod većih mikročestica ukupna površina manja, a duži difuzioni put iz jezgra mikročestica (Siepmann i Göpferich, 2001; Tran i sar., 2011).

- *Efikasnost inkapsulacije.* Efikasnost inkapsulacije podrazumeva stepen iskorišćenosti leka tokom procesa inkapsulacije i poželjno je da ona ima vrednost što bližu 100 %. Rastvorljivost lekovite supstance je jedna od osnovnih karakteristika koju je potrebno razmotriti prilikom odabira postupka inkapsulacije kako bi se postigla što veća vrednost efikasnosti inkapsulacije. Tako npr. ukoliko se lekovita supstanca dobro rastvara u vodi, a slabo u nepolarnim rastvaračima, onda je zadovoljavajuću efikasnost inkapsulacije moguće postići samo inkapsulacijom iz emulzija V/U tipa, gde se iz kapljica vodene faze koje su bogate lekovitom supstancom dobijaju mikročestice određenim fizičkim ili hemijskim postupkom (npr. polimerizacijom na granici faza).

- *Sadržaj lekovite supstance (odnos lek/polimer).* Pod sadržajem lekovite supstance podrazumeva se udeo lekovite supstance u ukupnoj masi mikročestica, a obično se izražava u procentima. Generalno je poželjno da sadržaj lekovite supstance bude što veći, jer se na taj način smanjuje količina mikročestica koja sadrži terapijsku dozu lekovite supstance, a ujedno se smanjuje utrošak polimera koji se koriste za inkapsulaciju.

- *Stabilnost.* Kao i u slučaju izrade konvencionalnih nosača lekova, prilikom odabira polimera za inkapsulaciju i metode inkapsulacije neophodno je razmotriti stabilnost lekovite supstance. Tako npr. prilikom inkapsulacije gena, enzima, antitela i dr. nije moguće koristiti metode inkapsulacije koje zahtevaju primenu visokih temperatura.

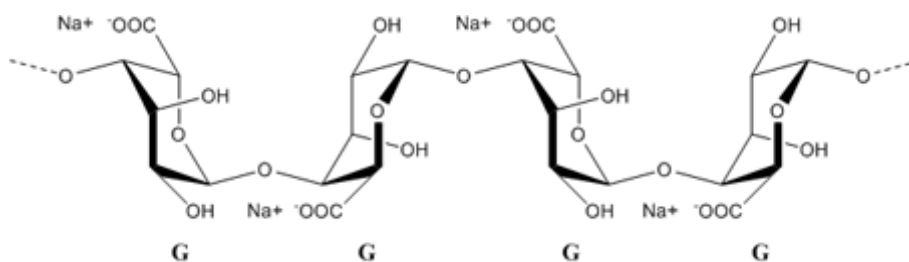
Takođe, potrebno je voditi računa da postupak inkapsulacije ne ugrozi stabilnost mikročestica.

- *Profili oslobađanja lekovite supstance iz mikročestica in vivo.* Profil oslobađanja lekovite supstance iz mikročestica zavisi od sastava, uslova i načina izrade mikročestica, a potrebno ga je uskladiti sa farmakokinetičkim i farmakodinamičkim osobinama lekovite supstance, kako bi se nakon primene mikročestica postigao optimalan terapijski efekat, uz smanjenje neželjenih efekata (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007; Tran i sar., 2011).

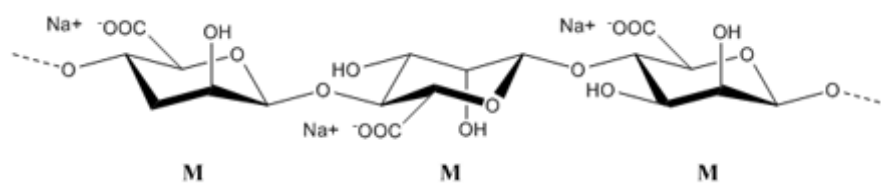
2.2. ALGINATI

2.2.1. Hemijska struktura alginata

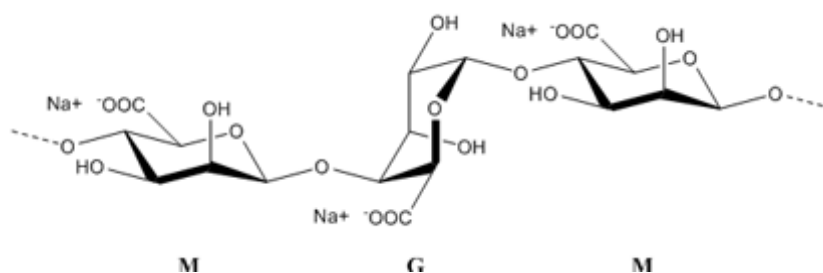
Alginati su soli alginske kiseline, linearnog kopolimera koji predstavlja mešavinu β -D-manuronske kiseline i njenog C5 epimera α -L-guluronske kiseline povezanih (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama, opšte molekulske formule $(C_6H_8O)_n$, gde n predstavlja broj monomernih jedinica (Johnson i sar., 1997; Draget i sar., 2005; Rowe i sar., 2009). Preciznije, lanci alginske kiseline, i njenih soli, građeni su iz tri vrste blokova monomera povezanih glikozidnim vezama. Ovi blokovi sačinjeni su od: i) monomera guluronske kiseline (G-blokovi, slika 2.2), ii) monomera manuronske kiseline (M-blokovi, slika 2.3), i iii) proizvoljno ili naizmenično raspoređenih monomera manuronske i guluronske kiseline (MG-blokovi, slika 2.4) (Pawar i Edgar, 2012). Uobičajena molekulska masa alginske kiseline se kreće između 20 000 i 240 000 (Rowe i sar., 2009).



Slika 2.2. Struktura lanaca poliguluronske kiseline (G-blokovi)



Slika 2.3. Struktura lanaca polimanuronske kiseline (M-blokovi)



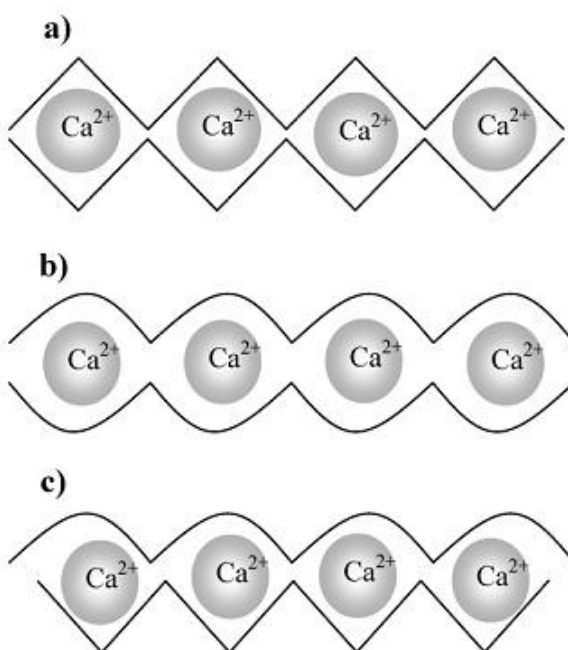
Slika 2.4. Struktura lanaca građenih od naizmenično povezanih monomera manuronske i guluronske kiseline (MG-blokovi)

Molekulska masa alginске kiseline i alginata, kao i zastupljenost manuronske i guluronske kiseline u njihovoj građi, može da varira, a zavisi od vrste algi iz kojih se dobijaju i uslova pod kojima su one rasle (Tonnensen i Karlsen, 2002; Pawar i Edgar, 2012). Ovo je naročito značajno zbog činjenice da alginati različite strukture formiraju hidrogelove različitih karakteristika, te će i mogućnost njihove primene striktno zavisiti od njihove strukture, odnosno sastava.

2.2.2. Osobine alginata

Jedna od osobina alginata koju je neophodno razmotriti pre nego što se pristupi izradi Ca-alginatnih mikročestica je njihova rastvorljivost u vodi. Ona zavisi od tri faktora: pH vrednosti, jonske jačine i prisustva tzv. “gelirajućih jona“. Da bi se postiglo rastvaranje alginata, neophodno je obezbediti da pH vrednost bude iznad kritične vrednosti (zavisi od strukture alginata), kako bi karboksilne grupe bile deprotonovane. Jonska jačina medijuma utiče na rastvorljivost indirektno, preko uticaja na konformaciju, istežanje lanaca alginata i viskozitet rastvora. U prisustvu dvovalentnih jona metala (izuzev Mg^{2+}) alginati grade gelove, pa je u cilju rastvaranja alginata neophodno obezbediti odsustvo ovih katjona (Pawar i Edgar, 2012).

Kada se pH vrednost rastvora alginata spusti ispod pKa vrednosti “uronskih“ kiselina, dolazi do formiranja „kiselih alginatnih gelova“. Ovakvi gelovi su stabilizovani intermolekularnim vodoničnim vezama. Nakon geliranja molekuli vode ostaju fizički zatvoreni u alginatnom matriksu, ali i dalje imaju sposobnost migracije, što je od velikog značaja za primenu alginata za imobilizaciju ćelija i inkapsulaciju lekovitih supstanci (Tonnensen i Karlsen, 2002; Pawar i Edgar, 2012).



Slika 2.5. Shematski prikaz tri tipa mogućih spojnica lanaca alginata u strukturi alginatnih gelova sa dvovalentnim katjonima: a) GG/GG spojnice; b) MG/MG spojnice, i c) GG/MG spojnice (Donnati i sar., 2005)

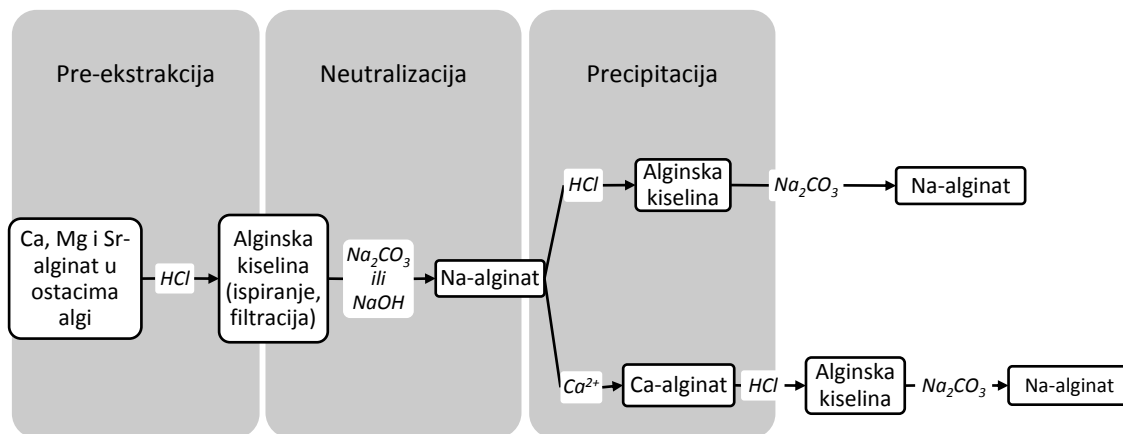
Međutim, za širu primenu alginata u oblasti biotehnologije i medicine zaslužno je njihovo svojstvo da u kontaktu sa slobodnim dvovalentnim katjonima (izuzev Mg²⁺) grade “jonotropne gelove“. Za razliku od monovalentnih katjona, koji sa alginatima obrazuju u vodi rastvorljive soli, dvovalentni joni metala heliraju lance alginata obrazujući hidrogelove ili precipitate. Njihov nastanak se objašnjava interakcijama između G-blokova susednih lanaca alginata koji se u prisustvu pomenutih jona povezuju međusobno, obrazujući tesna “čvorišta“ (spojnice) između kojih se nalaze prostori ispunjeni gelirajućim jonima (Pawar i Edgar, 2012). Kao što je prikazano na slici 2.5, osim G-blokova i MG blokovi obrazuju spojnice, ali su one znatno slabije nego spojnice formirane između G-blokova (Fang i sar., 2007). Ovo nedvosmisleno ukazuje da je

afinitet gelirajućih katjona ka G-reziduima lanaca alginata znatno veći nego ka M-reziduima (Braccini i sar., 1999; Braccini i Perez, 2001). Stoga, alginati sa većim sadržajem ostataka guluronske kiseline obrazuju jače i postojanije gelove u odnosu na gelove koje obrazuju alginati sa visokim sadržajem manuronske kiseline.

Na svojstva alginatnih gelova utiče i vrsta jona koji ih obrazuju, a afinitet alginata prema dvovalentnim katjonima opada sledećim redosledom: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (Morch i sar., 2006). S obzirom da najveći praktični značaj imaju gelovi Ca-alginata, te da upravo od njihove strukture zavise osobine Ca-alginatnih mikročestica, u poglavlju 2.3 detaljno su opisani način njihovog formiranja i struktura.

2.2.3. Dobijanje alginata

Iako postoji nekoliko opisanih procedura za bakterijsku sintezu alginata (Gacesa, 1998), alginati koji su komercijalno dostupni gotovo se bez izuzetka dobijaju postupkom ekstrakcije iz smeđih morskih algi familije *Phaeophyceae* (Tonnensen i Karlsen, 2002). U algama se alginati nalaze u obliku nerastvornih soli kalcijuma, magnezijuma, barijuma i stroncijuma, gde je koncentracija ovih jona u njima određena ravnotežom sa morskom vodom (Pawar i Edgar, 2012).



Slika 2.6. Shematski prikaz postupka dobijanja Na-alginata

Shematski prikaz postupka dobijanja natrijum-alginata je predstavljen na slici 2.6. U prvoj fazi se uklanjanju suprotno naelektrisani joni vezani za alginatnu kiselinu

dodatkom 0,1 – 0,2 M mineralne kiseline. Zatim se nerastvorna alginska kiselina prevodi u rastvornu natrijumovu so neutralizacijom sa bazama, natrijum hidroksidom ili natrijum-karbonatom. Nakon toga se uklanjaju čestice nečistoća tehnikama prosejavanja, centrifugiranja i filtracije. Zatim se natrijum-alginat izdvaja iz rastvora prevođenjem u kalcijum-alginat (dodatkom kalcijum-hlorida) ili u alginsku kiselinu (dodatkom mineralne kiseline). Dobijeni talog se zatim odvaja, suši i usitnjava mlevenjem, nakon čega se ponovo prevodi u natrijum-alginat neutralizacijom natrijum-karbonatom. U slučaju kada je precipitacija izvedena dodatkom kalcijumove soli, neophodno je da se iz usitnjenog precipitata Ca-alginata prvo oslobodi alginska kiselina dodatkom mineralne kiseline, a potom se vrši neutralizacija pomoću natrijum-karbonata (Pawar i Edgar, 2012).

Zahvaljujući otkriću enzima manuronskih epimeraza bakterija *Azobacter vinelandii*, koje imaju mogućnost epimerizacije –OH grupe na položaju C5, i izolovanju gena koji nose informacije neophodne za sintezu ovog enzima razvijeni su bakterijski sojevi koji pružaju mogućnost kontrolisane sinteze alginata željene strukture i osobina (Donati i sar., 2005).

2.2.4. Biomedicinska primena alginata

Alginska kiselina i natrijum-alginat imaju GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe* – generalno prihvatljivi kao bezbedni). Osim toga, u Evropi je dozvoljena njihova primena kao aditiva u hrani (Rowe i sar., 2009). Najviše se koriste u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. S obzirom da se dobijaju iz sirovina prirodnog porekla, mogu sadržati različite nečistoće poput teških metala, proteina i endotoksina. Međutim, danas su na tržištu dostupni alginati visoke čistoće sa kontrolisanim sadržajem pirogena koji se mogu koristiti za izradu implanta (Tonnensen i Karlsen, 2002). Primena alginata u medicini vezana je za njihovu biokompatibilnost, biodegradabilnost, netoksičnost i najčešće svojstva građenja gelova, bubrenja, te povećanja viskoziteta vodenih rastvora.

Kao ekscipijens, natrijum-alginat se često može naći u sastavu različitih farmaceutskih preparata namenjenih za *per os* i primenu na koži (tabela 2.3). U sastavu tableta obično ima ulogu sredstva za vezivanje i raspadanje, dok se u kapsulama koristi

kao sredstvo za dopunjavanje. Sve veći značaj natrijum-alginat ima u razvoju novih preparata sa usporenim oslobađanjem lekovite supstance (Tonnensen i Karlsen, 2002, Rowe i sar., 2009).

Tabela 2.3. Primena natrijum-alginata u različitim farmaceutskim oblicima (Rowe i sar., 2009)

Upotreba	Koncentracija, %
Paste i kremovi	5 – 10
Stabilizator u emulzijama	1 – 3
Sredstvo za suspendovanje	1 – 5
Sredstvo za vezivanje (tablete)	1– 3
Sredstvo za raspadanje (tablete)	2,5 – 10

U farmaceutskim oblicima za primenu na koži kao što su suspenzije, emulzije U/V tipa, paste, kremovi i gelovi, natrijum-alginat se najčešće koristi kao sredstvo za povećanje viskoziteta, stabilizator i sredstvo za geliranje (Rowe i sar., 2009).

Dokazana su i mukoadhezivna svojstva alginatnih gelova, pa se alginati zbog ovog svojstva koriste u formulaciji mukoadhezivnih tableta, bukalnih gelova i vaginalnih tableta (Vennat i sar., 1998; Rowe i sar., 2009).

Alginati se dodaju i zavojima za rane, naročito zavojima namenjenim za rane koje su sklone eksudaciji. Nakon nanošenja ovih zavoja na ranu dolazi do izmene natrijumovih jona eksudata sa kalcijumovim jonima alginata, koji dovode do formiranja hidrogela natrijum-alginata (Tonnensen i Karlsen, 2002; Paul i Sharma, 2004).

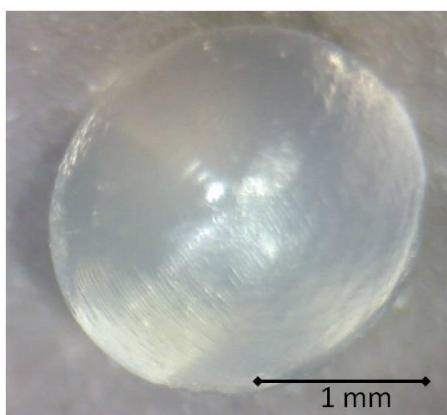
Jedna od prednosti primene natrijum-alginata za mikroinkapsulaciju lekovitih supstanci, poput biotehnoških, ali i drugih osetljivih na povišenu temperaturu i hemijske agense, ogleda se u mogućnosti inkapsulacije na sobnoj temperaturi¹, bez primene organskih rastvarača, reaktivnih hemijskih agenasa i sl.

¹ 20 °C

2.3. Ca-ALGINATNE MIKROČESTICE

2.3.1. Osobine Ca-alginatnih mikročestica

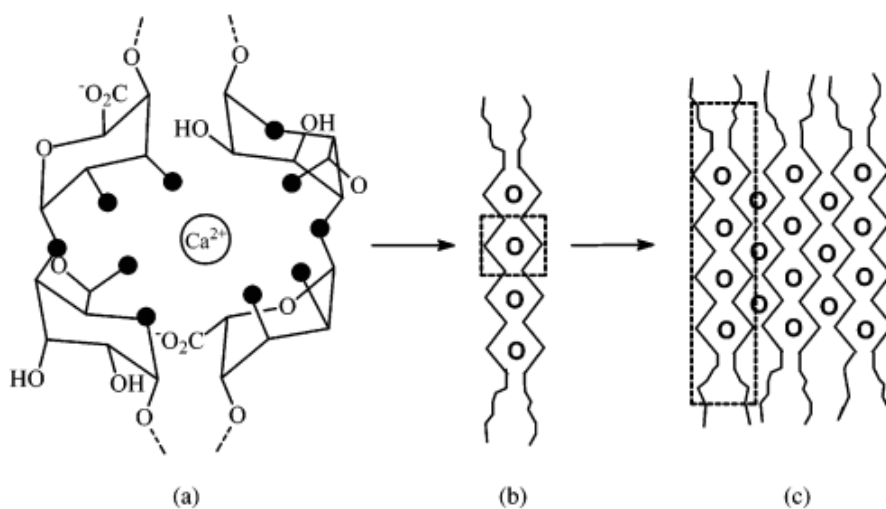
Ca-alginatne mikročestice su hidrogel mikročestice nastale reakcijom geliranja između alginata i Ca^{2+} jona (2.2.2). Izgled Ca-alginatne hidrogel čestice prikazan je na slici 2.7. Iako je prva teorija o strukturi Ca-alginatnih hidrogelova objavljena 1973. godine, s obzirom na veliki praktični značaj njihova struktura je još uvek predmet opsežnih istraživanja. Model “kutije za jaja“ (eng. *egg-box*), odnosno teorija koju su postavili Rees i saradnici, prva je teorija koja tumači strukturu Ca-alginata. Ovaj model, uz manje izmene prihvata se i danas, kao osnova tumačenja povezivanja Ca^{2+} jona sa monomerima alginata, i posledičnog međusobnog povezivanja lanaca alginata. Sam naziv “kutija za jaja“ potiče od načina pakovanja Ca^{2+} jona u šupljinu između monomera guluronske kiseline susednih lanaca (eng. *egg-box dimer*), a koji podseća na način pakovanja jaja u zaštitne kartonske kutije (slika 2.8a-b). Primenom tehnike rasipanja X-zraka pod malim uglom (eng. *small angle X-ray scattering*, SAXS) dokazano je da se lanci nastalih dimera pri dovoljno visokim koncentracijama Ca^{2+} jona povezuju bočno obrazujući multimerne strukture u kojima su ovi lanci paralelno postavljeni jedni u odnosu na druge (slika 2.8c) (Stokke i sar., 1997).



Slika 2.7. Ca-alginatna hidrogel sferična čestica (snimljeno pomoću USB mikroskopa CY-800B, Chin Yi Enterprise Ltd, Kina)

Osobine Ca-alginatnih mikročestica zavise prvenstveno od strukture alginata iz kojih se dobijaju. Ovo se naročito odnosi na udeo manuronskih i guluronskih rezidua u

strukturi alginata, o čemu je već bilo reči (2.2.2). Takka i Acarturk su 1999. godine sprovedli istraživanje uticaja strukture alginata na osobine Ca-alginatnih mikročestica i potvrdili da alginati sa visokim sadržajem guluronske kiseline obrazuju rigidnije gelove sa izraženijim retencionim sposobnostima. Pored strukture i koncentracija polaznog rastvora alginata, kao i odnos koncentracije lekovite supstance i alginata imaju uticaj na brzinu kojom se inkapsulirana supstanca oslobađa iz mikročestica. Međutim, istraživanja sprovedena sa različitim model lekovitim supstancama dovela su do suprotnih zaključaka o uticaju odnosa lekovita supstanca/polimer, što dovodi do zaključka da i priroda lekovite supstance, odnosno njegoa molekulska masa i naelektrisanje imaju značajan uticaj na osobine Ca-alginatnih mikročestica (Kim i Lee, 1992; Acarturk i Takka, 1999).



Slika 2.8. Shematski prikaz strukture čvorišnih zona u Ca-alginatnim gelovima: a) položaj Ca^{2+} jona u šupljini koju obrazuje par guluronatnih ostataka u dva susedna lanca alginata; b) struktura dimera i c) lateralno povezani dimeri u multimernu strukturu hidrogela. Crni krugovi predstavljaju atome kiseonika koji su najverovatnije odgovorni za koordinaciju sa Ca^{2+} jonima. Prazni krugovi predstavljaju Ca^{2+} jone (Feng i sar., 2007).

Koncentracija kalcijumovih jona u medijumu za geliranje je jedan od parametara koji ima veliki uticaj na porozitet i stabilnost Ca-alginatnih mikročestica. Međutim, različita istraživanja ukazuju da uticaj koncentracije kalcijumovih jona na osobine Ca-alginatnih mikročestica zavisi od drugih formulacionih parametara, a naročito od koncentracije alginata (Acarturk i Takka, 1999). Stokke i sar. su 1997. godine

primenom SAXS metode pokazali da porast koncentracije kalcijumovih jona u odnosu na alginat ima za posledicu povećanje poroznosti mikročestica, dovodeći do ubrzanog oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance.

Najznačajnija svojstva Ca-alginatnih mikročestica važna za njihovu primenu u oblasti farmacije i biomedicine su netoksičnost, biokompatibilnost i biodegradabilnost. Osim toga, ove mikročestice se mogu dobiti relativno jednostavnim postupcima inkapsulacije, bez primene visokih temperatura, toksičnih i reaktivnih agenasa. Sve navedeno čini ih pogodnim nosačima za različite lekovite supstance, uključujući i proteine, enzime, gene, ćelije i dr.

Primenu Ca-alginatnih mikročestica u velikoj meri ograničava njihov porozitet, relativno slab retencioni kapacitet (Martinsen i sar., 1989) i njihova osetljivost na prisustvo tzv. sekvestrirajućih (fosfati, citrati, laktati) i negelirajućih (natrijum, magnezijum) jona koji se mogu naći u biološkom okruženju (Coppi i sar., 2001; Patel i sar., 2006; Chavari i sar., 2010). Mehanizam delovanja sekvestrirajućih jona uglavnom se objašnjava njihovim većim afinitetom za Ca^{2+} jone što dovodi do relaksacije lanaca alginata, ubrzanog bubrenja i oslobađanja inkapsulirane supstance (Dainty i sar. 1986).

2.3.2. Dobijanje Ca-alginatnih mikročestica

Generalno, postoje dva načina dobijanja Ca-alginatnih mikročestica, a to su: ukapavanje rastvora natrijum-alginata u rastvor koji sadrži kalcijumove jone (ekstruzija/eksterno geliranje) i oslobađanje kalcijumovih jona iz nerastvornih kalcijumovih soli dispergovanih u rastvoru natrijum-alginata (emulgovanje/interno geliranje). U slučaju ekstruzije, primenom različitih tehnika obezbeđuje se da kapljice rastvora natrijum-alginata budu mikrometarskih dimenzija i što pravilnijeg sferičnog oblika. Kod postupka emulgovanja mikrometarske dimenzije Ca-alginatnih hidrogel čestica se postižu tako što se disperzija nerastvorne kalcijumove soli u rastvoru natrijum-alginata emulguje u ulju (sa ili bez emulgatora tipa V/U). Na taj način dobija se emulzija tipa V/U čije kapljice unutrašnje faze mikrometarskih dimenzija nakon oslobađanja kalcijumovih jona iz nerastvornih soli obrazuju Ca-alginatne mikročestice.

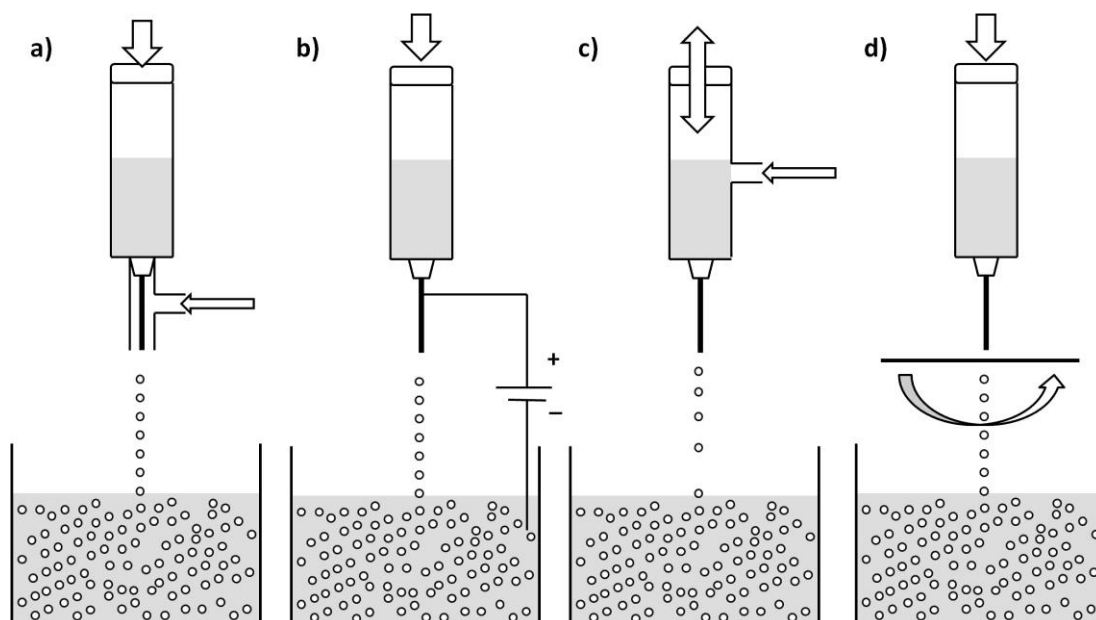
2.3.2.1. Ekstruzija/eksterno geliranje

Prilikom odabira postupka dobijanja kapljica rastvora natrijum-alginata koji će biti ukapavan u rastvor Ca^{2+} jona potrebno je voditi računa o veličini kapljica, distribuciji po veličini, pravilnosti oblika i kapacitetu proizvodnje koji je moguće postići primenom toga postupka (Prüsse i sar., 2008). Razlikuju se četiri tehnologije za dobijanje kapi mikrometarskih veličina (slika 2.9) (Ries i sar. 2006; Prüsse i sar., 2008; Tran i sar. 2011):

- Primena koaksijalnog protoka vazduha (eng. *coaxial air-flow enhanced dropping*). Ovaj postupak se zasniva na usmeravanju struje vazduha na vrh igle, što dovodi do odvajanja kapljica rastvora natrijum-alginata pre nego što kapljica dostigne kritičnu masu potrebnu da bi se spontano, pod dejstvom gravitacione sile, otkinule od vrha igle (slika 2.9a) (Vorlop i Klein, 1983). Podešavanjem dijametra igle i brzine protoka vazduha u koaksijalnom cilindru moguće je regulisati veličinu kapljica. Osnovna ograničenja ove metode su veličina čestica, čija se donja granica kreće do 200 μm i relativno mali kapacitet proizvodnje (Heinzen i sar., 2004).
- Primena elektrostatičkog polja (eng. *electrostatic enhanced dropping*). Ovaj postupak podrazumeva povezivanje igle i gelirajućeg medijuma na suprotno naelektrisane elektrode (slika 2.9b). Na taj način se između njih stvara električno polje, najčešće potencijala između 10 i 25 kV, koje dovodi do odvajanja kapljice od vrha igle. Podešavanjem dijametra igle i jačine električnog polja podešava se veličina kapljica, a time i nastalih mikročestica. Slično prethodnom postupku i ovde je osnovni nedostatak relativno mali proizvodni kapacitet (Heinzen i sar., 2004; Tran i sar., 2011).
- Primena vibracija. Vibracijama odgovarajuće talasne dužine moguće je razbiti laminarni mlaz u ujednačene mikrometarske kapljice (slika 2.9c). Podešavanjem dijametra igle i talasne dužine vibracija podešava se veličina kapljica. Prednosti ove tehnologije su zadovoljavajući kapacitet proizvodnje, reproduktivnost, izvodljivost u zatvorenim sistemima, sterilnim uslovima i relativno jednostavan *scale up*² (Heinzen

² Prenošenje procesa sa laboratorijskog na proizvodni nivo (razmeru)

i sar., 2004). Osnovni nedostatak je ograničenost na primenu za rastvore velikog viskoziteta (Prüsse i sar., 2008; Tran i sar., 2011).



Slika 2.9. Shematski prikaz uređaja za dobijanje Ca-alginatnih mikročestica ekstruzijom: a) uređaj sa koaksijalnim cilindrom; b) uređaj sa elektrostatičkim poljem; c) vibrirajući uređaj i d) JetCutter uređaj (preuzeto i prilagođeno iz Prüsse i sar., 2008; Tran i sar., 2011).

- Sečenje kapljica (eng. *jet-cutter technology*). Ovim postupkom se kapljice od mlaza odvajaju mehanički, njegovim presecanjem pomoću rotirajućeg nosača sa žicama/sečivima (slika 2.9d). Veličina ovako dobijenih kapljica zavisi prvenstveno od dijametra igle, brzine rotacije i karakteristika alata za sečenje (Prüsse i sar., 2000). Jedan od nedostataka ove metode je zaostajanje dela tečnosti koja se gelira na delovima uređaja za sečenje, usled njihovog direktnog međusobnog kontakta, što ima za posledicu gubitke koji se uobičajeno kreću između 1 i 5 % (Prüsse i sar., 2008; Tran i sar., 2011). Glavna prednost ove metode u odnosu na ostale, jeste veliki kapacitet proizvodnje koji iznosi i do jedan kilogram mikročestica za deset minuta (Prüsse i sar., 2008).

Najveći nedostaci ekstruzije, odnosno tehnike eksternog geliranja, su ograničeni kapacitet većine pomenutih metoda, ograničeno postizanje veličina mikročestica manjih od 200 μm sa prihvatljivom distribucijom veličine, problemi sa viskozitetom rastvora

alginata i čestom deformacijom oblika mikročestica, koje poprimaju oblik suze prilikom udara o površinu gelirajućeg medijuma.

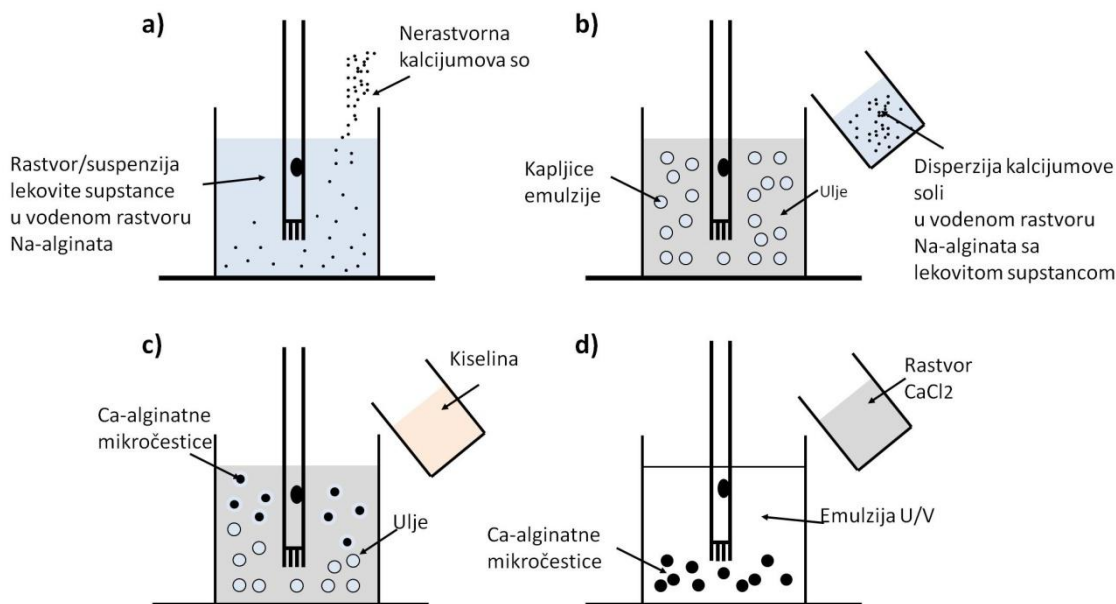
Osim pomenutih tehnika dobijanja Ca-alginatnih mikročestica eksternim geliranjem, u poslednjih deset godina sve češće koristi se i sušenje raspršivanjem. Postupak je zasnovan na raspršivanju/atomizaciji disperzije/rastvora lekovite supstance u rastvoru alginata u komori sa zagrejanim vazduhom. Nakon prikupljanja u separatoru, čestice se prenose uz mešanje u rastvor sa kalcijumovim jonima (Coppi i sar., 2001). Prednost ovakve metode ogleda se u mogućnosti industrijske proizvodnje, u zatvorenim sterilnim sistemima i postizanju veličine čestica ispod 10 μm (Coppi i sar., 2001; Benchabane i sar., 2007). Nedostaci su primena visokih temperatura ($\geq 150\text{ }^{\circ}\text{C}$) i ograničenje u pogledu viskoziteta rastvora alginata koji se koriste za inkapsulaciju.

2.3.2.2. Emulgovanje/interno geliranje

Zbog pomenutih ograničenja i nedostataka tehnika eksternog geliranja, početkom 80-ih godina prošlog veka razvijen je postupak internog geliranja/emulgovanja, a koji je usavršavan paralelno sa tehnikama eksternog geliranja (Reis i sar., 2006). Sam postupak, bez obzira na modifikaciju, odvija se u sledećim fazama (Poncelet i sar., 1999; Silva i sar., 2006):

- *Dispergovanje* nerastvorne kalcijumove soli (najčešće CaCO_3) u rastvoru/suspenziji alginata sa materijalom koji treba inkapsulirati (slika 2.10a).
- *Emulgovanje*. Nastala disperzija se uz mešanje dodaje u uljanu fazu (u kojoj je najčešće prisutan emulgator tipa V/U) kako bi se formirala emulzija tipa V/U (slika 2.10b).
- *Geliranje*. Nakon izrade homogene emulzije, inicira se postupak geliranja alginata oslobađanjem kalcijumovih jona iz nerastvornih soli dodatkom kiselina rastvornih u ulju, poput sirćetne kiseline (slika 2.10c).
- *Odvajanje mikročestica*. Po završetku geliranja, mikročestice se izdvajaju iz emulzije centrifugiranjem, kome često prethodi inverzija faza (obično dodatkom rastvora

kalcijum-hlorida, slika 2.10d). Nakon odvajanja, mikročestice se obično ispiraju vodom, etanolom ili vodenim rastvorom surfaktanta tipa V/U.



Slika 2.10. Shematski prikaz dobijanja Ca-alginatnih mikročestica postupkom emulgovanja (internog geliranja)

Osnovni faktori koji utiču na karakteristike mikročestica dobijenih ovim postupkom su vrsta i koncentracija alginata, kalcijumove soli i emulgatora, tip ulja, odnos uljane i vodene faze, vrsta i količina kiseline, brzina i način mešanja emulzije (Reis i sar., 2006).

Prednosti ove metode su relativno jednostavan *scale up*, mogućnost dobijanja mikročestica veličine od nekoliko mikrometara, pa čak i submikronskih veličina (Poncelet, 2001; Reis i sar., 2006).

Porozitet mikročestica dobijenih postupkom internog geliranja veći je nego kod mikročestica dobijenih eksternim geliranjem (Ries i sar., 2006), pa je i njihova sposobnost zadržavanja inkapsulirane lekovite supstance u jezgu znatno manja. Osim toga, određena količina supstance koja se inkapsulira može tokom postupka emulgovanja da pređe u spoljašnju, uljanu fazu, u zavisnosti od njene lipofilnosti/hidrofilnosti, čime se umanjuje efikasnost inkapsulacije. Ovoj pojavi još više doprinose neminovni gubici lekovite supstance do kojih dolazi prilikom izolovanja

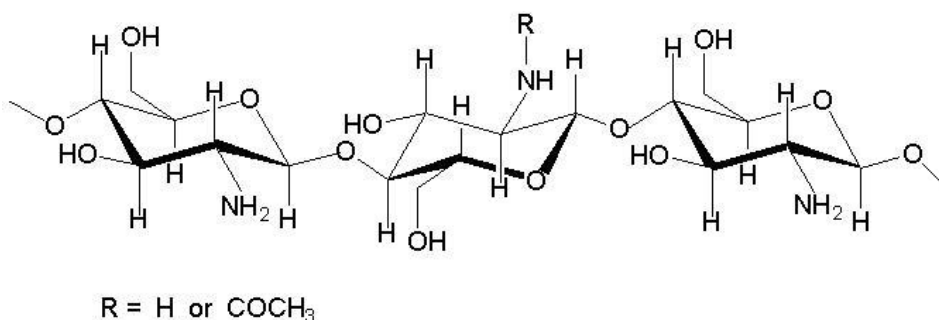
mikročestica i ispiranja u cilju uklanjanja ostataka ulja i surfaktanta (Vandenberg i Noue, 2001).

2.4. HITOZANI

2.4.1. Hemijska struktura hitozana

Hitozan je linearni, binarni heteropolisaharid koji se sastoji iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze povezanih β (1-4) glikozidnim vezama (Wong, 2009). Strukturna formula hitozana predstavljena je na slici 2.11. Ovaj polimer se dobija parcijalnom deacetilacijom hitina, linearnog homopolisaharida koji se sastoji iz jedinica N-acetil-D-glukozamina povezanih β (1-4) glikozidnim vezama (Shepherd i sar., 1997). Stepenn deacetilacije komercijalno dostupnih hitozana se najčešće kreće između 66 i 95 % (Agnihotri i sar., 2004).

Na osnovu molekulske mase hitozani se obično dele na hitozane male molekulske mase (< 150 kDa), hitozane srednje molekulske mase i hitozane velike molekulske mase (700 – 1000 kDa) (Wong, 2009). U poslednjih nekoliko godina sve veću pažnju privlače oligosaharidni hitozani molekulske mase < 50 kDa, koji se dobijaju postupkom hidrolize lanaca visokomolekularnih hitozana (Casettari i sar., 2012). Stepenn deacetilacije hitozana i njihova molekulska masa, osnovne su karakteristike koje je potrebno uzeti u obzir prilikom odabira hitozana za izradu nosača sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance.



Slika 2.11. Hemijska struktura hitozana

2.4.2. Osobine hitozana

2.4.2.1. Fizičko-hemijske osobine hitozana

U čvrstom stanju, hitozan je semikristalni polimer koji pokazuje polimorfizam (Rinaudo, 2006). Kao i većina polisaharida koji imaju izraženu sposobnost obrazovanja vodoničnih veza, hitozan se zagrevanjem razgrađuje pre nego što počne da se topi (Srinivasa i Tharanathan, 2007). Rastvorljivost hitozana u vodi strogo zavisi od njegove molekulske mase i stepena deacetilacije, pa su tako oligosaharidni hitozani molekulske mase 2 – 3 kDa lako rastvorni u vodi čak i pri neutralnoj pH vrednosti (Jeon i sar., 2000), dok su konvencionalni hitozani kao katjonski polisaharidi, čija se pK vrednost obično kreće u granicama od 6,2 do 7,0, praktično nerastvorni u vodi i fiziološkim uslovima (pH vrednost 7,4) i višim pH vrednostima (Illum, 1998; Wong, 2009). Dodatkom kiselina, odnosno snižavanjem pH vrednosti, povećava se rastvorljivost hitozana usled protonovanja slobodnih $-NH_2$ grupa na položaju C-2 glukozaminskih jedinica.

Stepen deacetilacije je u direktnoj vezi sa brojem slobodnih $-NH_2$ grupa, a time indirektno utiče i na rastvorljivost. Tako su hitozani sa stepenom deacetilacije oko 40 % rastvorljivi u vodenim medijumima pH vrednosti do 9,0, dok se hitozani stepena deacetilacije oko 85 % rastvaraju u medijumima pH vrednosti do 6,5 (Illum, 1998). Na rastvorljivost hitozana kao polielektrolita, prisustvo elektrolita, odnosno jonska jačina medijuma takođe ima veliki uticaj. U odsustvu stranih elektrolita, lanci hitozana su maksimalno izduženi usled repulzije pozitivno naelektrisanih grupa monomernih jedinica, dok se u prisustvu stranih elektrolita smanjuje ova repulzija, dolazi do uvijanja lanaca hitozana i efekta isoljavanja, odnosno taloženja hitozana (Illum, 1998; Singla i Chawla, 2001).

Viskozitet rastvora hitozana je takođe bitna osobina koju je neophodno razmotriti pre njegove upotrebe u biomedicinske svrhe, uključujući i postupak mikroinkapsulacije. Viskozitet rastvora hitozana određuju, pored koncentracije hitozana, njegova molekulska masa, jonska jačina, pH vrednost i temperatura rastvora. Sa porastom molekulske mase hitozana raste i viskozitet njegovih rastvora, pa je pored dobre rastvorljivosti u vodi, i nizak viskozitet još jedna prednost oligosaharidnih

hitozana u odnosu na hitozane velike molekulske mase (Jeon i sar., 2000). Do porasta viskoziteta rastvora hitozana dolazi povećanjem koncentracije rastvora, ali i sa porastom stepena deacetilacije. Kao što je ranije pomenuto, sa povećanjem stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa, što dovodi do konformacionih promena, odnosno istežanja lanaca polimera usled repulzije protonovanih $-NH_2$ grupa, a time i porasta viskoziteta (Illum, 1998). Sa druge strane, povećanje temperature i pH vrednosti rastvora dovode do smanjenja njegovog viskoziteta (Singla i Chawla, 2001; Wong, 2009).

Zahvaljujući prisustvu slobodnih $-NH_2$ grupa hitozan poseduje izraženu sposobnost kompleksiranja sa jonima metala. Sposobnost kompleksiranja jona metala zavisi od fizičkog stanja hitozana, stepena deacetilacije, rasporeda slobodnih $-NH_2$ grupa, pH vrednosti okolnog medijuma, vrste i sadržaja katjona (Wong, 2009). S obzirom da su u mehanizam kompleksiranja uključene $-NH_2$ grupe, sposobnost kompleksiranja jona metala raste sa porastom slobodnih $-NH_2$ grupa, odnosno sa porastom stepena deacetilacije. Oligosaharidni hitozani koji u svom sastavu imaju najmanje 6 monomernih ostataka takođe poseduju ovo svojstvo. Afinitet hitozana za dvo- i trovalentne jone metala iz njihovih hloridnih soli opada prema sledećem rasporedu $Cu^{2+} \gg Hg^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} \sim Ca^{2+} > Nd^{3+} > Cr^{3+} \sim Pr^{3+}$ (Rinaudo, 2006).

Kao polielektrolit, hitozan može da stupa u elektrostatičku interakciju sa suprotno naelektrisanim jedinjenjima, poput surfaktanata (npr. natrijum-dodecilsulfat) gradeći elektrostatičke komplekse (Thongngam, 2004). I ovo svojstvo je direktno u vezi sa postojanjem slobodnih $-NH_2$ grupa, koje u zavisnosti od pH vrednosti mogu biti protonovane u većoj ili manjoj meri. Hitozan se, dakle, može posmatrati kao polikatjon koji ima sposobnost da stupa u interakciju sa negativno naelektrisanim površinski aktivnim supstancama, ali što je još značajnije i sa polianjonima poput karboksimetilceluloze, pektina, heparina, ksantana, karagena, hijalouronana, dekstran-sulfata, hondroitin-sulfata i alginata (Kubota i Kikuchi, 1998; Vasiliu i sar., 2005, Rinaudo, 2006; Wong, 2009). O prirodi i uslovima nastanka polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan više reči biće u poglavlju 2.5.

2.4.2.2. Biološka svojstva hitozana

Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer prirodnog porekla. U njegovoj razradnji u organizmu učestvuju enzimi poput lizozima, di-N-acetilhitobiazaze, N-acetil- β -D-glukozaminidaze i hitiotrizidaze koji su prisutni u mukoznim i drugim fiziološkim tečnostima (Garcia-Fuentes i Alonso, 2012), pri čemu brzina degradacije hitozana *in vivo* raste sa porastom stepena deacetilacije (Kofuji i sar., 2005). Postoje i podaci o tome da hitozan i njegovi degradacioni proizvodi mogu da izazovu aktivaciju humanih makrofaga i proliferaciju limfocita, ali bez prateće zapaljenjske reakcije (Garcia-Fuentes i Alonso, 2012). Sa aspekta bezbednosti primene hitozan se smatra generalno netoksičnim polimerom sa $LD_{50} > 16$ g/kg telesne mase miša nakon peroralnog unošenja, što je, poređenja radi, veća vrednost nego za saharozu (Rowe i sar., 2009; Wong 2009; Garcia-Fuentes i Alonso, 2012). Ne dovodi do iritacije kože, čak ni oštećene, niti izaziva alergijske reakcije (Dodane i Vilivalam, 1998; Rowe i sar., 2009).

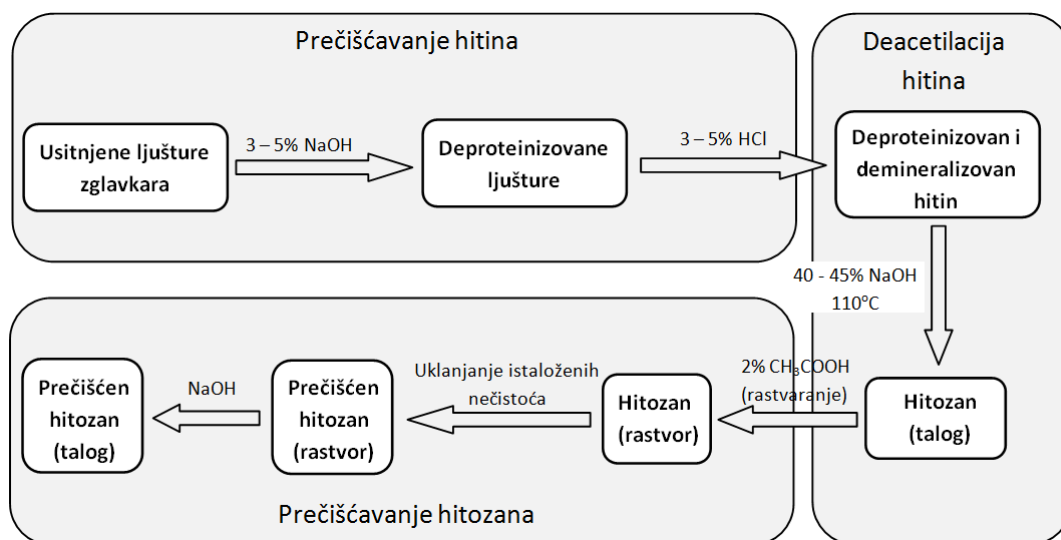
Najznačajnije biološko svojstvo hitozana je njegova mukoadhezivnost. Zahvaljujući polikatjonskoj prirodi, hitozan je u kiseljoj sredini pozitivno naelektrisan i u tom obliku stupa u interakciju sa negativno naelektrisanim mukoznim membranama. Sa porastom stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa koje mogu biti protonovane, a time i mukoadhezivnost hitozana. Molekulska masa takođe ima uticaj na mukoadhezivna svojstva hitozana, pa je tako kod hitozana veće molekulske mase (oko 1400 kDa) ova sposobnost izraženija u odnosu na hitozane male molekulske mase (500 do 800 kDa) (Dodane i Vilivalam, 1998). Ovo se može objasniti gore opisanim uticajem molekulske mase na viskozitet, jer hitozani veće molekulske mase obrazuju viskoznije rastvore koji bolje adheriraju na mukozi i imaju duže vreme zadržavanja.

Pored navedenih, hitozan poseduje i druga biološka svojstva, poput antibakterijske, antivirusne i fungicidne aktivnosti (Chen i sar., 2002; Kim i Rajapkse, 2005), sposobnost da vezuje toksične jone metala, koagulacionu sposobnost, imunostimulišuće dejstvo (Chatelet i sar., 2001; Agnihotri i sar., 2004), a potvrđeno je njegovo antiulcerogeno (Hillyard i sar., 1964) i antitumorsko delovanje (Sirica i Woodman, 1971; Ouchi i sar., 1991; Qin i sar., 2002).

2.4.3. Dobijanje hitozana

Hitozan se dobija iz hitina, drugog polisaharida po zastupljenosti u prirodi, odmah iza celuloze. Kao polazna sirovina za komercijalno dostupne hitozane koriste se ljuštore zglavkara, najčešće rakova i kraba. Postupak dobijanja hitozana predstavljen je na slici 2.12.

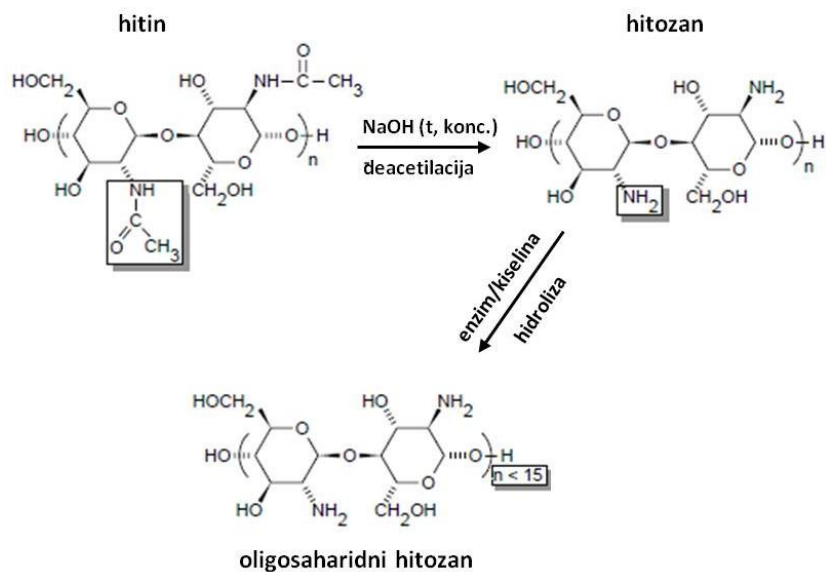
U prvoj fazi proizvodnje ljuštore se usitnjavaju, zatim se dodatkom baza uklanjaju proteini, a dodatkom kiselina i minerali poput kalcijum-karbonata i kalcijum-fosfata. Kao baza za uklanjanje proteina koristi se natrijum hidroksid u koncentraciji od 3 do 5 % (m/m). Deproteinizovanim ostacima ljuštura dodaje se 3 – 5 % (m/m) vodeni rastvor hlorovodonične kiseline, koja ujedno taloži hitin. Hitin se suši, a nakon toga vrši se njegova deacetilacija dodatkom 40 – 45 % (m/m) vodenog rastvora natrijum-hidroksida pri temperaturi od 110 °C. Nastali talog ispira se vodom, a zatim rastvara u 2 % (m/m) sirćetnoj kiselini. Nerastvorne nečistoće se uklanjaju, a supernatant se neutrališe dodatkom natrijum-hidroksida nakon čega dolazi do taloženja hitozana. Hitozan se potom skuplja i usitnjava da se dobije fin, uniforman prah ili granule. S obzirom da se za dobijanje hitozana koriste sirovine životinjskog porekla neophodno je voditi računa da se eventualno prisutni infektivni agensi i pirogeni tokom postupka proizvodnje uklone ili unište (Rowe i sar., 2009).



Slika 2.12. Shematski prikaz postupka dobijanja hitozana

Osim opisanog postupka koji se široko primenjuje za dobijanje hitozana iz ljuštura zglavkara, postoje istraživanja koja otkrivaju prednosti korišćenja drugih sirovina, poput ostataka lignji. Njihova prednost ogleda se u tome, što su one sporedni proizvod u postupku čišćenja lignji, pa su jeftina sirovina za dobijanje hitozana. Pored toga, one sadrže izuzetno male količine kalcijuma, što znači da je postupak uklanjanja kalcijuma iz ove sirovine praktično suvišan i skraćuje postupak dobijanja hitozana. Takođe, tokom postupka uklanjanja kalcijuma dodaje se kiselina koja u izvesnoj meri dovodi do kisele hidrolize hitina čime se smanjuje prinos konačnog proizvoda (Shepherd i sar., 1997).

Oligosaharidni hitozani se iz hitozana velikih molekulskih masa dobijaju kontrolisanim postupcima enzimske ili kisele (hemijske) hidrolize (slika 2.13), odnosno enzimskim ili hemijskim procesima cepanja $\beta(1-4)$ glikozidnih veza između monomernih jedinica N-acetil-D-glukozamina (Ilina i Varlamov, 2004; Kim i Rajapakse, 2005; Yin i sar., 2009). Enzimi koji se koriste u postupku dobijanja oligosaharidnog hitozana nazivaju se hitozanaze, a najčešće su bakterijskog (Lee i sar., 1996) i gljivičnog porekla (Kim i sar., 1998). Postupak dobijanja oligosaharidnog hitozana hemijskom hidrolizom danas se koristi više od enzimskog za komercijalnu proizvodnju, zbog njegove niže cene. Međutim, nedostaci ovog postupka su mogućnost nastanka toksičnih sporednih proizvoda, nizak prinos i veći rizik povezan sa zagađenjem životne sredine. Upravo zbog toga, naponi istraživača su u poslednjih nekoliko godina usmereni ka unapređenju i pojednostavljenju enzimskog postupka dobijanja oligosaharidnog hitozana (Kim i Rajapakse, 2005). Osim pomenutih metoda za dobijanje oligosaharidnih hitozana koriste se postupci oksidativne degradacije (Shirui i sar., 2004), ultrasonikacije (Chen i sar., 2000), a postoji mogućnost kombinovanja navedenih postupaka (Samain i sar., 1997).



Slika 2.13. Shematski prikaz strukture i postupka dobijanja oligosaharidnog hitozana

2.4.4. Biomedicinska primena hitozana

Zahvaljujući jedinstvenoj polimernoj strukturi, katjonskoj prirodi i biokompatibilnosti hitozan se široko koristi u kozmetičkoj, tekstilnoj, prehrambenoj industriji, poljoprivredi i za prečišćavanje otpadnih voda, a u toku su brojna istraživanja mogućnosti njegove primene u oblasti biomedicine (Rinaudo, 2006; Rowe i sar., 2009, Yin i sar., 2010). Naročito veliku pažnju istraživača hitozan privlači kao ekscipijens za izradu savremenih nosača lekova, namenjenih za različite puteve/načine primene. Neki od primera potencijalne primene hitozana u oblasti medicine prikazani su u tabeli 2.4.

Hitozan se pokazao kao efikasno sredstvo za raspadanje i vezivanje u tabletama (Illum, 1998). Mešanjem hitozana sa nekim slabo rastvornim lekovitim supstancama moguće je postići povećanje brzine rastvaranja (Sawayanagi i sar., 1982), a otkriveno je da hitozan poboljšava transmukoznu resorpciju malih polarnih molekula, proteina i peptida (Illum i sar., 1994).

Kao polikation, hitozan može stupiti u interakciju sa negativno naelektrisanim DNK molekulima, pa se koristi za izradu nanometarskih (50 – 100 nm) terapijskih sistema za ciljanu isporuku plazmida (Iqbai i sar., 2003).

Tabela 2.4. Mogućnosti primene hitozana u biomedicini i karakteristike hitozana na kojima su one zasnovane (preuzeto i prilagođeno iz Khor i Lim, 2003; Rinaudo, 2006)

Potencijalna biomedicinska primena	Karakteristike na kojima se primena zasniva
Ortopedska i periodontalna primena	Biodegradabilnost, mogućnost izrade matriksa/filmova sa hidroksiapatitom
Tkivno inženjerstvo	Gradenje poroznih, biodegradabilnih matriksa pogodnih za rast ćelija
Kontaktne sočiva	Hidratacija
Zavoji	Hemostatičko i antiinflamatorno dejstvo, aktivacija makrofaga, proliferacija ćelija, stimulacija obnavljanja tkiva, bakteriostatsko i fungistatsko dejstvo
Hirurški konci	Biokompatibilnost, biodegradabilnost
Nosači lekovite supstance	Biokompatibilnost, biodegradabilnost, mukoadhezivnost, sposobnost obrazovanja gelova, polikatjonska priroda, antimikrobno dejstvo i dr.

Slaba rastvorljivost hitozana pri pH vrednostima iznad njegove pKa osnovni je faktor koji otežava primenu hitozana, naročito kada se koristi sa ciljem poboljšanja resorpcije lekova preko mukoznih membrana. Poslednjih nekoliko godina sve više se ispituje mogućnost hemijske derivatizacije hitozana, u cilju poboljšanja njegove rastvorljivosti. Ovi pokušaji su zasnovani na hemijskim izmenama na mestu –OH i –NH₂ grupa, a najčešći su sulfonovanje, kvarternerizacija, karboksimetilacija, N– i O–hidroksilacija. Pored navedenog, u oblasti biomedicine sve više se ispituje mogućnost primene kopolimera hitozana sa mlečnom kiselinom, polietilenglikolima, poliakrilnom kiselinom, vinilpirolidonom, 3-O-dodecil-D-glukozom i N-izopropilakrilamidom (Casettari i sar., 2012).

Hitozan i njegovi derivati, poput hitozanacetata, koriste se za izradu zavoja i proizvoda namenjenih za ubrzano zarastanje rana (Jayakumar i sar., 2011). Potvrđeno je da filmovi hitozanacetata pokazuju dobru propustljivost za kiseonik, imaju dobru upijajuću moć, a sporo se razgrađuju pod dejstvom enzima lizozoma, pa ih nije potrebno često menjati (Illum, 1998). Hitozan nakon peroralne primene umanjuje apsorpciju masti, pa se široko koristi u dijetetskim preparatima (Garcia-Fuentes i Alonso, 2012).

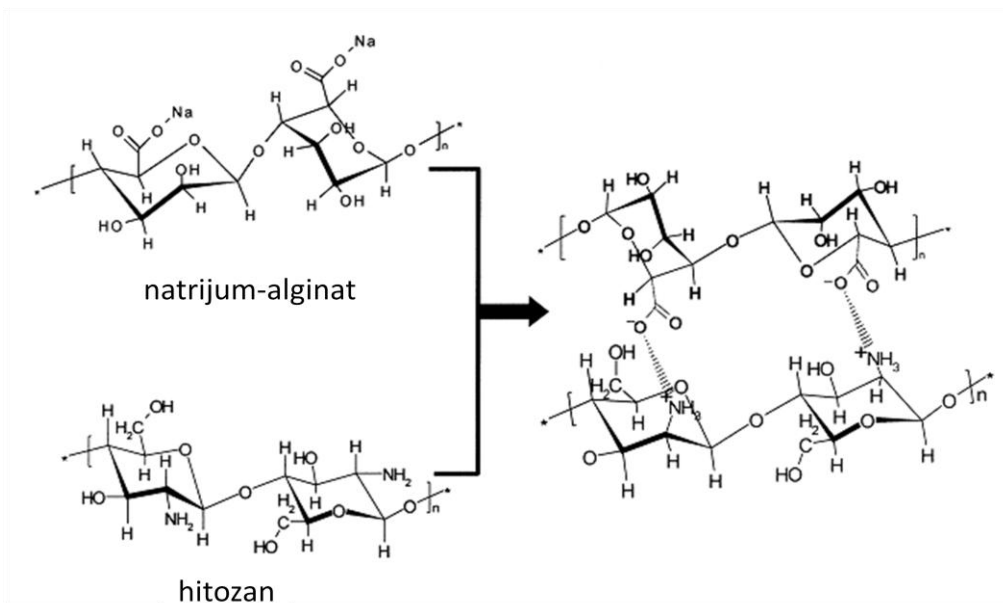
Tabela 2.5. Potencijalna primena hitozana u farmaciji (preuzeto i prilagođeno iz Dodane i Vilivalam, 1998)

Način primene	Nosač/farmaceutski oblik
Oralno	Mikročestice Nanočestice Liposomi Bukalni diskovi Rastvor Vezikule Filmovi (obloge) Tablete Čestice sušene raspršivanjem Kapsule
Parenteralno	Mikročestice Nanočestice Rastvor
Nazalno	Rastvor
Oftalmološki	Suspenzija
Ostalo	Gelovi

2.5. ALGINAT-HITOZAN MIKROČESTICE

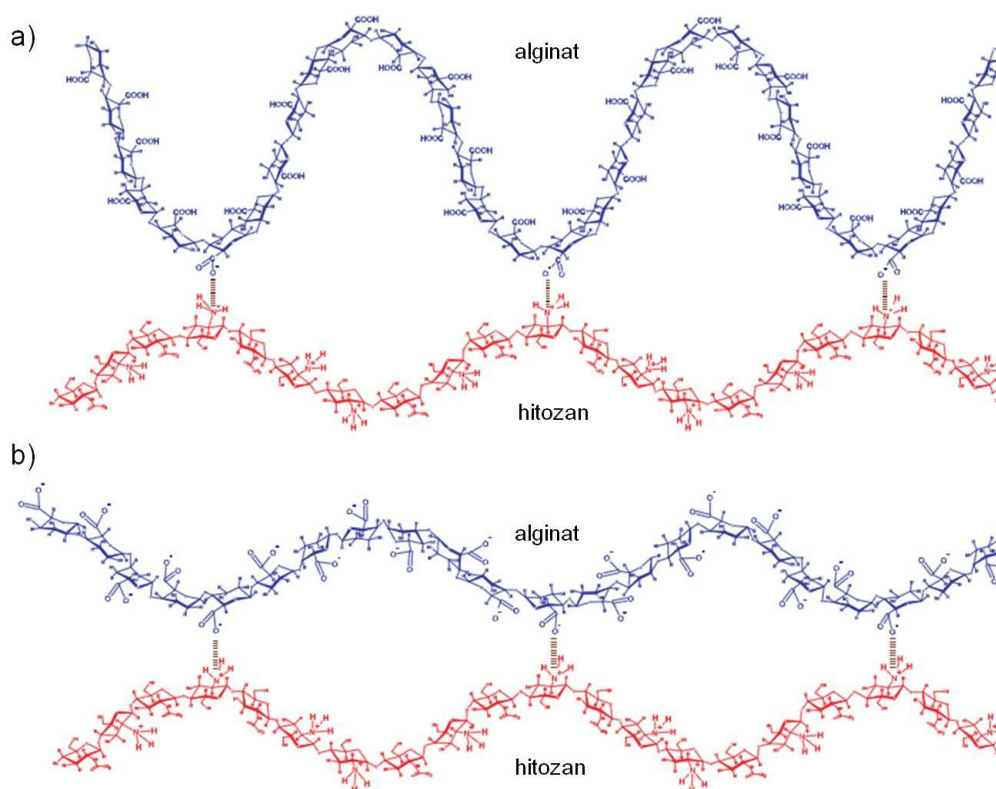
2.5.1. Osobine polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan

Zahvaljujući svojoj jedinstvenoj polikatjonskoj strukturi hitozan u protonovanoj formi ima sposobnost da stupa u interakciju sa polianjonima gradeći tzv. polielektrolitne komplekse (Rinaudo, 2006; Liouni i sar., 2008). Na ovoj osobini hitozana zasniva se mogućnost njegove primene za umrežavanje i ojačavanje strukture poroznih Ca-alginatnih hidrogelova. Polielektrolitni kompleks alginat-hitozan nastaje kao rezultat elektrostatičkog privlačenja pozitivno naelektrisanih $-\text{NH}_3^+$ jona hitozana sa negativno naelektrisanim $-\text{COO}^-$ jonima alginata (slika 2.14), a najverovatnije u dodatnoj stabilizaciji učestvuju vodonične i Wan der Waalsove veze (Sankalia i sar., 2007).



Slika 2.14. Shematski prikaz interakcije alginata i hitozana u strukturi polielektrolitnog kompleksa

Uzimajući u obzir da je građenje kompleksa alginat-hitozan zasnovano na elektrostatičkom privlačenju dva suprotno naelektrisana elektrolita, odnosno slabe kiseline i slabe baze, pH vrednost reakcionog medijuma od ključnog je značaja za njegovo formiranje. Izuzetno niske pH vrednosti reakcionog medijuma imaju za posledicu potpuno protonovanje $-NH_2$ grupa hitozana, ali u protonovanoj formi se nalaze i $-COOH$ grupe alginata, pa u takvoj sredini ne postoje uslovi za formiranje kompleksa alginat-hitozan. Sa druge strane, pri visokim pH vrednostima $-COOH$ grupe alginata se nalaze u formi $-COO^-$ jona, ali se i $-NH_2$ grupe hitozana nalaze u svom osnovnom, deprotonovanom obliku. Opseg pH vrednosti koje su optimalne za formiranje polielektrolitnog kompleksa zavisi od strukture i osobina alginata i hitozana koji stupaju u interakciju, a nalazi se između pKa vrednosti hitozana i alginata. Ranija istraživanja ukazuju da se optimalna pH vrednost za formiranje polielektrolitnog kompleksa između ova dva polimera kreće u opsegu između 5 i 6 (Chellat i sar, 2000; Chellat i sar., 2000; Douglas i Tabrizian, 2005). Shematski prikaz uticaja pH vrednosti reakcionog medijuma na alginat-hitozan interakciju prikazan je na slici 2.15.



Slika 2.15. Shematski prikaz uticaja pH vrednosti na interakciju alginata i hitozana: a) pH vrednost 2,0; b) pH vrednost 6,8 (preuzeto iz Sankalia i sar., 2007)

Najznačajnija osobina hitozana koja ima uticaj na formiranje i svojstva polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan je njegov stepen deacetilacije (Lee i sar., 1997). Stepenn deacetilacije je srazmeran broju slobodnih $-NH_2$ grupa hitozana. Odnosno, što je vrednost stepena deacetilacije veća, veći je broj grupa koje u protonovanoj formi mogu stupati u interakciju sa lancima alginata. Drugim rečima, veće je ukupno pozitivno naelektrisanje, a pozitivno naelektrisane grupe su gušće raspoređene, te su jače i sile koje dovode do nastanka i očuvanja polielektrolitnog kompleksa. U skladu sa navedenim, može se pretpostaviti da stepen deacetilacije može imati uticaj na bazna svojstva hitozana. Međutim, Strand i sar. su 2001. godine pokazali da se pKa hitozana ne menja bitno sa promenom stepena deacetilacije, pa se tako za hitozane stepena deacetilacije od 1 do 49 % pKa vrednost kreće u opsegu od 6,5 do 6,6. Analogno baznim svojstvima hitozana, kisela svojstva alginata od značaja su za brzinu nastanka i svojstva polielektrolitnog kompleksa. Ona mogu da variraju u zavisnosti od sastava, odnosno udela ostataka manuronske i guluronske kiseline čije pKa vrednosti iznose 3,38 i 3,65, redom (Haug, 1964; Sankalia i sar., 2007).

Osim stepena deacetilacije hitozana, molekulske mase oba polimera su od značaja za nastanak i osobine polielektrolitnog kompleksa (Douglas i Tabrizian, 2005; Sankalia i sar., 2007; Saether i sar., 2008). Rezultati studije koju su sprovedi Douglas i Tabrizian 2005. godine, pokazali su da se smanjenjem molekulske mase oba polimera značajno smanjuje veličina nastalih kompleksnih čestica, ali je uticaj molekulske mase hitozana na veličinu kompleksnih čestica alginat-hitozan veći nego uticaj molekulske mase alginata. Ovo je moguće objasniti lakoćom kojom manji molekuli hitozana prodiru dublje u unutrašnjost kompleksa formirajući manje, homogenije čestice, dok se veliki molekuli zadržavaju uglavnom na površini, gde formiraju polielektrolitnu membranu povećavajući veličinu čestica (Quong i Neufeld, 1998). Do sličnog zaključka su došli Yan i sar. 2001. godine ispitujući polielektrolitne filmove alginat-hitozan dobijenih od hitozana različitih molekulskih masa. Pomenuti istraživači su pokazali da hitozani manje molekulske mase lakše stupaju u interakciju sa alginatom nego hitozani velike molekulske mase.

Stabilnost polielektrolitnog kompleksa, kao i njegovo formiranje, u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sredine u kojoj se nalazi. Generalno, alginat-hitozan kompleks je stabilan u opsegu pH vrednosti između 3,0 i 6,4. Međutim, kada se pH vrednost poveća iznad ove vrednosti naglo raste veličina kompleksa i u uskom intervalu pH vrednosti između 6,4 i 7,0 njihova veličina se povećava oko 50 puta (Saether i sar., 2008). U ovom intervalu se nalazi pKa vrednost hitozana i kada je $\text{pH} > \text{pKa}$ dolazi do nagle destabilizacije kompleksa, usled deprotonovanja $-\text{NH}_2$ grupa, a time i slabljenja interakcije između dva polimera. Iz ovoga se može zaključiti da je polielektrolitni kompleks pH osetljiv, i to tako da je pogodan za oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance u donjim delovima GIT-a, što nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL) čini odličnim kandidatima za inkapsulaciju u mrežu ovog kompleksa. Studije stabilnosti pokazale su da ovaj polielektrolitni kompleks ima zadovoljavajuću stabilnost na sobnoj i nižim temperaturama, dok se na temperaturi od 45 °C brzo javljaju znaci nestabilnosti (Saether i sar., 2008).

2.5.2. Dobijanje alginat-hitozan mikročestica

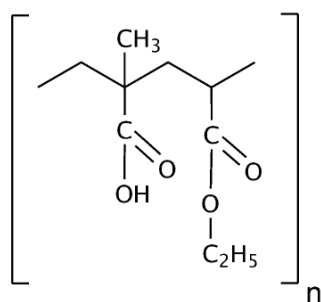
Izrada Ca-alginatnih mikročestica ojačanih hitozanom (u daljem tekstu alginat-hitozan mikročestice) zasnovana je na dva različita fenomena: jonotropnom geliranju (nastanak poroznog hidrogela Ca-alginata) i polielektrolitnom kompleksiranju (reakcija građenja polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan). U zavisnosti od toga da li se ova dva fenomena odvijaju istovremeno ili odvojeno, razlikuju se *jednostepeni* ili *dvostepeni* postupak izrade alginat-hitozan mikročestica.

Tokom jednostepenog postupka reakcije jonotropnog geliranja i polielektrolitnog kompleksiranja odvijaju se istovremeno. Odnosno, ako se alginat-hitozan mikročestice izrađuju metodom ekstruzije, rastvor natrijum-alginata se ukapava u rastvor koji sadrži rastvornu kalcijumovu so i hitozan (Cekic i sar., 2007). Da bi došlo do reakcije građenja polielektrolitnog kompleksa paralelno sa procesom formiranja Ca-alginatnog hidrogela, neophodno je obezbediti da pH reakcionog medijuma ima vrednost između pKa vrednosti alginata i hitozana, a optimalno između 5 i 6 (Chellat i sar., 2000; Douglas i Tabrizian, 2005). Stoga se rastvoru hitozana i kalcijumove soli dodaje pufer, najčešće acetatni. Ukoliko se primenjuje postupak emulgovanja, jednostepeni postupak je zasnovan na dodatku u ulju emulgovanog rastvora hitozana u emulziju, odmah nakon rastvaranja kalcijumove soli, tj. dodatka kiseline (Ribeiro i sar., 2005).

Tokom dvostepenog postupka izrade alginat-hitozan mikročestica prvo se odvija reakcija jonotropnog geliranja, a nakon toga, u odvojenom procesu reakcija polielektrolitnog kompleksiranja. Preciznije, ako se primenjuje postupak ekstruzije, u prvoj fazi izrađuju se Ca-alginatne mikročestice ukapavanjem rastvora alginata u rastvor kalcijumove soli, dok se u drugoj fazi Ca-alginatne mikročestice prenose u rastvor hitozana (Cekic i sar., 2007). Kao i kod jednostepenog postupka, da bi formiranje polielektrolitnog kompleksa bilo moguće, neophodno je podesiti pH vrednost u opsegu između 5,0 i 6,0. Ukoliko se primenjuje postupak emulgovanja, Ca-alginatne mikročestice se nakon izdvajanja iz emulzije (2.3.2.2) prenose u rastvor hitozana pH vrednosti istog opsega kao i kod postupka ekstruzije (Ribeiro i sar., 2005).

2.6. EUDRAGIT[®] L 100-55

Eudragit[®] L 100-55 je zaštićeni naziv za kopolimer metakrilne kiseline i etilakrilata, u odnosu 1:1 (slika 2.16). Sintetskog je porekla, a njegova prosečna molekulska masa iznosi 320 kDa (Evonik, 2011). To je prašak bele boje, karakterističnog mirisa koji kao slaba kiselina pokazuje pH zavisnu rastvorljivost. Nerastvoran je u kiseloj sredini, a rastvara se u vodi pri pH vrednosti većoj od 5,5, obrazujući bistre do blago zamućene rastvore (De Jaeghere i sar., 2001; Evonik, 2011). S obzirom na ovu pH zavisnu rastvorljivost Eudragit[®] L 100-55 je pogodan polimer za izradu gastrozistentnih nosača lekovitih supstanci.



Slika 2.16. Hemijska struktura Eudragit[®]-a L 100-55

2.6.1. Polielektrolitni kompleks hitozan-Eudragit[®] L 100-55

Kao i alginati, anjonski kopolimeri metakrilne kiseline i metakrilata sa slobodnim –COOH grupama imaju mogućnost da u odgovarajućem opsegu pH vrednosti stupaju u elektrostatičku interakciju sa hitozanima obrazujući polielektrolitne komplekse. Mogućnost primene polielektrolitnih kompleksa na bazi hitozana i Eudragit[®]-a za razvoj pH osetljivih nosača lekovitih supstanci je relativno slabo opisana u literaturi. Ovakva istraživanja se javljaju tek u poslednjih nekoliko godina, a ograničena su na konvencionalne hitozane relativno velikih molekulskih masa (od nekoliko desetina do nekoliko stotina kDa). Ono što se može istaći kao prednost ovih polielektrolitnih kompleksa, osim njihove pH osetljivosti, jeste mogućnost njihovog dobijanja relativno jednostavnim postupcima, bez primene hemijskih umreživača i organskih rastvarača (Moustafine i sar., 2008; Jelvehgari i sar., 2010). Jelvehgari i sar. su 2010. godine proučavali uticaj molekulske mase hitozana (40 – 850 kDa) na osobine hitozan-

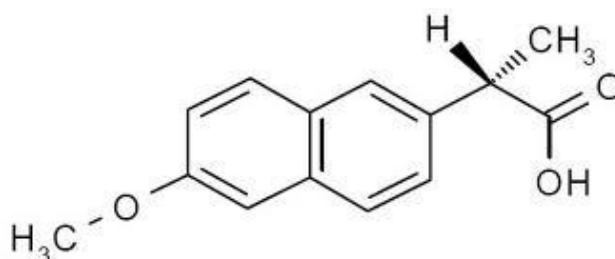
Eudragit[®] L 100-55 nanočestica i zaključili da ona ima značajan uticaj na brzinu oslobađanja inkapsuliranog insulina. Sa smanjenjem molekulske mase hitozana opadala je brzina oslobađanja insulina iz nanočestica u uslovima sličnim onima u GIT-u. Na osnovu navedenog moguće je pretpostaviti da bi oligomeri hitozana, odnosno njihovi kompleksi sa Eudragit[®]-om L 100-55 mogli biti upotrebljeni za postizanje usporenog oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance iz mikročestica na bazi ovih polimera.

2.7. NAPROKSEN

Naproksen (Ph. Jug. V, Ph. Eur. 7, USP 31).

Hemijski naziv: (*S*)-2-(6-metoksinaft-2-il)propionske kiseline (slika 2.17)

Empirijska formula: C₁₄H₁₄O₃



Slika 2.17. Hemijska struktura naproksena

Molekulska masa: 230,3

Osobine: Beli ili skoro beli, kristalan prašak, gotovo nerastvorljiv u vodi, umereno rastvorljiv u alkoholu i metanolu, slabo rastvorljiv u etru.

Temperatura topljenja: od 154 °C do 158 °C.

Naproksen spada u NSAIL čije se antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko dejstvo dovodi u vezu sa primarnim inhibitornim dejstvom na arahidonsku ciklooksigenazu i time inhibiciju sinteze prostaglandina i tromboksana (medijatori inflamacije). Hemijski spada u istu grupu NSAIL kao i ibuprofen (derivati propionske kiseline), ali je potentniji i pokazuje srednje izražen rizik od neželjenih efekata (Rang i sar., 2005).

Naproksen se koristi u lečenju ankiloznog spondilitisa, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, uključujući juvenilni idiopatski artritis. Takođe se koristi u terapiji dismenoreje, glavobolja, uključujući migrenu, postoperativnog bola, poremećaja mekih tkiva, akutnog gihta i za snižavanje povišene telesne temperature (Sweetsman, 2009).

Neželjeni efekti naproksena, kao i većine NSAIL, dovode se u vezu sa njihovim neselektivnim delovanjem na enzim ciklooksigenazu. Osim što inhibira enzim ciklooksigenazu-2 koja je indukovana u zapaljenjskim ćelijama i odgovorna za stvaranje medijatora zapaljenja, on inhibira i enzim ciklooksigenazu-1, koji je kao konstitutivni enzim uključen u održavanje homeostaze i ima ulogu "kućepazitelja". Ovaj enzim je odgovoran za sintezu prostaglandina koji normalno inhibiraju sekreciju želudačne kiseline, a takođe ispoljavaju protektivno dejstvo na sluzokožu GIT-a. Otuda proizilaze gastrointestinalni poremećaji koji se javljaju nakon primene ovog leka, a koji se kreću od blagih oblika dispepsije do želudačnih krvarenja (Rang i sar., 2005).

Iako je glavni mehanizam oštećenja sluzokože GIT-a posredovan suzbijanjem endogene sinteze prostaglandina, ovaj neželjeni efekat naproksena je dodatno pojačan lokalnim iritirajućim efektom naproksena (Soil i sar., 1989; Bjorkman, 1996; Masghoodi, 2009). Upravo zbog toga, nakon *per os* primene određeni NSAIL su štetniji po sluzokožu GIT-a nego nakon parenteralne primene (Cioli i sar, 1979; Beck i sar., 1990).

U cilju ublažavanja neželjenog delovanja neselektivnih NSAIL na sluzokožu GIT-a, nakon njihove primene *per os*, ovi lekovi se inkorporiraju u gastrorezistentne/enterosolventne dozirane oblike. Iako su gastrorezistentne tablete sa naproksenom komercijalno dostupne (npr. EC-NaprosynTM), inkorporiranjem ovog NSAIL u višečestične nosače lekova mikrometarskih dimenzija može se postići nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne, monolitne nosače. Neke od njih su: a) dobra reproduktivnost transporta kroz GIT, zahvaljujući mogućnosti prolaska kroz zatvoren pilorični sfinkter (čime se smanjuju inter- i intraindividualne varijacije u pogledu vremena zadržavanja u želucu, i uopšte skraćuje vreme boravka u želucu, a time smanjuje lokalna iritacija), b) smanjenje lokalne iritacije sluzokože GIT-a usled prostiranja leka na većoj ukupnoj površini u odnosu na veće, monolitne dozirane oblike

(Eskilson, 1985; Kramer i Blume, 1994; Iruin i sar., 2005; Tang i sar., 2005; Dey i sar., 2008; Masghoodi, 2009).

S obzirom da je naproksen fotosenzitivan (King, 2009), inkapsulacijom ove lekovite supstance u adekvatne mikročestične nosače moguće je, pored navedenog, obezbediti njenu efikasnu zaštitu od dejstva svetlosti.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja rada je ispitivanje funkcionalnosti hitozana različitih molekulskih masa u formulaciji hitozan-Ca-alginatnih mikročestica sa aspekta veličine, morfoloških karakteristika, efikasnosti inkapsulacije i sadržaja naproksena kao model lekovite supstance. Posebno je istražena mogućnost formiranja polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan u unutrašnjoj strukturi mikročestica i većeg stepena kontrole mehanizama oslobađanja model lekovite supstance u odnosu na Ca-alginatne mikročestice, kao i procena potencijalne primene ovih mikročestica kao nosača za NSAIL za *per os* primenu.

- U prvoj fazi rada biće izrađene Ca-alginatne mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom primenom postupka ekstruzije disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata u gelirajući medijum koga čini rastvor kalcijum-hlorida (eksterno geliranje), a potom tretirane hitozanom inkubacijom u rastvorima hitozana velike (310 – 375 kDa) i male molekulske mase (50 – 190 kDa) različitih koncentracija. U cilju postizanja mikrometarskih dimenzija i sferičnog oblika mikročestica biće korišćen ručno izrađen *air jet* (mlazni) uređaj sa koaksijalnim cilindrom. Osim molekulske mase i koncentracije hitozana u rastvoru za “ojačavanje“ strukture poroznih Ca-alginatnih mikročestica biće variran i odnos koncentracije natrijum-alginata i model lekovite supstance i vreme inkubacije, sa ciljem da se dobiju relevantni podaci o uticaju pomenutih faktora na ona svojstva mikročestica koja ih čine pogodnim nosačima za *per os* primenu NSAIL. Izrađene mikročestice će biti podvrgnute fizičko-hemijskoj (mikroskopska, termalna, termogravimetrijska, i infracrvena spektroskopska analiza), farmaceutsko-tehnološkoj (efikasnost inkapsulacije i sadržaj lekovite supstance) i biofarmaceutskoj karakterizaciji (ispitivanje brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica u *in vitro* uslovima, karakterizacija profila rastvaranja naproksena zasnovana na različitim matematičkim modelima). U cilju procene uticaja procesnih i formulacionih faktora (naročito onih koji se odnose na hitozan), kao i njihovih interakcija na efikasnost inkapsulacije i *in vitro* brzinu rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica primenjen je eksperimentalni dizajn.

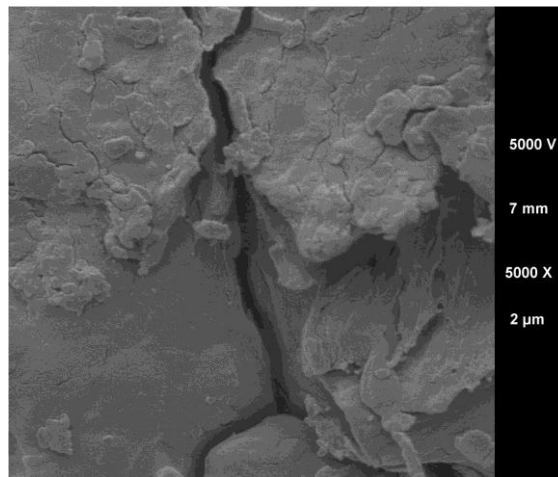
- Cilj drugog dela rada je da se ispita funkcionalnost oligosaharidnog hitozana (oligomera male molekulske mase, 2 – 3 kDa) u formulaciji hitozan-Ca-alginatnih mikročestica kao potencijalnih nosača za NSAIL, sa naročitim osvrtom na njegove potencijalne prednosti u odnosu na hitozane velike molekulske mase. Mikročestice će biti izrađene primenom istog uređaja, pri identičnim procesnim parametrima kao i one izrađene u prvoj fazi rada kako bi se dobili uporedivi rezultati. U cilju procene uticaja postupka izrade alginat-oligohitozan mikročestica na njihove karakteristike, mikročestice će u ovoj fazi biti izrađene primenom jedno- i dvostepenog postupka. Fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija dobijenih alginat-oligohitozan mikročestica biće izvedena primenom identičnih metoda kao i u okviru prve faze, uz dodatak ispitivanja sadržaja hitozana, sposobnosti bubrenja u zavisnosti od pH vrednosti medijuma, sa ciljem pronalaženja veze između koncentracije hitozana sa jedne, i stabilnosti mikročestica i mehanizma oslobađanja leka sa druge strane. Posebno će biti ispitan uticaj koncentracije oligosaharidnog hitozana u rastvoru za oblaganje Ca-alginatnih mikročestica na pH zavisno bubrenje i oslobađanje naproksena *in vitro*, kako bi se utvrdila optimalna koncentracija hitozana pri kojoj se dobijaju mikročestice prihvatljivih mehaničkih karakteristika i fizičko-hemijske stabilnosti u kiseloj i slabo baznoj sredini.
- U trećoj fazi rada biće ispitana mogućnost formiranja polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit® L 100-55 zasnovanog na elektrostatičkoj interakciji između oligohitozana i Eudragit®-a L 100-55. Ovaj kompleks će biti analiziran primenom skenirajuće elektronske mikroskopije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i FT-IR spektroskopije. Nakon toga će, primenom trostepenog postupka, biti izrađene alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestice sa naproksenom. Cilj ove faze je da se ispita mogućnost oligohitozana da stupa u istovremenu interakciju sa više anjonskih polimera, od kojih je jedan natrijum-alginat, te da se ovo njegovo svojstvo iskoristi za poboljšanje farmaceutsko-tehnoloških i biofarmaceutskih karakteristika alginat-oligohitozan mikročestica, a naročito za poboljšanje njihove stabilnosti u kiseloj sredini. Stoga će ove mikročestice biti podvrgnute

fizikohemijskoj, farmaceutsko-tehnološkoj i biofarmaceutskoj karakterizaciji mikročestica primenom identičnih metoda koje su korišćene u drugoj fazi rada.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. MATERIJALI

Za izradu mikročestica korišćen je natrijum-alginat Manugel GHB proizvođača FMC Biopolymer (Philadelphia, SAD), sa visokim sadržajem guluronske kiseline (63 % guluronska kiselina, 37 % manuronska kiselina), veličine čestica 250 μm (min. 95 %) i viskoziteta 75 mPa·s (1 % (m/m) vodeni rastvor). Prema specifikaciji koju navodi proizvođač, Manugel GHB obrazuje jake i termostabilne gelove. Skenirajuća elektronska mikrografija Manugel-a GHB prikazana je na slici 4.1.



Slika 4.1. Skenirajuća elektronska mikrografija natrijum-alginata sa visokim sadržajem guluronske kiseline (Manugel GHB), pri uvećanju od 5000X

Za modifikovanje Ca-alginatnih mikročestica, izrađenih iz natrijum-alginata Manugel GHB i kalcijum-hlorida (Ph. Eur. 7.0) korišćeni su hitozani visokog stepena deacetilacije, različitih molekulskih masa (4.2.1). Karakteristike i proizvođači korišćenih hitozana navedeni su u tabeli 4.1.

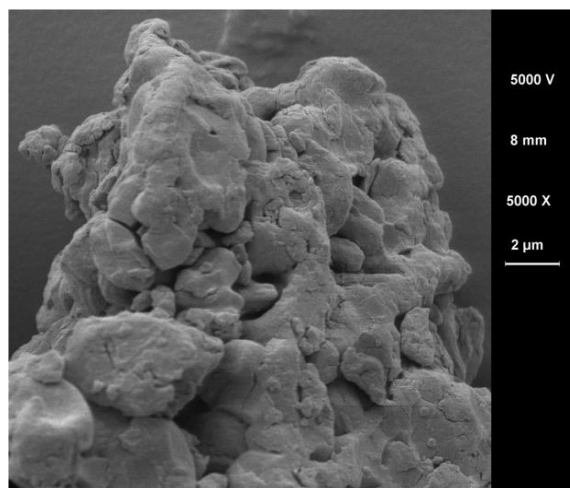
Tabela 4.1. Pregled karakteristika hitozana korišćenih za izradu mikročestica.

Naziv hitozana	Hitozan, oligosaharidni	Hitozan, niskomolekularni	Hitozan, visokomolekularni
Oznaka	OSH	NMH	VMH
Izgled	svetložuti prašak	svetložuti prašak	bele ljuspice
Molekulska masa (kDa)	2 – 3	50 – 190	310 – 375
Stepen deacetilacije	> 85 %	75 % – 85 %	> 75 %
Stepen usitnjenosti (μm)	< 177	–	–
Viskozitet* (cps)	2,17**	20 – 200	800 – 2000
Proizvođač	Fu Zhou Corona Science & Technology Development CO (FuZhou, Kina)	Sigma–Aldrich (St. Louis, USA)	Sigma–Aldrich (St. Louis, USA)

* Brukfeldov metod, 1 % rastvor u 1 % sirćetnoj kiselini

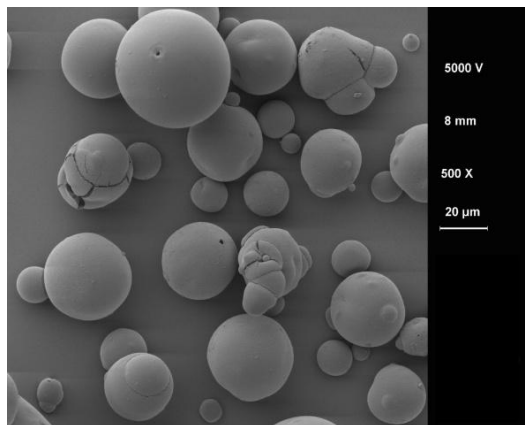
** određeno eksperimentalno

Skenirajuća elektronska mikrografija oligosaharidnog hitozana prikazana je na slici 4.2.



Slika 4.2. Skenirajuća elektronska mikrografija oligosaharidnog hitozana, pri uvećanju od 5000X

Za izradu alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica korišćen je Eudragit[®] L 100-55 proizvođača Evonik Industries AG (Darmstadt, Nemačka). Skenirajuća elektronska mikrografija Eudragit[®]-a L 100-55 prikazana je na slici 4.3.



Slika 4.3. Skenirajuća elektronska mikrografija Eudragit[®] –a L 100-55, pri uvećanju od 500X

Kao model lekovita supstanca iz grupe nesteroidnih antiinflamatornih lekova upotrebljen je naproksen (Ph. Eur. 7.0) proizvođača Chemo (Lugano, Švajcarska).

Za određivanje sadržaja hitozana u mikročesticama upotrebljen je 2 % rastvor ninhidrinskog reagensa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD), koji se sastoji od ninhidrina i hidrindantina u dimetilsulfoksidu i pufera litijum-acetata, pH vrednosti 5,2.

Kalijum-dihidrogen fosfat (Lach-Ner, Neratovice, Češka), natrijum-hidroksid (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i hlorovodonična kiselina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, SAD) upotrebljeni su za izradu medijuma za ispitivanje sposobnosti bubrenja i *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica.

4.2. METODE

4.2.1. Izrada mikročestica

Alginat-hitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestice su izrađene postupkom eksternog jonotropnog geliranja i polielektrolitnog kompleksiranja, pomoću ručno izrađenog mlaznog uređaja (eng. *air jet*) sa koaksijalnim cilindrom.

4.2.1.1. *Air jet* uređaj sa koaksijalnim cilindrom

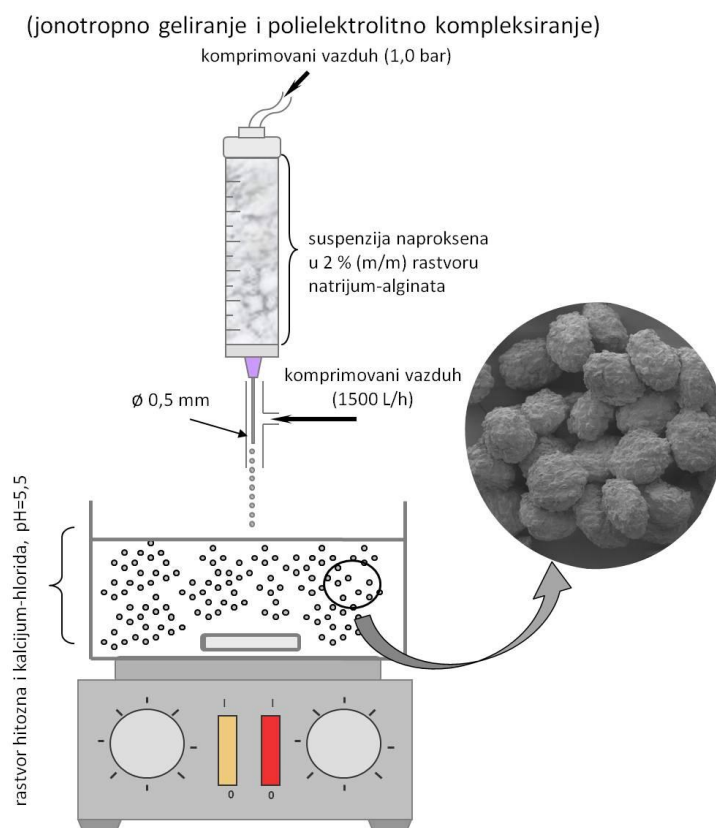
Air jet uređaj (slika 4.3) sastoji se iz sledećih delova:

- staklenog šprica kapaciteta 10 ml (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska), namenjenog za višekratnu upotrebu, sa fabrički obrađenom iglom ravnog vrha (unutrašnjeg dijametra od 0,51 mm i spoljašnjeg dijametra 0,82 mm) (Nordson EFD, Westlake, Ohio, SAD) postavljenom na njegov donji deo,
- plastičnog creva namenjenog za dovod komprimovanog vazduha iz kompresora u stakleni špic sa gornje strane, a koje se koristi ca ciljem da obezbedi konstantan protok sadržaja šprica kroz iglu do medijuma za geliranje, i
- plastičnog koaksijalnog cilindra, oblika slova T, u čiji je jedan krak smeštena igla, a kroz drugi krak uvodi komprimovan vazduh preko plastičnog creva povezanog na kompresor. Komprimovani vazduh se u koaksijalnom cilindru kreće ka vrhu igle gde dolazi u kontakt sa kapljicama natrijum-alginata i omogućava njihovo odvajanje od vrha igle pre nego što one postanu dovoljno velike, odnosno teške da bi se spontano, pod dejstvom gravitacione sile, odvojile od vrha igle. Na taj način, omogućeno je dobijanje kapljica mikrometarskih veličina koje će, nakon što dođu u kontakt sa medijumom za geliranje, formirati mikročestice. Podešavanjem pritiska vazduha u koaksijalnom cilindru moguće je uticati na veličinu mikročestica.

Rastojanje vrha igle od površine medijuma za geliranje iznosilo je 6 cm za sve ispitivane formulacije. Pritisak kojim je rastvor natrijum-alginata potiskivan kroz iglu prilikom izrade svih ispitivanih formulacija je bio isti i iznosio 1,0 bar, a brzina protoka vazduha kroz koaksijalni cilindar je imala vrednost od 1500 L/h. Na taj način eliminisan je uticaj ovih procesnih parametara na karakteristike ispitivanih mikročestica, a pomenute vrednosti su se u okviru preliminarne faze istraživanja pokazale kao optimalne za dobijanje mikročestica dijametra $< 500 \mu\text{m}$ sa zadovoljavajuće uskom raspodelom po veličini.

4.2.1.2. Izrada alginat-hitozan mikročestica jednostepenim postupkom

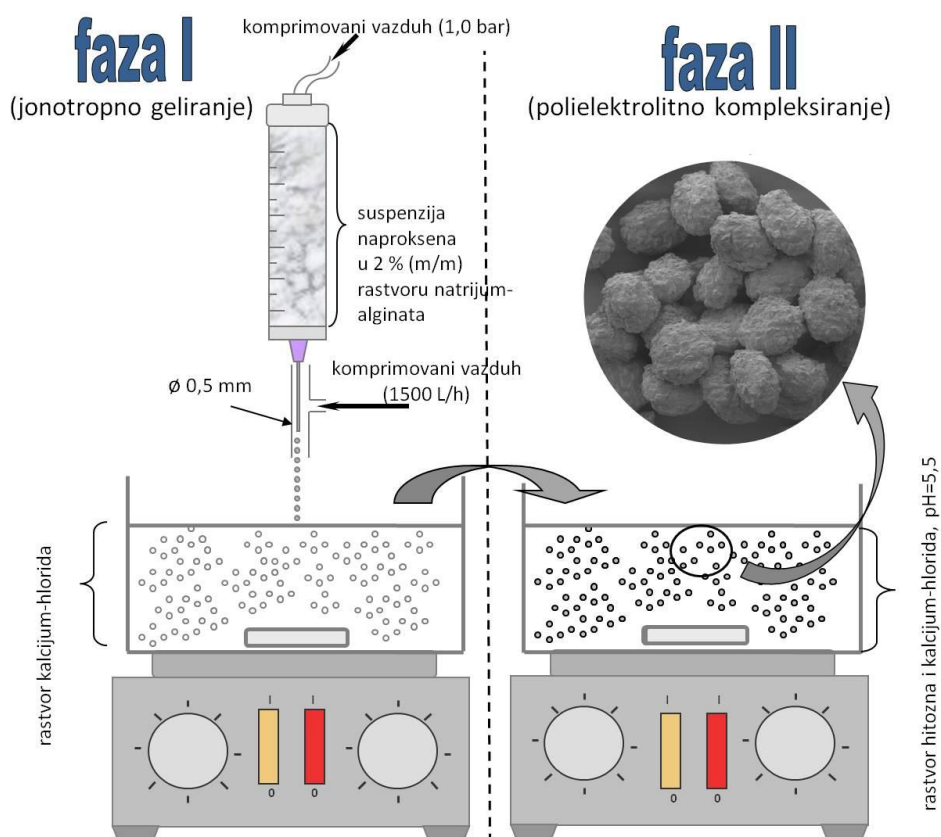
Tokom jednostepenog postupka rastvor natrijum-alginata u kome je dispergovana model lekovita supstanca ukapavan je u rastvor kalcijum-hlorida i hitozana određene koncentracije (gelirajući medijum) pH vrednosti 5,5 koja je podešena primenom 0,1 M acetatnog pufera (slika 4.4). Na taj način omogućeno je da reakcija jonotropnog geliranja, odnosno obrazovanja Ca-alginatnog hidrogela, teče istovremeno sa reakcijom građenja polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan. Reakcije jonotropnog geliranja i obrazovanja polielektrolitnog kompleksa odvijale su se u prihvatnom sudu uz umereno mešanje na magnetnoj mešalici, u cilju sprečavanja koalescencije kapljica rastvora natrijum-alginata nakon što dođu u kontakt sa površinom gelirajućeg medijuma. Nakon određenog vremenskog intervala, u zavisnosti od formulacije, mikročestice su filtracijom izdvojene iz gelirajućeg medijuma, isprane dva puta dejonizovanom vodom, a potom prenesene u Petri šolju, gde su sušene na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase.



Slika 4.4. Shematski prikaz jednostepenog postupka dobijanja alginat-hitozan mikročestica

4.2.1.3. Izrada alginat-hitozan mikročestica dvostepenim postupkom

Kod dvostepenog postupka (slika 4.5) prvo su izrađene Ca-alginatne mikročestice ukapavanjem rastvora natrijum-alginata u kome je dispergovana model lekovita supstanca u desetostruko veću količinu rastvora kalcijum-hlorida određene koncentracije (prva faza, jonotropno geliranje). Nakon određenog vremena inkubacije u rastvoru kalcijum-hlorida (zavisno od formulacije) uz neprekidno, umereno mešanje mikročestice su izdvojene iz gelirajućeg medijuma filtracijom i bez prethodnog ispiranja prenesene u rastvor hitozana pH vrednosti 5,5, koji je sadržavao kalcijum-hlorid rastvoren u istoj koncentraciji kao i u prvoj fazi (druga faza, polielektrolitno kompleksiranje). Nakon određenog vremena inkubacije u rastvoru hitozana (zavisno od formulacije), uz umereno mešanje na magnetnoj mešalici, alginat-hitozan mikročestice su izdvojene filtracijom, isprane dva puta dejonizovanom vodom, a zatim sušene na način opisan kod jednostepenog postupka.

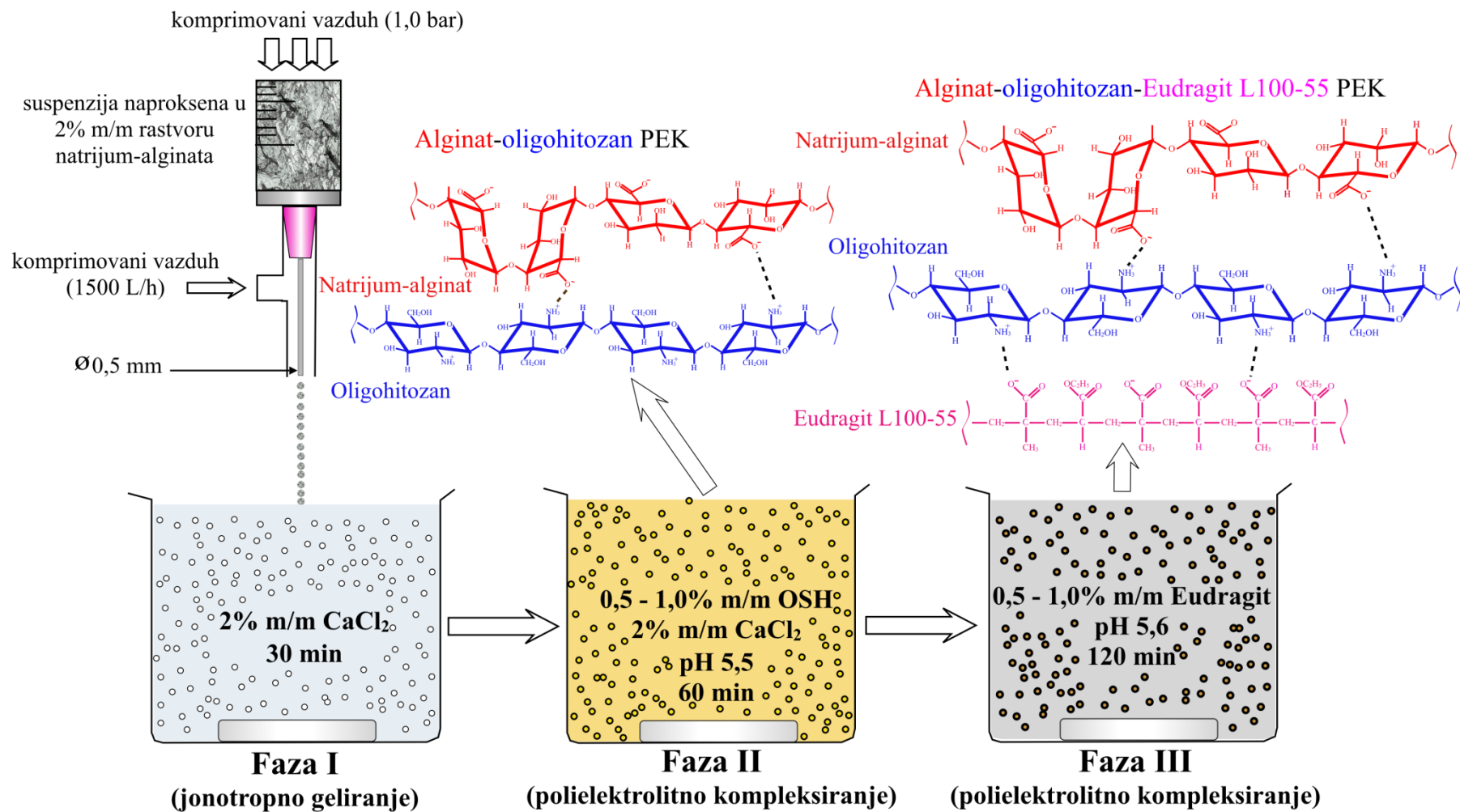


Slika 4.5. Shematski prikaz dvostepenog postupka dobijanja alginat-hitozan mikročestica

4.2.1.4. Izrada alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica trostepenim postupkom

Alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestice izrađene su trostepenim postupkom, odnosno naknadnom inkubacijom alginat-oligohitozan mikročestica koje su izrađene dvostepenim postupkom, u vodenom rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 (slika 4.6). Po završetku dvostepenog postupka, alginat-oligohitozan mikročestice sa naproksenom su izdvojene filtracijom iz rastvora oligohitozana i nakon ispiranja dejonizovanom vodom prebačene u rastvor Eudragit[®]-a L 100-55 određene koncentracije (zavisno od formulacije). Da bi se obezbedili optimalni uslovi za polielektrolitno kompleksiranje između oligohitozana i Eudragit[®]-a L 100-55, pH vrednost rastvora je podešena na 5,6. Rastvor Eudragit[®]-a L 100-55 pripremljen je dodatkom 0,1 M NaOH uz mešanje do njegovog potpunog rastvaranja, a potom je dodatkom 0,1 M CH₃COOH pH vrednost rastvora podešena na 5,6. Nakon 2 sata umerenog mešanja na magnetnoj mešalici alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestice su izdvojene filtracijom, isprane dva puta dejonizovanom vodom, a zatim prenesene u Petri šolju, gde su sušene na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase.

U cilju ispitivanja prirode interkacije oligohitozana i Eudragit[®]-a L 100-55 i osobina polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55, ovaj kompleks je pripremljen ukapavanjem rastvora oligohitozana (1 % (m/m), pH vrednost 5,6) u jednaku zapreminu rastvora Eudragit[®]-a L 100-55 (1 % (m/m), pH vrednost 5,6), uz mešanje na magnetnoj mešalici tokom 2 sata na sobnoj temperaturi. Potom je nastali precipitat uklonjen filtracijom, ispran dejonizovanom vodom i prenesen u Petri šolju, gde je sušen u struji vazduha na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase. Osušeni precipitat je usitnjen u tarioniku pomoću pistila, prosejan kroz sito 355 μm i kao takav korišćen za dalja ispitivanja.



Slika 4.6. Shematski prikaz trostepenog postupka dobijanja alginat-oligochitosan-Eudragit® L 100-55 mikročestica

4.2.2. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u prvoj fazi eksperimentalnog rada

Mikročestice ispitivane u prvoj fazi eksperimentalnog rada izrađene su dvostepenim postupkom, primenom *air jet* uređaja (4.2.1.1). Način označavanja izrađenih model formulacija, sastav disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata, rastvora kalcijum-hlorida i hitozana, kao i vremena trajanja faza prikazani su u tabeli 4.2.

4.2.3. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u drugoj fazi eksperimentalnog rada

Mikročestice ispitivane u drugoj fazi eksperimentalnog rada izrađene su jednostepenim i dvostepenim postupkom, primenom *air jet* uređaja (4.2.1.1). Način označavanja izrađenih model formulacija, sastav disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata, rastvora kalcijum-hlorida i oligosaharidnog hitozana, kao i vremena trajanja faza prikazani su u tabelama 4.3. i 4.4.

4.2.4. Sastav i uslovi izrade mikročestica ispitivanih u trećoj fazi eksperimentalnog rada

Mikročestice ispitivane u trećoj fazi eksperimentalnog rada izrađene su trostepenim postupkom, primenom *air jet* uređaja (4.2.1.1). U tabeli 4.5 navedene su oznake izrađenih formulacija i podaci vezani za eksperimentalne uslove pod kojima su izrađene: sastav disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata, sastav gelirajućeg medijuma korišćenog u prvoj fazi, rastvora oligosaharidnog hitozana korišćenog u drugoj fazi, rastvora Eudragit[®]-a L 100-55 korišćenog u trećoj fazi i vremena trajanja faza. Osim alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica, u ovoj fazi rada izrađene su i Ca-alginatne i alginat-oligohitozan mikročestice radi uporedne analize i proučavanja uticaja polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 na fizičko-hemijske, farmaceutsko-tehnološke i biofarmaceutske karakteristike mikročestica.

Tabela 4.2. Sastav model formulacija alginat-hitozan mikročestica ispitivanih u prvoj fazi eksperimentalnog rada (dvostepeni postupak)

Formulacija	Prva faza				Druga faza		
	Disperzija naproksena u rastvoru Na-alginata		Gelirajući medijum	Vreme inkubacije, h	Rastvor hitozana*		Vreme inkubacije, h
	Natrijum-alginat, % (m/m)	Naproksen, % (m/m)	Kalcijum-hlorid, % (m/m)		Vrsta hitozana	Koncentracija hitozana, % (m/m)	
F1	2,0	2,0	2,0	0,5	NMH**	0,1	1,0
F2	2,0	2,0	2,0	0,5	NMH	0,2	1,0
F3	2,0	2,0	2,0	0,5	VMH***	0,1	1,0
F4	2,0	2,0	2,0	0,5	VMH	0,2	1,0
F5	2,0	1,0	2,0	0,5	NMH	0,1	1,0
F6	2,0	1,0	2,0	0,5	NMH	0,2	1,0
F7	2,0	1,0	2,0	0,5	VMH	0,1	1,0
F8	2,0	1,0	2,0	0,5	VMH	0,2	1,0
F9	2,0	2,0	2,0	0,5	NMH	0,1	24,0
F10	2,0	2,0	2,0	0,5	NMH	0,2	24,0
F11	2,0	2,0	2,0	0,5	VMH	0,1	24,0
F12	2,0	2,0	2,0	0,5	VMH	0,2	24,0
F13	2,0	1,0	2,0	0,5	NMH	0,1	24,0
F14	2,0	1,0	2,0	0,5	NMH	0,2	24,0
F15	2,0	1,0	2,0	0,5	VMH	0,1	24,0
F16	2,0	1,0	2,0	0,5	VMH	0,2	24,0

* pH vrednost rastvora hitozana je podešena na 5,5 pomoću 0,1 M acetatnog pufera

** niskomolekularni hitozan

*** visokomolekularni hitozan

Tabela 4.3. Sastav model formulacija alginat-oligohitozan mikročestica ispitivanih u drugoj fazi eksperimentalnog rada (dvostepeni postupak)

Formulacija	Prva faza				Druga faza		
	Disperzija naproksena u rastvoru Na-alginata		Gelirajući medijum	Vreme inkubacije, min	Rastvor hitozana *		Vreme inkubacije, min
	Natrijum-alginat, % (m/m)	Naproksen, % (m/m)	Kalcijum-hlorid, % (m/m)		Vrsta hitozana	Koncentracija hitozana, % (m/m)	
AlgCa ₁	2,0	2,0	1,0	30	-	-	-
2OSH _{0,1} Ca ₁ 60 ^{**}	2,0	2,0	1,0	30	OSH ^{***}	0,1	60
2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	2,0	2,0	1,0	30	OSH	1,0	60
2OSH _{4,0} Ca ₁ 60	2,0	2,0	1,0	30	OSH	4,0	60
AlgCa ₂	2,0	2,0	2,0	30	-	-	-
2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	0,1	60
2OSH _{0,2} Ca ₁ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	0,2	60
2OSH _{0,4} Ca ₁ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	0,4	60
2OSH _{0,6} Ca ₁ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	0,6	60
2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	1,0	60
2OSH _{2,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	2,0	60
2OSH _{3,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	3,0	60
2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	30	OSH	4,0	60

* pH vrednost rastvora hitozana je podešena na 5,5 pomoću 0,1 M acetatnog pufera

** prvi broj u oznaci formulacije označava postupak kojim su izrađene mikročestice (1 - jednostepeni; 2 - dvostepeni), drugi broj označava koncentraciju rastvora hitozana u kome su mikročestice inkubirane, treći broj koncentraciju kalcijum-hlorida u gelirajućem medijumu, a četvrti broj označava trajanje inkubacije u rastvoru hitozana izraženu u minutima

*** oligosaharidni hitozan

Tabela 4.4. Sastav model formulacija alginat-oligohitozan mikročestica ispitivanih u drugoj fazi eksperimentalnog rada (jednostepeni postupak)

Formulacija	Disperzija naproksena u rastvoru Na-alginata		Gelirajući medijum *			Vreme inkubacije, min
	Natrijum-alginat, % (m/m)	Naproksen, % (m/m)	Kalcijum-hlorid, % (m/m)	Vrsta hitozana	Koncentracija hitozana, % (m/m)	
1OSH _{0,1} Ca ₁ 60 ^{**}	2,0	2,0	1,0	OSH ^{***}	0,1	60
1OSH _{1,0} Ca ₁ 60	2,0	2,0	1,0	OSH	1,0	60
1OSH _{4,0} Ca ₁ 60	2,0	2,0	1,0	OSH	4,0	60
1OSH _{0,1} Ca ₂ 60	2,0	2,0	1,0	OSH	0,1	60
1OSH _{1,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	OSH	1,0	60
1OSH _{4,0} Ca ₂ 60	2,0	2,0	2,0	OSH	4,0	60
1OSH _{1,0} Ca ₁ 5	2,0	2,0	1,0	OSH	1,0	5
1OSH _{1,0} Ca ₁ 15	2,0	2,0	1,0	OSH	1,0	15
1OSH _{1,0} Ca ₁ 30	2,0	2,0	1,0	OSH	1,0	30
1OSH _{1,0} Ca ₂ 5	2,0	2,0	2,0	OSH	1,0	5
1OSH _{1,0} Ca ₂ 15	2,0	2,0	2,0	OSH	1,0	15
1OSH _{1,0} Ca ₂ 30	2,0	2,0	2,0	OSH	1,0	30

* pH vrednost rastvora gelirajućeg medijuma je podešena na 5,5 pomoću 0,1 M acetatnog pufera

** prvi broj u oznaci formulacije označava postupak kojim su izrađene mikročestice (1 - jednostepeni; 2 - dvostepeni), drugi broj označava koncentraciju rastvora hitozana u kome su mikročestice inkubirane, treći broj koncentraciju kalcijum-hlorida u gelirajućem medijumu, a četvrti broj označava trajanje inkubacije u rastvoru hitozana izraženu u minutima

*** oligosaharidni hitozan

Tabela 4.5. Sastav model formulacija Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit®L 100-55 mikročestica izrađenih u trećoj fazi eksperimentalnog rada

Formulacija	Prva faza				Druga faza		Treća faza	
	Disperzija naproksena u rastvoru Na-alginata		Gelirajući medijum	Vreme inkubacije, min	Rastvor oligohitozana *	Vreme inkubacije, min	Rastvor Eudragit®-a L 100-55*	Vreme inkubacije, min
	Natrijum-alginat, % (m/m)	Naproksen, % (m/m)	Kalcijum-hlorid, % (m/m)		Koncentracija oligohitozana, % (m/m)		Koncentracija Eudragit®-a L 100-55, % (m/m)	
A1 **	2,0	2,0	2,0	30	-	-	-	120
O1	2,0	2,0	2,0	30	0,5	60	-	120
O2	2,0	2,0	2,0	30	1,0	60	-	120
E1	2,0	2,0	2,0	30	0,5	60	0,5	120
E2	2,0	2,0	2,0	30	0,5	60	1,0	120
E3	2,0	2,0	2,0	30	1,0	60	0,5	120
E4	2,0	2,0	2,0	30	1,0	60	1,0	120

*pH vrednost rastvora oligohitozana i Eudragit®-a L 100-55 podešena na 5,5 i 5,6, redom, pomoću 0,1 M acetatnog pufera. U rastvoru oligohitozana rastvoren je i kalcijum-hlorid u koncentraciji od 2 % (m/m)

** Formulacije izrađene u okviru treće faze su označene početnim slovom polimera koji ulazi u njihov sastav: A: Ca-alginatne mikročestice, O: alginat-oligohitozan mikročestice i E: alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestice

4.2.5. Reološka ispitivanja

Reološka ispitivanja rastvora hitozana (različitih molekulskih masa i koncentracija) i suspenzija model lekovite supstance u rastvoru natrijum-alginata (u različitim odnosima) korišćenih u postupku dobijanja mikročestica izvedena su na rotacionom reometru Rheolab MC 120 (Paar Physica, Stuttgart, Nemačka) primenom sistema sa rotirajućim cilindrom Z3 i brzinom smicanja u opsegu $0 - 100 \text{ s}^{-1}$ pri temperaturi od $20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. Merenja su izvedena u triplikatu za svaki ispitivani uzorak.

Rezultati ovih ispitivanja su upotrebljeni za tumačenje uticaja formulacionih faktora na oblik, veličinu mikročestica, efikasnost inkapsulacije i brzinu oslobađanja lekovite supstance iz mikročestica.

4.2.6. Merenje veličine mikročestica

Merenje veličine mikročestica je izvršeno primenom svetlosnog mikroskopa Olympus BX50 (Olympus, Center Valley, SAD) i softverskog paketa Microimage v4.0. Veličine mikročestica za sve ispitivane formulacije su prikazane kao srednje vrednosti dijametara 100 osušenih mikročestica uz odgovarajuću standardnu devijaciju.

U cilju poređenja oblika i veličine mikročestica pre, nakon sušenja i tokom bubrenja u medijumima različitih pH vrednosti primenjeni su USB mikroskop CY-800B (Chin Yi Enterprise Ltd, Kina) i polarizacioni mikroskop Zeiss ApoTome Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Nemačka) povezan sa digitalnom AxioCam ICc2 kamerom. Za obradu dobijenih podataka korišćen je softverski paket AxioVision 4.6.

4.2.7. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica

Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica izvedeno je primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa DSM 940 A (Zeiss, Oberkochen, Nemačka). Osušeni uzorci mikročestica su pomoću špatule preneseni na dvostruku lepljivu traku, a zatim obloženi slojem zlata pomoću uređaja BioRad E 5100

(BioRAD Microscience Division Cambridge, SAD). Tako pripremljeni uzorci su posmatrani pod uvećanjem od 50 do 5000 puta.

4.2.8. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza (TGA/DSC)

Ispitivanje interakcija između pojedinačnih sastojaka mikročestica i procena fizičkog stanja inkapsuliranog naproksena vršeni su pomoću diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA) primenom sledećih uređaja, redom: Mettler-Toledo DSC 1 STARe System (Mettler-Toledo AG, Analytical, Schwerzenbach, Švajcarska) i Netzsch STA 409 PG (Netzsch, Selb, Nemačka). Uzorci osušenih mikročestica i pojedinačni sastojci su zatvarani u zasebne standardne aluminijumske posude i zagrevani u temperaturnom opsegu od 25 to 330 °C brzinom od 20 °C/min pri konstantnom protoku azota od 50 ml/min.

4.2.9. Infracrvena spektroskopska analiza (FT-IR)

FT-IR spektroskopska analiza model lekovite supstance, polimera i osušenih mikročestica izvedena je primenom FT-IR spektrometra Nicolet i S30 (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, VB) pri rezoluciji od 4 cm⁻¹ u opsegu talasnih dužina od 4000 do 650 cm⁻¹.

4.2.10. Određivanje sadržaja model lekovite supstance

Određivanje sadržaja model lekovite supstance u uzorcima mikročestica vršeno je odmeravanjem 100 mg osušenih mikročestica koje su potom ručno pulverizovane. Pulverizovane mikročestice su kvantitativno prenesene u fosfatni pufer pH vrednosti 7,4 (USP 30) gde su izložene intenzivnom mešanju na magnetnoj mešalici tokom 24 sata (do potpunog razaranja). Nastala disperzija je potom filtrirana kroz membranski filter (0,45 µm MF-Millipore[®], Milipore Corporation, Bedford, SAD), a sadržaj naproksena u filtratu određen spektrofotometrijskom metodom primenom Evolution 300 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, VB). Na osnovu vrednosti

izmerene apsorbancije na talasnoj dužini od 330 nm, koncentracija naproksena u uzorku je određena preko jednačine kalibracione krive:

$$A = 7,053c - 0,0087, \quad (r^2=0,9997)$$

gde je A apsorbancija, a c koncentracija naproksena (mg/ml) u ispitivanom uzorku.

Procentni sadržaj naproksena u osušenim mikročesticama (DL%) izračunat je pomoću sledeće formule:

$$DL\% = 100 \times \frac{Q_e}{Q_m}$$

gde je Q_e količina naproksena u odmerenoj količini uzorka osušenih mikročestica mase Q_m .

4.2.11. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

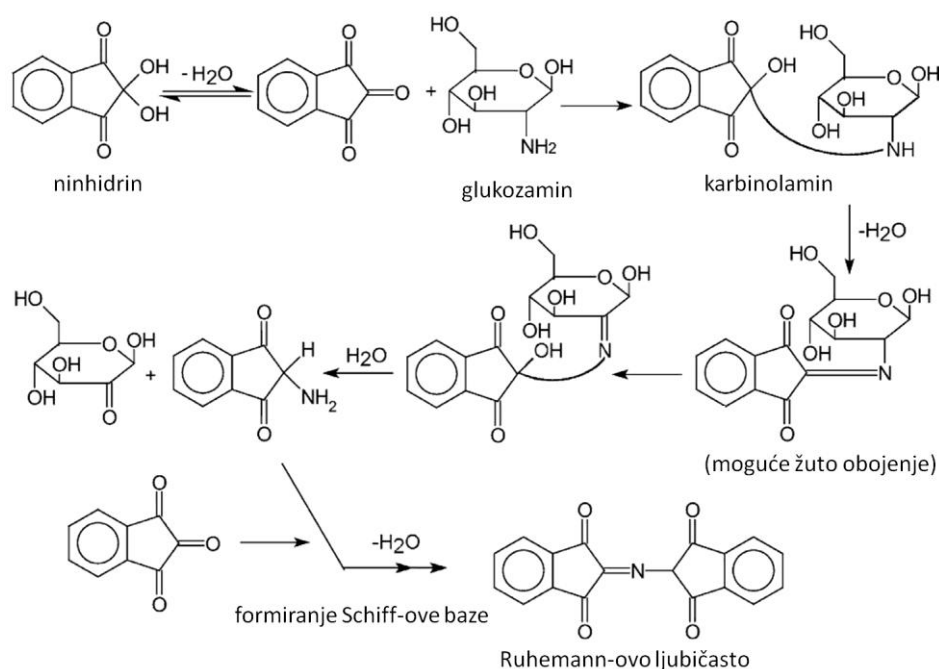
Određivanje efikasnosti inkapsulacije, odnosno stepena iskorišćenosti lekovite supstance vršeno je primenom tzv. "direktnog metoda". Ovaj metod se zasniva na određivanju količine inkapsulirane lekovite supstance i njenog poređenja sa ukupnom količinom lekovite supstance upotrebljene u postupku izrade mikročestica. Na taj način, moguće je indirektno izračunati i gubitke do kojih dolazi tokom postupka inkapsulacije. Sam postupak izveden je na sledeći način: nakon inkubacije u rastvoru hitozana mikročestice su filtracijom izdvojene iz rastvora hitozana, a potom isprane dejonizovanom vodom u cilju uklanjanja neinkapsuliranog naproksena zaostalog na površini mikročestica. Zatim su mikročestice prenesene u Petri šolju i sušene na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja mikročestice su razorene u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4 (USP 30) uz intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici tokom 24 sata. Dobijena disperzija je filtrirana kroz membranski filter (0,45 μ m MF-Millipore[®], Milipore Corporation, Bedford, SAD), a sadržaj naproksena je određen spektrofotometrijski (4.2.10). Efikasnost inkapsulacije (EE%) za svaku ispitivanu formulaciju mikročestica izračunata je primenom sledeće formule:

$$EE\% = 100 \times \frac{Q_e}{Q_t}$$

gde je Q_t ukupna količina naproksena upotrebljena za izradu mikročestica, a Q_e količina inkapsuliranog naproksena.

4.2.12. Određivanje sadržaja hitozana

Za određivanje sadržaja hitozana u mikročesticama upotrebljena je kolorimetrijska metoda zasnovana na ninhidrinskoj reakciji. U reakciji ninhidrina (2,2-dihidroksindan-1,3-dion) sa primarnim amino grupama hitozana gradi se proizvod tamno plave ili ljubičaste boje, diketohidrindiliden-diketohidrindamin, poznat pod nazivom *Ruhemann-ovo ljubičasto* (slika 4.7) (Prochazkova i sar., 1999; Leane i sar., 2004; Wu i sar., 2005).



Slika 4.7. Shematski prikaz reakcije ninhidrina sa glukozaminom (monomerna jedinica hitozana)(Wu i sar., 2005)

Ninhidrijska reakcija je izvođena primenom 2 % rastvora ninhidrijskog reagensa čiji detaljan sastav je opisan u poglavlju 4.1. Odmerena količina osušenih

mikročestica prenesena je u 1 % (m/m) rastvor natrijum-citrata i razorena uz intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici tokom 24 sata. Nastali rastvor je filtriran i 2 ml filtrata pomešano je sa 1 ml rastvora ninhidrinskog reagensa, i potom zagrevano u zatvorenoj staklenoj bočici u ključaloj vodi tokom 10 min. Potom je sadržaj bočice ohlađen na sobnu temperaturu i razblažen sa 5 ml 96 % (v/v) etanola. Apsorbanca nastalog tamnoplavog/ljubičastog obojenja merena je pomoću Evolution 300 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, VB) na talasnoj dužini od 570 nm. Kao slepa proba upotrebljen je rastvor dobijen mešanjem 2 ml 1 % (m/m) rastvora natrijum-citrata i 1 ml rastvora ninhidrinskog reagensa, koji je takođe zagrevan tokom 10 min u ključaloj vodi, ohlađen na sobnu temperaturu i razblažen dodatkom 5 ml 96 % (v/v) etanola. Na osnovu vrednosti izmerene apsorbancije, koncentracija hitozana u rastvoru dobijenom nakon razaranja mikročestica je određena preko sledećih jednačina kalibracionih krivih:

za niskomolekularni hitozan: $A = 32,362c - 0,0286$ ($r^2 = 0,9994$),

za viskomolekularni hitozan: $A = 21,443c + 0,0183$ ($r^2 = 0,9963$),

za oligosaharidni hitozan: $A = 24,32c + 0,0104$ ($r^2 = 0,9988$),

gde je A apsorbancija, a c koncentracija hitozana (mg/ml) u ispitivanom uzorku.

Po potrebi rastvori su pre merenja na spektrofotometru razblaživani dodatkom 96 % (v/v) etanola.

Dobijeni rezultati su prikazani kao procentni sadržaj hitozana u odnosu na ukupnu masu osušenih mikročestica.

Značaj ove reakcije ogleda se u mogućnosti ispitivanja uticaja formulacionih faktora (molekulska masa hitozana, koncentracija hitozana i kalcijum-hlorida) i procesnih parametara (postupak izrade i vreme inkubacije) na brzinu i stepen vezivanja hitozana za Ca-alginatnu hidrogel mrežu.

4.2.13. Ispitivanje sposobnosti bubrenja

Ispitivanje sposobnosti preuzimanja vode (bubrenja) iz okolnog medijuma vršeno je sa ciljem da se obezbede podaci koji će olakšati tumačenje mehanizama kojim se inkapsulirana model lekovita supstanca oslobađa iz mikročestica. 50 mg osušenog uzorka mikročestica je preneseno u staklene bočice u kojima se nalazilo 20 ml medijuma. Bočice su potom zatvorene i uronjene u vodeno kupatilo zagrejano na $37 \pm 0,5$ °C. Kao medijumi za bubrenje korišćeni su veštački želudačni sok (0,1 M HCl) i fosfatni puferi pH vrednosti 6,8 i 7,4 (USP 30). U određenim vremenskim intervalima mikročestice su filtracijom odvojene od medijuma za bubrenje, prenesene na filter papir kako bi se uklonio višak vode sa površine mikročestica, i zatim je merena njihova masa. Merenja mase nabubrelih mikročestica su vršena na analitičkoj vagi Sartorius AE 240 (Sartorius, Gottingen, Germany). Stepen bubrenja, SB% za svaku ispitivanu formulaciju izračunat je primenom sledeće formule:

$$SB\% = 100 \times \frac{(w_t - w_i)}{w_i}$$

gde je w_t masa nabubrelih mikročestica nakon vremena t , a w_i je početna masa osušenih mikročestica.

4.2.14. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica

Ispitivanje brzine rastvaranja inkapsuliranog naproksena iz mikročestica u *in vitro* uslovima sa posebnim osvrtom na ispitivanje uticaja pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja inkapsuliranog naproksena je izvedeno primenom aparature sa protočnom ćelijom DFZ 60 (Erweka, Heusenstamm, Nemačka) pri temperaturi $37 \pm 0,5$ °C. Kao medijumi upotrebljeni su veštački želudačni sok (0,1 M HCl), odnosno fosfatni puferi pH vrednosti 6,8 i 7,4 (USP30). Medijum sa rastvorenim lekovitom supstancom je prikupljan u kolektorsku čašu, a u ćeliju sa ispitivanim uzorkom konstantno je dopreman svež medijum brzinom od 1 ml/min. U definisanim vremenskim intervalima

uzorkovano je po 4 ml medijuma sa rastvorenom lekovitom supstancom, a svaki uzorak zamenjen je istom količinom svežeg medijuma. Pre određivanja sadržaja lekovite supstance svaki uzorak je filtriran kroz membranski filter (4.2.11). Sadržaj lekovite supstance je određen spektrofotometrijski (4.2.10). Na osnovu vrednosti izmerene apsorpcije na talasnim dužinama od 263 nm (veštački želudačni sok) i 330 nm (fosfatni puferi pH vrednosti 6,8 i 7,4), koncentracija naproksena u uzorku je određena preko sledećih jednačina kalibracionih krivih:

veštački želudačni sok: $A = 19,836c + 0,0027$, ($r^2 = 0,9998$)

fosfatni pufer pH vrednosti 6,8: $A = 6,9469c - 0,0041$, ($r^2 = 0,9943$)

fosfatni pufer pH vrednosti 7,4: $A = 7,053c - 0,0087$, ($r^2 = 0,9997$)

gde je A apsorpcija, a c koncentracija naproksena (mg/ml) u ispitivanom uzorku.

4.2.15. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance

Pod matematičkim modelima za procenu profila brzine oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata podrazumevaju se (semi)empirijske jednačine kojima se opisuje kinetika oslobađanja. Obično se za opis kinetike oslobađanja lekovite supstance biraju oni modeli za koje se pretpostavlja da su odgovarajući za primenu na određenu grupu eksperimentalno dobijenih podataka. Nakon toga se bira matematički model koji najbolje opisuje ispitivane profile brzine rastvaranja, a FDA navodi preporuku da se primenjuju matematički modeli sa ne više od tri parametra (FDA, 1997).

U cilju procene kinetike i mehanizama oslobađanja naproksena iz mikročestica primenjeni su *kinetika nultog reda*, *kinetika prvog reda*, *Higuchi* (Higuchi, 1963), *Korsmeyer-Peppas* (Korsmeyer i sar., 1983), *Peppas-Sahlin* (Peppas i Sahlin, 1989) i *Hixon-Crowel* matematički modeli (Peppas, 1985) (tabela 4.6).

Tabela 4.6. Pregled matematičkih modela primenjenih za opisivanje kinetike oslobađanja naproksena iz mikročestica

Model	Jednačina*
<i>Kinetika nultog reda</i>	$M_t = M_0 - k_0 \times t$
<i>Kinetika prvog reda</i>	$\ln M_t = \ln M_0 - k_1 \times t$
<i>Higuchi</i>	$Q = k_h \times t^{0,5}$
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$Q = k \times t^n$
<i>Peppas-Sahlin</i>	$Q = k_d \times t^{0,5} + k_r \times t$
<i>Hixon-Crowel</i>	$M_0^{\frac{1}{3}} - M_t^{\frac{1}{3}} = k_c \times t$

* M_0 – količina nerastvorene supstance na početku procesa rastvaranja ($t = 0$)

M_t – količina nerastvorene supstance nakon vremena t

Q – frakcija (udeo) lekovite supstance rastvorene nakon vremena t

$k_0, k_1, k_h, k, k_d, k_r, k_c$ – konstante brzine rastvaranja odgovarajućih modela

n – difuzioni eksponent

Kinetika nultog reda se naziva još i ravnotežnom brzinom rastvaranja (eng. *steady state release*), a odlikuje se konstantnom brzinom rastvaranja lekovite supstance iz nosača. To praktično znači da kada se inkapsulirana lekovita supstanca oslobađa kinetikom nultog reda iz mikročestica u svakoj jedinici vremena oslobodi se ista količina lekovite supstance, što je idealno za postizanje produženog farmakodinamičkog odgovora. U slučaju kada se lekovita supstanca oslobađa kinetikom nultog reda smatra se da je postignuto kontrolisano oslobađanje (Berkland i sar., 2002; Petrović, 2010).

Kinetika prvog reda opisuje rastvaranje lekovite supstance iz nosača kada se brzina rastvaranja eksponencijalno smanjuje tokom vremena. Preciznije, kod ovog oslobađanja količina rastvorene lekovite supstance se eksponencijalno smanjuje u jednakim vremenskim intervalima, a zavisi od preostale (nerastvorene) količine lekovite supstance.

Korsmeyer-Peppas model je relativno jednostavan semiempirijski model, gde je k konstanta koja opisuje geometriju i strukturu sistema, a n je eksponent koji predstavlja indikator mehanizma oslobađanja aktivne supstance. Zavisno od vrednosti ovog eksponenta, razlikuju se četiri slučaja (tabela 4.7). U slučaju kada je vrednost eksponenta $n = 0,5$ *Korsmeyer-Peppas* matematički model svodi se na *Higuchi* model, a mehanizam oslobađanja lekovite supstance je *Fick*-ova difuzija.

Tabela 4.7. Pretpostavljeni mehanizmi oslobađanja lekovite supstance u zavisnosti od vrednosti eksponenta n (Ritger i Peppas, 1987)

Vrednost eksponenta n^*	Mehanizam oslobađanja lekovite supstance	Brzina oslobađanja u funkciji vremena
0,43	<i>Fick</i> -ova difuzija	$t^{-0,5}$
$0,43 < n < 1,0$	anomalni transport	t^{n-1}
1,0	slučaj II transporta	kinetika nultog reda
$n > 1,0$	super slučaj II transporta	t^{n-1}

*za nosače sferičnog oblika

Peppas-Sahlin model pogodan je za tumačenje profila oslobađanja iz sistema koji bubre i erodiraju, jer je predstavljen matematičkim izrazom (tabela 4.6) koji u osnovi uključuje uticaj oba navedena mehanizma na oslobađanje lekovite supstance (Colombo i sar., 2000). Tako se prvi deo ovog matematičkog izraza odnosi na relativni doprinos procesa difuzije, a drugi deo na doprinos relaksacije (bubrenja). Stoga i konstante k_d i k_r koje figurišu u pomenutom modelu, predstavljaju konstante koje se odnose na relativni doprinos difuzije i relaksacije na ukupnu količinu oslobođene lekovite supstance.

U *Hixon-Crowell* modelu polazi se od pretpostavke da je površina čestica (koja utiče na brzinu rastvaranja) proporcionalna kubnom korenu njihove zapremine pa se na taj način dolazi do jednačine koja opisuje brzinu rastvaranja, a koja je predstavljena u tabeli 4.6. Ova jednačina naročito je pogodna za opisivanje brzine rastvaranja iz nosača čije se dimenzije, a time i površina preko koje se vrši oslobađanje, smanjuju proporcionalno. Međutim, kada se primenjuje ovaj model neophodno je uzeti u obzir da on podrazumeva da je ograničavajući faktor za oslobađanje lekovite supstance iz nosača brzina rastvaranja lekovite supstance, a ne i brzina difuzije kroz matriks polimera.

Stepen uklapanja eksperimentalnih rezultata u primenjene matematičke modele određen je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (r^2).

4.2.16. Primena eksperimentalnog dizajna u proceni uticaja formulacionih/procesnih parametara na karakteristike alginat-hitozan mikročestica

U cilju procene uticaja procesnih i formulacionih faktora (naročito onih koji se odnose na hitozan), kao i njihovih interakcija na efikasnost inkapsulacije i *in vitro* brzinu rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica primenjen je pun faktorijalni dizajn.

Eksperimentalni dizajn se može definisati kao strategija postavke eksperimenata na način koji će omogućiti da se do željenih informacija dođe na što efikasniji i precizniji način (Lewis i sar., 1999). Konvencionalni pristup postavci eksperimenta je da se uticaj jedne promenljive na određeni odgovor proučava tako što se vrednosti ostalih promenljivih održavaju konstantnim. Međutim, moguće je da postoji određen oblik interakcije više različitih promenljivih. U tom slučaju će stepen u kome jedna promenljiva utiče na odgovor koji se prati u određenoj meri zavisiti i od vrednosti promenljivih sa kojima stupa u interakciju. To znači, da u slučaju klasične postavke eksperimenta koji podrazumeva ispitivanje uticaja jedne promenljive, dok se ostale održavaju konstantnim, ovakve interakcije ne bi bilo moguće otkriti (Armstrong, 2006).

Sistem postavke eksperimenta (dizajn eksperimenta) koji je 1926. godine opisao Fisher u svojoj knjizi „Dizajn eksperimenta“ je upravo namenjen prevazilaženju ovakvih poteškoća. Cilj je da se omogući istovremena procena uticaja većeg broja promenljivih na odgovor koji se prati, uključujući i njihove interakcije. Osim toga pruža se mogućnost da se sa unapred postavljenim nivoom značajnosti razdvoje promenljive koje imaju statistički značajan uticaj na praćeni odgovor od onih koje ga nemaju.

U prvoj fazi rada primenjen je 2^4 pun faktorijalni dizajn, koji podrazumeva postvaku od $2^4 = 16$ eksperimenata za svaki odgovor (ukupno 32 eksperimenata za dva odgovora, a svaki eksperiment je ponovljen tri puta). Ispitivan je uticaj 4 promenljive, a svaka od njih je varirana na dva nivoa (dve granične vrednosti). Ispitivane nezavisno promenljive (ulazi) su: odnos koncentracije lekovite supstance i natrijum-alginata (X_1), vrsta, odnosno molekulska masa hitozana (X_2), koncentracija hitozana u rastvoru za ojačavanje Ca-alginatnih mikročestica (X_3) i vreme trajanja inkubacije u rastvoru hitozana (X_4).

Vrednosti ostalih formulacionih i procesnih parametara, poput koncentracije natrijum-alginata, kalcijum-hlorida i protoka vazduha u *air jet* uređaju bile su identične za sve ispitivane formulacije, a podešene su na osnovu literaturnih podataka i optimizacije u koja je sprovedena u okviru preliminarnih istraživanja.

Za svaku ispitivanu formulaciju praćen je uticaj pomenutih promenljivih na srednje vrednosti efikasnosti inkapsulacije, EE% (Y_1) i vreme potrebno da se rastvori 50 % od inkapsuliranog leka iz mikročestca, $t_{50\%}$ (Y_2) (izlazi). Srednje vrednosti izračunate su kao aritmetička sredina eksperimentalno dobijenih vrednosti, nakon tri ponovljena eksperimenta. Analiza eksperimentalno dobijenih podataka izvršena je primenom softverskog paketa Design Expert 6.0.10. (Stat-Ease Inc, Minneapolis, SAD).

Značajnost uticaja faktora je procenjena ANOVA testom. Ispitivani faktori, njihove stvarne i kodirane vrednosti, prikazane su u tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Model formulacije, stvarne i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih za 2⁴ pun faktorijalni dizajn

Formulacija	Nezavisno promenljive (ulazi)			
	Odnos naproksen/natrijum- alginat, % (m/m) X₁	Vrsta hitozana X₂	Koncentracija hitozana, % (m/m) X₃	Vreme inkubacije, h X₄
	Stvarne (kodirane) vrednosti			
F1	1:1 (-1)	NMH (-1)	0,1 (-1)	1 (-1)
F2	1:1 (-1)	NMH (-1)	0,2 (1)	1 (-1)
F3	1:1 (-1)	VMH (1)	0,1 (-1)	1 (-1)
F4	1:1 (-1)	VMH (1)	0,2 (1)	1 (-1)
F5	1:2 (1)	NMH (-1)	0,1 (-1)	1 (-1)
F6	1:2 (1)	NMH (-1)	0,2 (1)	1 (-1)
F7	1:2 (1)	VMH (1)	0,1 (-1)	1 (-1)
F8	1:2 (1)	VMH (1)	0,2 (1)	1 (-1)
F9	1:1 (-1)	NMH (-1)	0,1 (-1)	24 (1)
F10	1:1 (-1)	NMH (-1)	0,2 (1)	24 (1)
F11	1:1 (-1)	VMH (1)	0,1 (-1)	24 (1)
F12	1:1 (-1)	VMH (1)	0,2 (1)	24 (1)
F13	1:2 (1)	NMH (-1)	0,1 (-1)	24 (1)
F14	1:2 (1)	NMH (-1)	0,2 (1)	24 (1)
F15	1:2 (1)	VMH (1)	0,1 (-1)	24 (1)
F16	1:2 (1)	VMH (1)	0,2 (1)	24 (1)

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. REZULTATI PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

5.1.1. Reološka ispitivanja disperzije model lekovite supstance u rastvoru natrijum-alginata

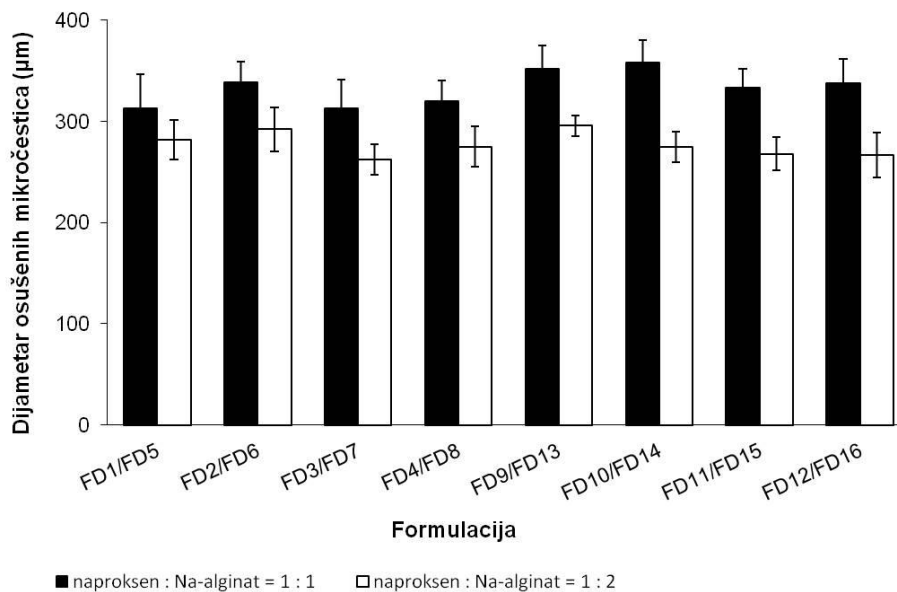
Reološke karakteristike disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata utiču na brzinu kojom se ona kreće kroz iglu šprica, ali i veličinu kapljica koje se otkidaju od vrha igle u koaksijalnom cilindru. Otuda proizilazi da veličina mikročestica nastalih nakon ukapavanja disperzije u gelirajući medijum, ne zavisi samo od karakteristika uređaja (npr. dijametra igle) i procesnih parametara (npr. pritiska vazduha koji potiskuje disperziju kroz iglu i brzine kretanja vazduha u koaksijalnom cilindru), nego i od reoloških karakteristika disperzije (Prüsse i sar., 2008).

Prividni viskoziteti disperzija korišćenih za izradu mikročestica ojačanih NMH i VMH pri brzini smicanja od 100 s^{-1} iznosili su $346 \pm 4,1$ i $406 \pm 5,2$ mPas za 1 % (m/m) i 2 % (m/m) disperzije naproksena u 2 % (m/m) rastvoru natrijum-alginata, redom.

5.1.2. Merenje veličine mikročestica

Srednje vrednosti dijametara osušenih mikročestica svih ispitivanih formulacija su se kretale u intervalu između $262,3 \pm 14,9$ i $358,4 \pm 21,7$ μm (slika 5.1.1). Za mikročestice dobijene geliranjem 2 % (m/m) disperzije naproksena u 2 % (m/m) rastvoru natrijum-alginata (odnos lek/polimer = 1/1) srednje vrednosti dijametara su se kretale u rasponu od $312,8 \pm 33,6$ do $358,4 \pm 21,7$ μm , a za mikročestice izrađene iz disperzije sa dvostruko manjim sadržajem naproksena (odnos lek/polimer = 1/2) između $262,3 \pm 2,3$ i $295,6 \pm 10,4$ μm . Značajno veći dijametri mikročestica dobijenih iz disperzije sa većim sadržajem naproksena se mogu pripisati razlikama u viskozitetima disperzija. Pri istim uslovima u uređaju, kapljice disperzije većeg prividnog viskoziteta teže se otkidaju od vrha igle, usled čega su nešto veće u odnosu na kapljice manje viskozne disperzije. Osim toga, kada je sadržaj naproksena u disperziji veći, očekivano je da bude veći njegov sadržaj u mikročesticama. Kristali naproksena u mikročesticama zauzimaju značajan prostor u strukturi mikročestica i svojim prisustvom umanjuju kontrakciju

hidrogel mreže prilikom postupka sušenja, te na taj način utiču na veličinu mikročestica nakon sušenja. Navedene pretpostavke potvrđuju skenirajuće elektronske mikrografije placebo mikročestica i mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (5.1.3). Nije uočen uticaj drugih formulacionih parametara niti vremena inkubacije u rastvoru hitozana na veličinu osušenih mikročestica.



Slika 5.1.1. Srednje vrednosti dijametara alginat-hitozan mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom (n = 100)

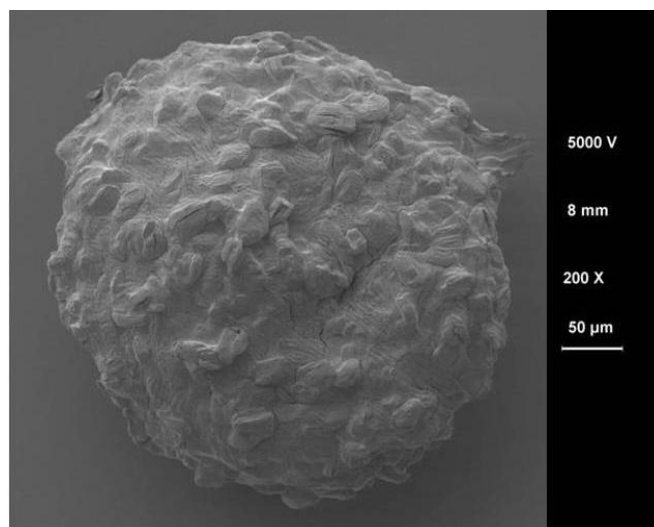
5.1.3. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica

Pregledom mikrografija mikročestica sa naproksenom može se zaključiti da su sve izrađene čestice imale blago deformisan sferičan oblik i neravnu površinu (slika 5.1.2). Do deformacije oblika mikročestica došlo je tokom procesa sušenja, iako je ovaj proces izveden pod blagim uslovima³. Preciznije, usled gubitka vlage došlo je do stvaranja šupljina u strukturi hidrogela što je praćeno kontrakcijom mreže gela, deformacijom sferičnog oblika i smanjenja veličine. Kontrakcija i deformacija oblika su bile manje izražene kod mikročestica sa inkapsuliranim kristalima naproksena u odnosu na placebo uzorke. Osim deformacije oblika i smanjenja veličine, proces sušenja je imao za posledicu i sporadičnu, parcijalnu i površinsku agregaciju mikročestica (slika 5.1.4).

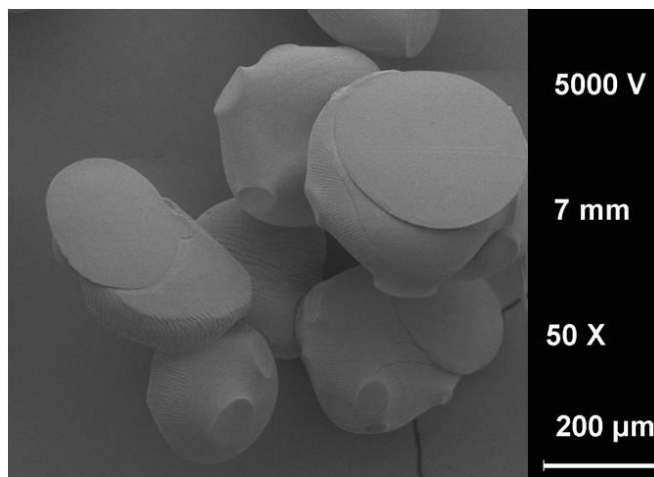
³ Sobna temperatura

Ovaj fenomen je posledica adhezivnosti polimera i njihovog međusobnog privlačenja (Cekic i sar., 2009), ali je reverzibilan, i primećeno je da se ubrzo nakon rehidracije čestice spontano razdvajaju.

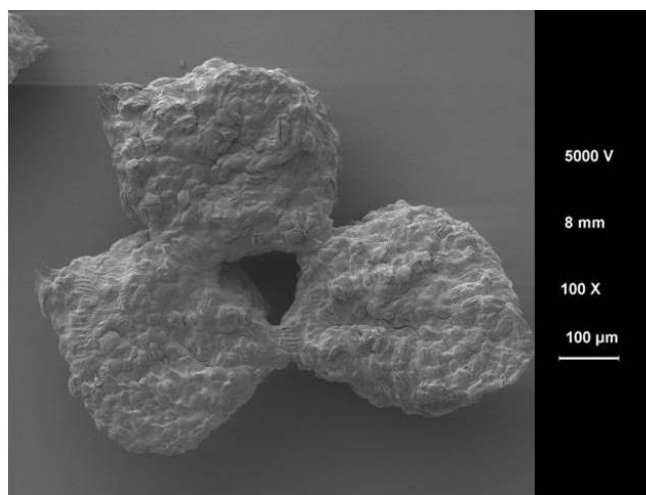
Uprkos navedenim nedostacima i dužini trajanja, na osnovu dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da je primenjeni postupak optimalan za sušenje izrađenih mikročestica. Naime, sušenje primenom visokih temperatura u slučaju hidrogelova, zbog njihovog visokog sadržaja vlage, praćeno je naglim isparavanjem velike količine vode što dovodi do mnogo intenzivnije deformacije oblika, a poroznost tako sušenih gelova je izraženija. Ovo je potvrđeno studijom koju su proveli Smrdel i saradnici 2008. godine, u okviru koje su poređene tri metode sušenja Ca-alginatnih mikročestica: sušenje zamrzavanjem, sušenje u *fluid bed* uređaju i sušenje na sobnoj temperaturi. Rezultati su pokazali da sušenje zamrzavanjem dovodi do pojave pora na mestima gde su se nalazili kristali leda, koji je naglo sublimovao, te nije bilo dovoljno vremena da se matriks mikročestica kontrahuje i zatvori nastale pore. U slučaju preostale dve metode gubitak vlage odvijao se znatno sporije, pa se i matriks mikročestica postepeno kontrahovao, dovodeći do smanjenja veličine mikročestica i deformacije sferičnog oblika. Međutim, kako je gubitak vlage bio sporiji prilikom sušenja na sobnoj temperaturi nego u komori *fluid bed* uređaja i kontrakcija ovako osušenih mikročestica bila je sporija, a finalni oblik mikročestica znatno pravilniji.



Slika 5.1.2. Skenirajuća elektronska mikrografija alginat-hitozan mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom (formulacija F1)



Slika 5.1.3. Skenirajuća elektronska mikrografija placebo uzorka alginat-hitozan mikročestica (jasno se uočava deformacija oblika do koje je došlo tokom procesa sušenja, i ravne strane na kojima su tokom sušenja mikročestice bile u kontaktu sa dnom Petri šolje)

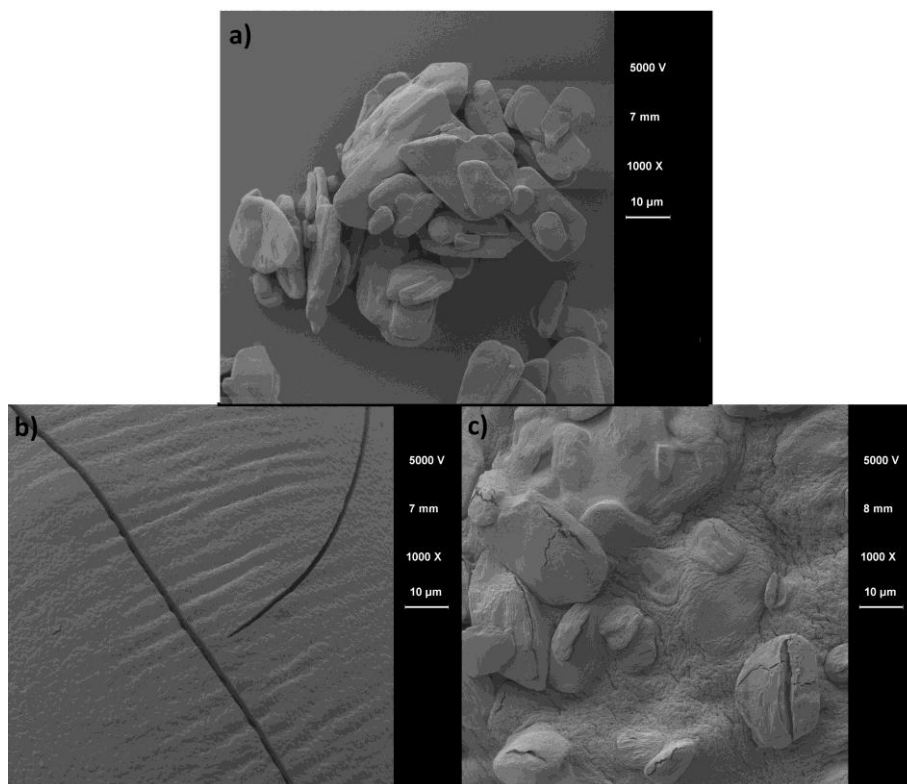


Slika 5.1.4. Skenirajuća elektronska mikrografija alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (formulacija F1) na kojoj se jasno uočava fenomen parcijalne aglomeracije susednih mikročestica do koga je došlo tokom procesa sušenja

Osim deformacija oblika usled gubitka vlage, u obliku većine posmatranih mikročestica može se uočiti deformacija u obliku suze, odnosno repa (slika 5.1.4). One se formiraju u koaksijalnom cilindru, prilikom odvajanja kapljica viskozne disperzije, a često su pojačane deformacijama oblika do kojih dolazi prilikom uranjanja kapljica u gelirajući medijum. Međutim, ovaj vid deformacije oblika kod mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom manje je izražen nego kod mikročestica dobijenih jednostepenim postupkom (Cekić i sar., 2009). To se može objasniti znatno većim

viskozitetom gelirajućeg medijuma kod jednostepenog postupka, usled prisustva hitozana, u odnosu na viskozitet rastvora kalcijum-hlorida koji se koristi kao gelirajući medijum u prvoj fazi dvostepenog postupka.

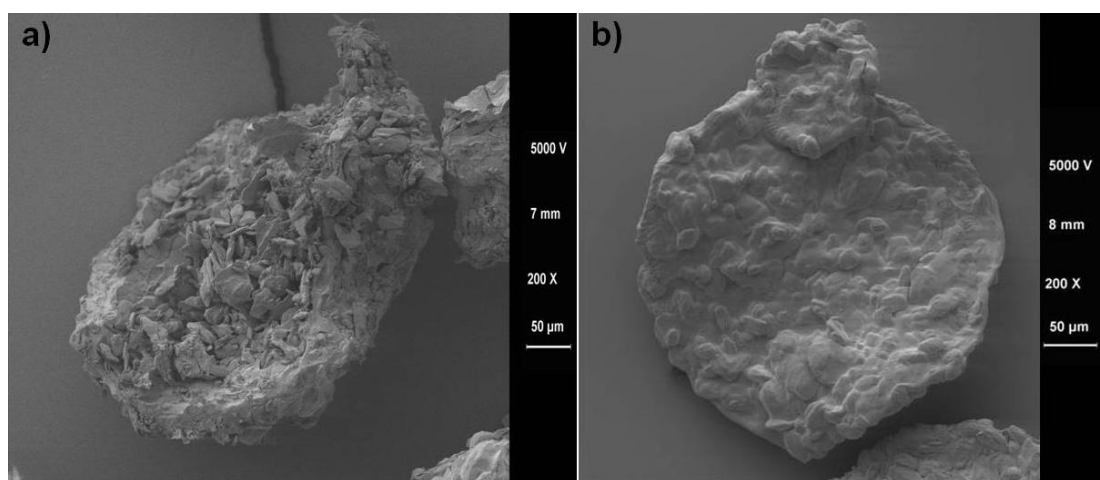
Neravnine uočene na površini svih mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom potiču od prisustva kristala naproksena. Dokaz za to je razlika u izgledu površine placebo mikročestica i mikročestica sa naproksenom (slika 5.1.5b i 5.1.5c). Osim toga, veličina neravnina i njihov oblik odgovaraju veličini i obliku kristala naproksena pre inkapsulacije (slika 5.1.5a). Ovo ujedno ukazuje na činjenicu da se naproksen u mikročesticama nalazi u neizmenjenom kristalnom stanju, što je u potpunosti u skladu sa rezultatima termalne i FT-IR analize (poglavlja 5.1.4 i 5.1.5).



Slika 5.1.5. Skenirajuće elektronske mikrografije: a) kristala naproksena; b) površine placebo alginat-hitozan mikročestice i c) površine alginat-hitozan mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom

Pukotine koje se mogu uočiti na površini placebo i mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (slika 5.1.5b i 5.1.5c) su najverovatnije posledica gubitka vode i smanjenja elastičnosti tokom procesa sušenja.

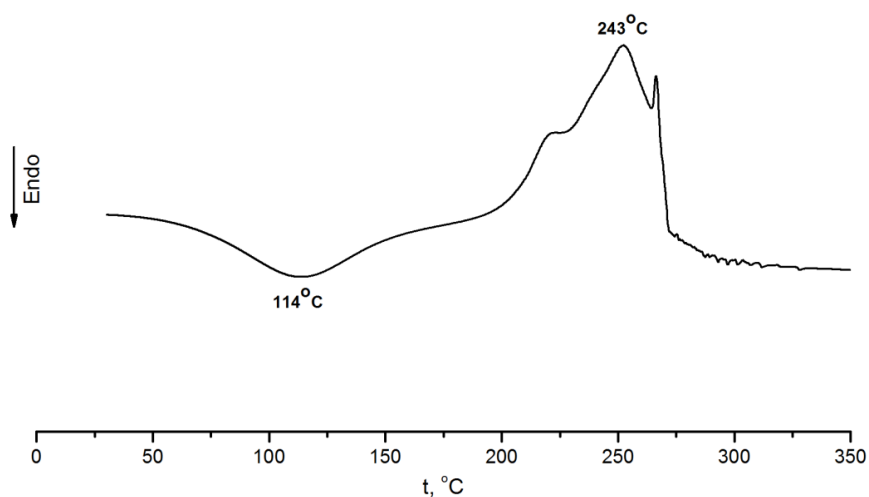
Prisustvo šupljine u unutrašnjoj strukturi mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom, pre i nakon tretiranja hitozanima velike molekulske mase (slika 5.1.6a i 5.1.6b), ukazuju da ovi hitozani nemaju značajniju sposobnost prodiranja dublje u jezgro mikročestica, već da se najvećim delom zadržava na površini gde formira polielektrolitni kompleks sa alginatom. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da hitozani koji su korišćeni u prvoj fazi istraživanja imaju velike molekulske mase i duge lance (4.1), te kao takvi ne mogu da prodiru u jezgro mikročestica.



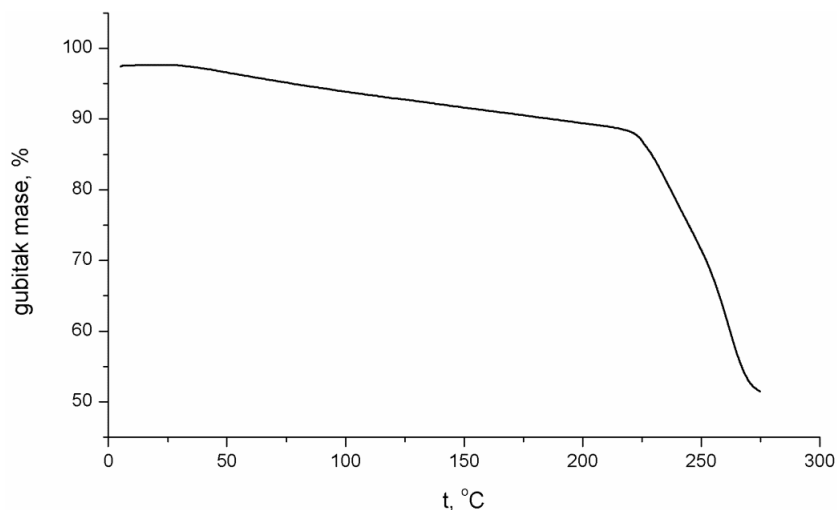
Slika 5.1.6. Skenirajuća elektronska mikrografija poprečnog preseka: a) Ca-alginatne mikročestice sa naproksenom i b) alginat-hitozan mikročestice sa naproksenom

5.1.4. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza

DSC termogram natrijum-alginata prikazan je na slici 5.1.7. Endoterma sa pikom na 114 °C se može pripisati gubitku vode. Isparavanje vode na relativno visokim temperaturama može se objasniti postojanjem jakih jon-dipol veza između $-\text{COO}^-$ grupa natrijum-alginata sa molekulima vode (Seon i sar., 2003). Široka egzoterma u opsegu između 200 i 280 °C potiče od degradacije natrijum-alginata koja je praćena dekarboksilacijom i oksidacionim procesima.



Slika 5.1.7. DSC termogram natrijum-alginata

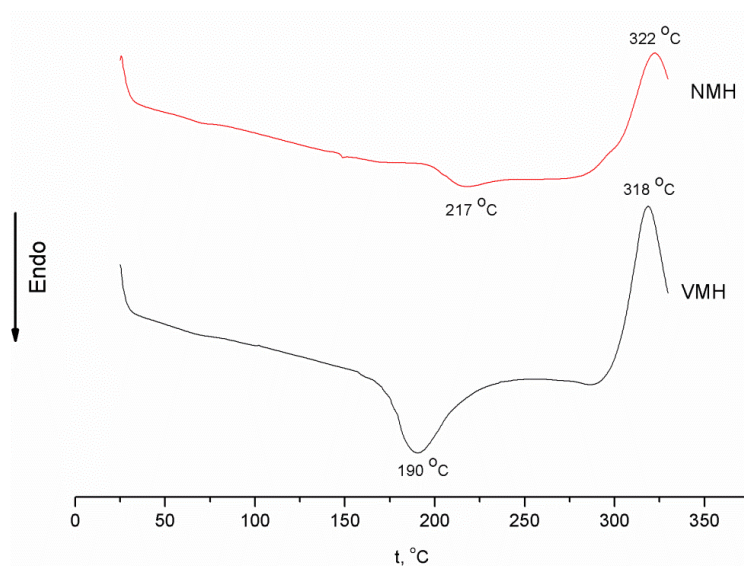


Slika 5.1.8. TG kriva natrijum-alginata

Ovi zaključci su u potpunost u skladu sa rezultatima TG analize natrijum-alginata (slika 5.1.8). Početni gubitak mase koji se može uočiti na TG krivoj natrijum-alginata odgovara postepenom gubitku vode, dok nagli pad koji počinje na približno 220 °C odgovara termalnoj degradaciji ovog polimera (Caykara i sar., 2005).

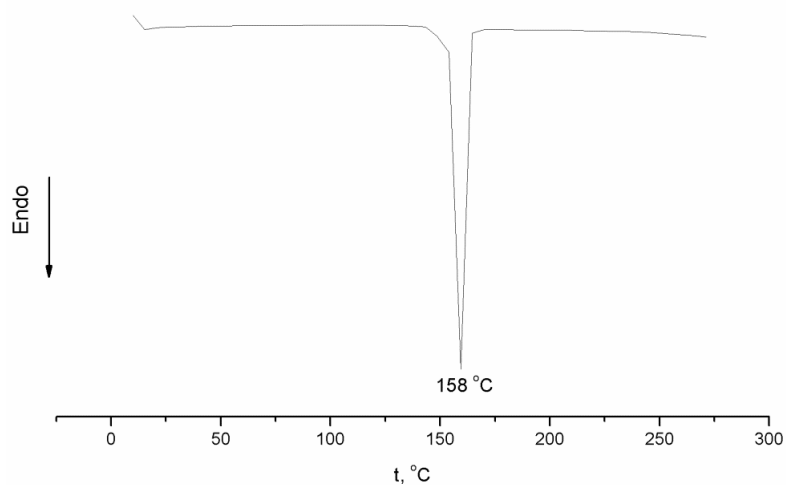
Na slici 5.1.9 su prikazani DSC termogrami nisko- i visokomolekularnog hitozana. Pikovi uočeni na 217 i 190 °C odgovaraju gubitku vode, dok se egzoterme sa pikovima na 322 i 318 °C mogu pripisati degradaciji nisko- i visokomolekularnog hitozana, redom (Dong i sar., 2004; Borges i sar., 2005). Ovakve termalne osobine

hitozana utvrđene primenom DSC analize su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima TG analize (Neto i sar., 2005).



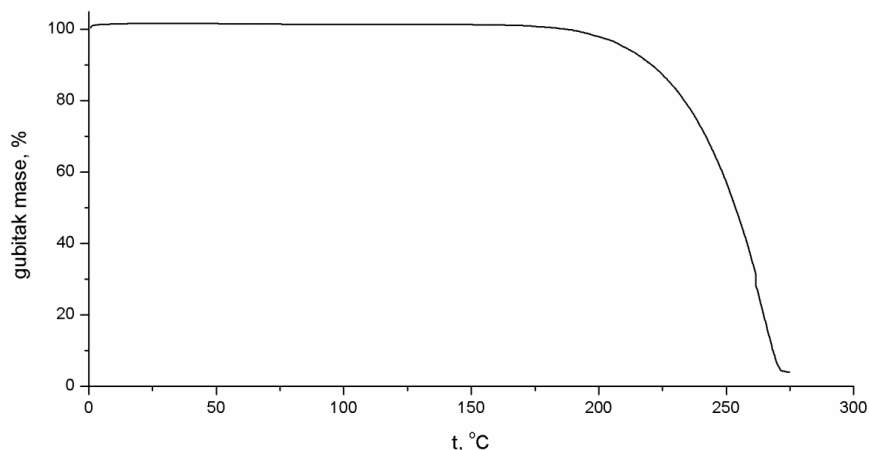
Slika 5.1.9. DSC termogrami NMH i VMH

Na DSC termogramu naproksena (slika 5.1.10) uočen je oštar pik na 158 °C koji odgovara tački topljenja.



Slika 5.1.10. DSC termogram naproksena

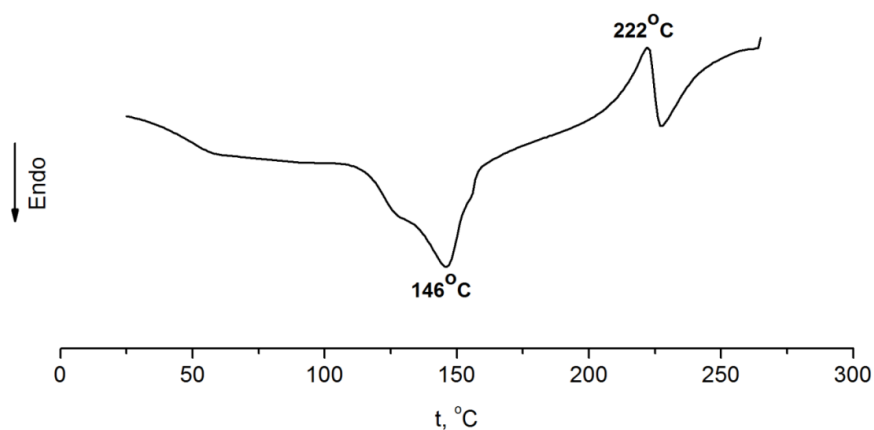
Rezultati TG analize potvrdili su da je reč o procesu topljenja, s obzirom da na TG krivoj naproksena nije uočena promena mase na ovoj temperaturi (slika 5.1.11). Gubitak mase koji počinje iznad 170 °C odgovara termalnoj degradaciji naproksena.



Slika 5.1.11. TG kriva naproksena

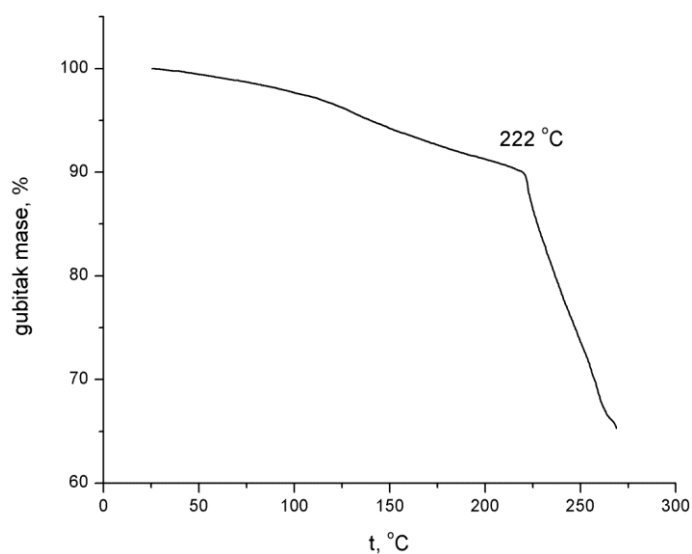
Na termogramu alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom, koji je prikazan na slici 5.1.12 nisu uočene degradacione egzoterme koje odgovaraju individualnim polimerima, ali je umesto njih uočena egzoterma sa pikom na 222 °C. Ova razlika između termograma polimera i mikročestica potvrđuje postojanje polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan čije su termalne karakteristike drugačije od termalnih karakteristika polimera koji ga formiraju (Crcarevska i sar., 2008). Slabo izražen endotermni pik na približno 50 °C potiče od gubitka vlage tokom zagrevanja. Endotermni pik na 146 °C potiče od topljenja inkapsuliranog naproksena, što je još jedna potvrda da je naproksen inkorporiran u strukturi mikročestica u svom prvobitnom kristalnom stanju. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da je naproksen bio suspendovan u rastvoru natrijum-alginata pre mikroinkapsulacije, te da je sam postupak izrade mikročestica izveden pri blagim uslovima⁴. Međutim, pomeranje pika koji odgovara topljenju naproksena ka nižim temperaturama, za par stepeni, ukazuje na moguće nekovalentne interakcije naproksena sa polimerima, najverovatnije između karboksilne grupe naproksena i hidroksilnih i amino grupa alginata, odnosno hitozana.

⁴ Na sobnoj temperaturi, bez upotrebe toksičnih i reaktivnih supstanci



Slika 5.1.12. DSC termogram alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (model formulacija F11)

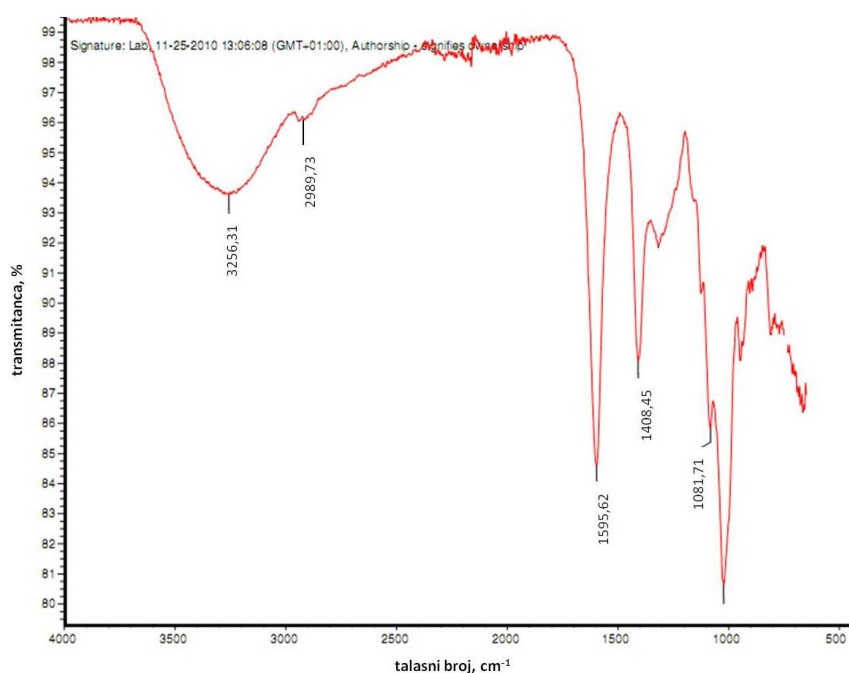
TG kriva ove formulacije mikročestica prikazana je na slici 5.1.13. Početni gubitak mase odgovara gubitku vode, a nagli pad krive uočen je na temperaturi od 222 °C. Ovaj nagli pad, odnosno gubitak mase, ide u prilog pretpostavci da egzotermni pik uočen na DSC termogramu pri istoj temperaturi odgovara degradaciji mikročestica.



Slika 5.1.13. TG kriva alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (model formulacija F11)

5.1.5. Infracrvena spektroskopska analiza

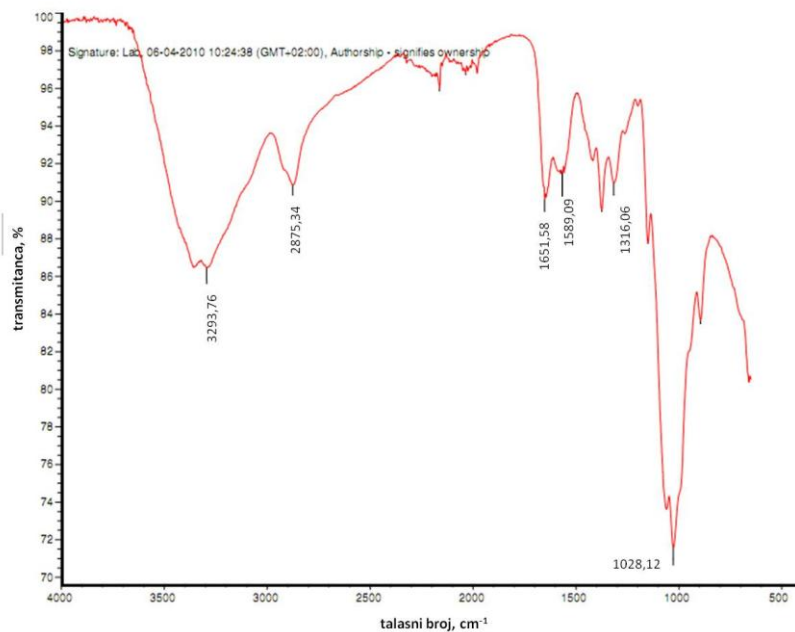
Infracrveni spektar natrijum-alginata prikazan je na slici 5.1.14. Na spektru su uočene široka traka sa pikom na 3256 cm^{-1} koja potiče od O–H istezanja hidroksilnih grupa, traka između 3000 i 2900 cm^{-1} koja potiče od C–H istezanja, veoma oštra i intenzivna traka sa pikom na 1595 cm^{-1} koja potiče od asimetričnog COO^- istezanja i srednje oštra traka sa pikom na 1408 cm^{-1} koja potiče od simetričnog COO^- istezanja. Oštra traka sa pikom na 1081 cm^{-1} odgovara istezanju C–O–C mosta u cikličnoj strukturi natrijum-alginata (Sartori i sar., 1997; Lawrie i sar., 2007).



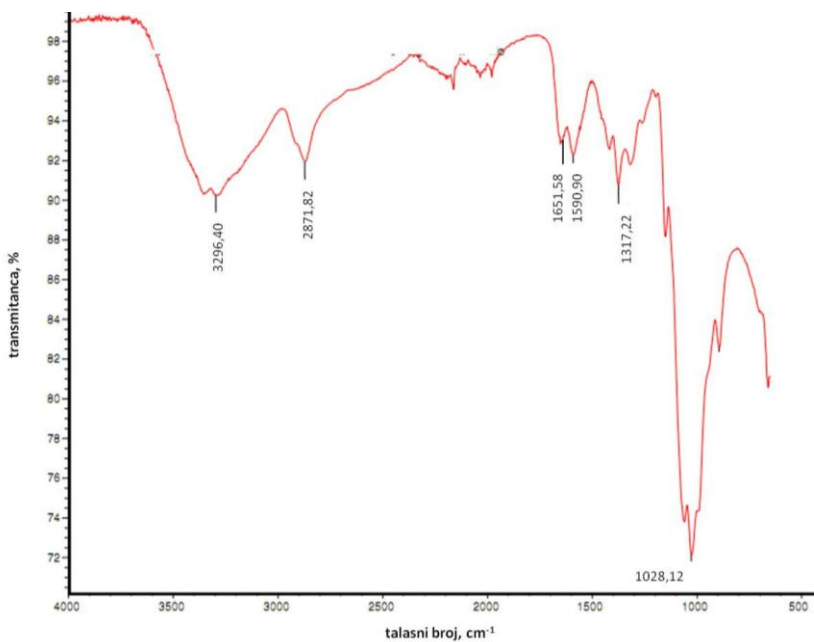
Slika 5.1.14. FT-IR spektar natrijum-alginata

Infracrveni spektri nisko- i visokomolekularnog hitozana prikazani su na slikama 5.1.15 i 5.1.16. Uzimajući u obzir da su oba polimera visokog stepena deacetilacije, i da je njihova hemijska struktura identična, sličnost njihovih spektara je očekivana. Apsorpcione trake sa pikovima u oblasti između 3300 i 3200 cm^{-1} potiču od O–H istezanja hidroksilnih grupa, dok trake sa pikovima oko 2875 cm^{-1} potiču od C–H istezanja (simetričnih i asimetričnih) (Tien CL i sar., 2003). Trake sa pikom na 1318 cm^{-1} odnosno 1317 cm^{-1} potiču od N–acetil rezidua vezanih za šećerni ostatak, potvrđujući prisustvo N–acetil ostataka, odnosno da je deacetilacija hitina samo

parcijalna (Brugnerotto i sar., 2001; Sarmento i sar., 2006; Lawrie i sar., 2007). Pikovi koji se javljaju na 1651 cm^{-1} i 1589 cm^{-1} odgovaraju amid I (C=O istežanje) i amid II (N–H savijanje) vibracijama, dok pik na 1028 cm^{-1} potiče od skeletnih C–O vibracija (Tien CL i sar., 2003, Sarmento i sar., 2006; Lawrie i sar., 2007).

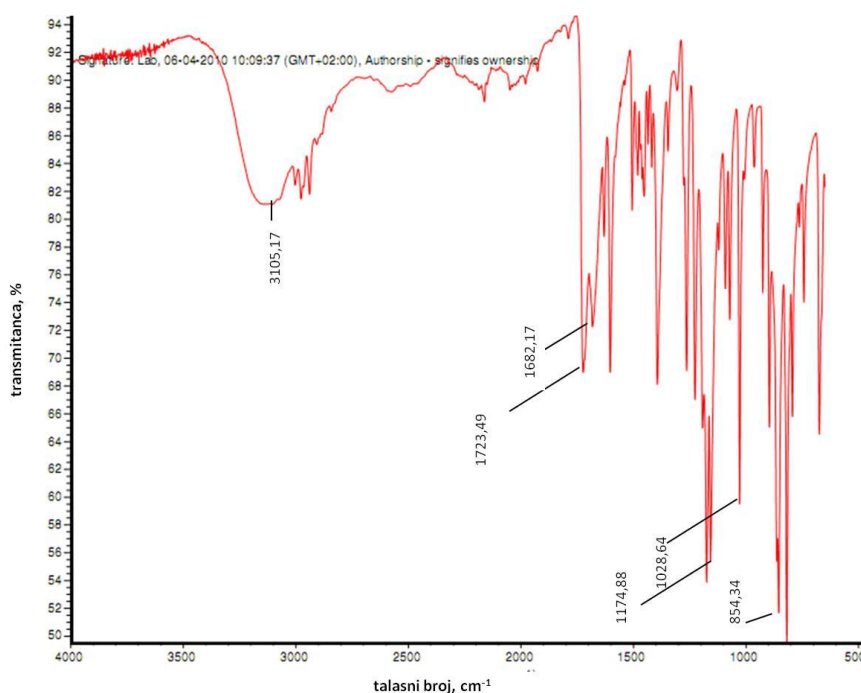


Slika 5.1.15. FT-IR spektar viskomolekularnog hitozana



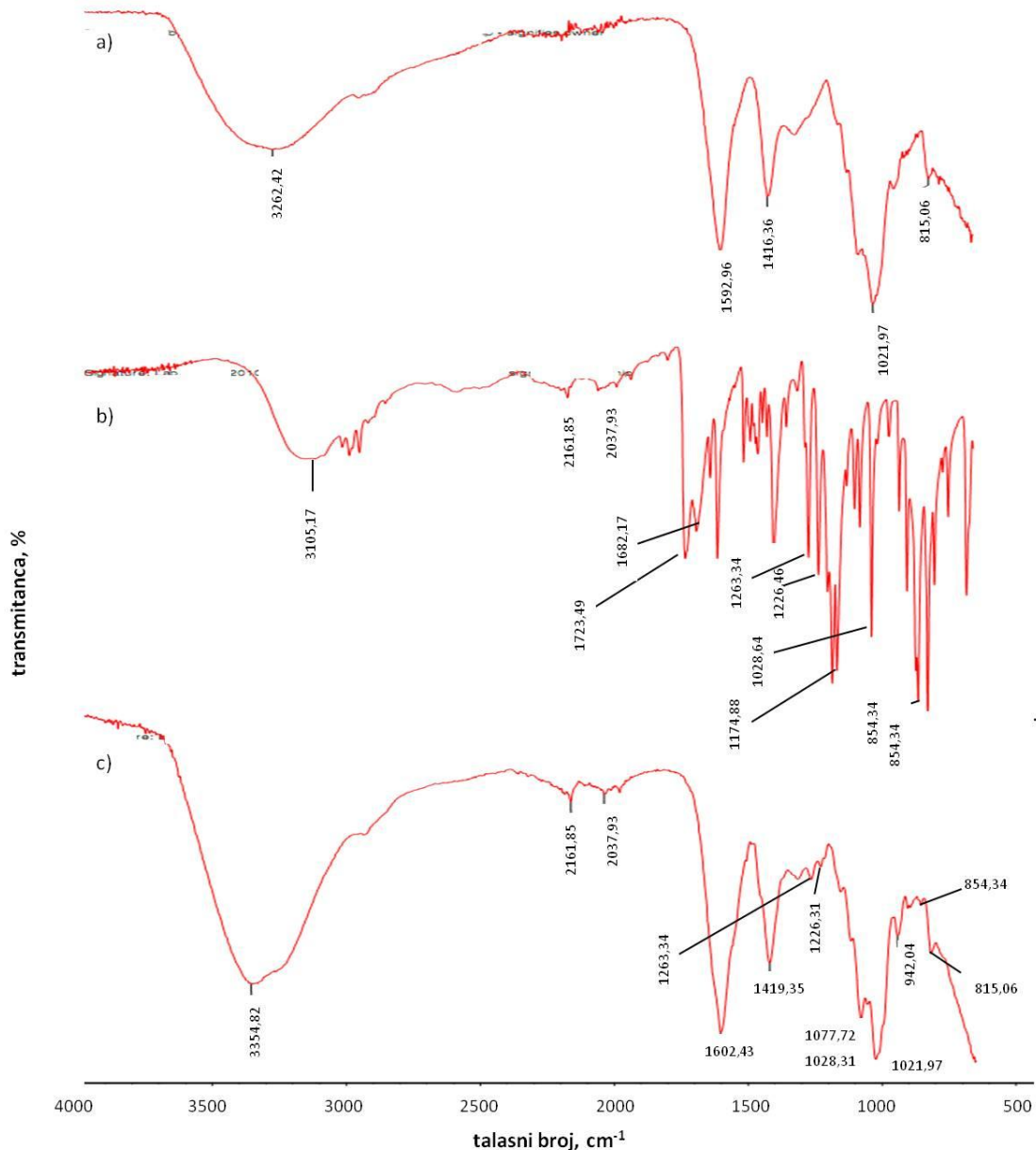
Slika 5.1.16. FT-IR spektar niskomolekularnog hitozana

Na infracrvenom spektru naproksena predstavljenom na slici 5.1.17 mogu se uočiti brojne apsorpcione trake koje potiču od funkcionalnih grupa prisutnih u strukturi njegovih molekula: trake slabog intenziteta u oblasti visokih talasnih brojeva između 4000 cm^{-1} i 2500 cm^{-1} koje potiču od O–H i C–H istezanja, zatim trake C–O istezajućih vibracija karboksilnih grupa, nevezanih ili povezanih vodoničnim vezama sa pikovima na 1723 cm^{-1} i 1682 cm^{-1} , i trake asimetričnog, simetričnog i C–O istezanja etarske grupe na 1028 cm^{-1} , 854 cm^{-1} i 1174 cm^{-1} , redom (Junco i sar., 2002; Carriazo i sar., 2010).



Slika 5.1.17. FT-IR spektar naproksena

Poređenjem spektara placebo alginat-hitozan mikročestica i alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (slika 5.1.18) može se uočiti da se spektri razlikuju upravo u odsustvu/prisustvu apsorpcionih traka koji potiču od funkcionalnih grupa prisutnih u strukturi naproksena. Ovim je potvrđeno da tokom inkapsulacije ne dolazi do hemijske interakcije naproksena sa polimerima, i da je naproksen inkapsuliran u svom neizmenjenom stanju. Ovakvi rezultati spektroskopske infracrvene analize su u punoj korelaciji sa rezultatima termalne analize (5.1.4).



Slika 5.1.18. FT-IR spektri: a) placebo alginat-hitozan mikročestica; b) naproksena i c) alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom

5.1.6. Određivanje sadržaja model lekovite supstance

Sadržaj naproksena u osušenim mikročesticama kretao se u intervalu između $37,1 \pm 1,3$ i $44,1 \pm 1,0$ % (tabela 5.1.1). Kao što je očekivano, mikročestice dobijene inkapsulacijom disperzije sa većim sadržajem naproksena (F1 - F4 i F9 - F12) imale su veće opterećenje naproksenom. Poređenjem formulacija inkubiranih u rastvoru hitozana tokom 1 (F1 – F8) i 24 sata (F9 – F16) uočeno je da produženje vremena inkubacije

dovodi do smanjenja sadržaja naproksena. Ovo se može objasniti difuzijom lekovite supstance iz mikročestica tokom procesa inkubacije, čemu verovatno u određenoj meri doprinosi mešanje medijuma. Poređenjem vrednosti DL% formulacija izrađenih primenom hitozana različitih molekulskih masa i njihovih koncentracija nije uočen značajan uticaj ovih formulacionih faktora na sadržaj naproksena.

Tabela 5.1.1. Sadržaj naproksena u ispitivanim formulacijama alginat-hitozan mikročestica nakon sušenja (n=3)

Formulacija	DL% ± s.d.	Formulacija	DL% ± s.d.
F1	44,1 ± 1,0	F9	42,4 ± 2,1
F2	42,3 ± 1,7	F10	42,8 ± 3,0
F3	43,1 ± 2,1	F11	41,9 ± 1,2
F4	43,2 ± 2,7	F12	39,9 ± 2,0
F5	41,2 ± 1,6	F13	38,2 ± 3,1
F6	41,1 ± 1,9	F14	37,6 ± 1,8
F7	39,1 ± 1,5	F15	38,8 ± 2,1
F8	40,0 ± 1,2	F16	37,1 ± 1,3

5.1.7. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Vrednosti efikasnosti inkapsulacije svih ispitivanih formulacija su se kretale između $75,2 \pm 2,2$ i $84,5 \pm 2,2$ % (tabela 5.1.2). Ove relativno visoke vrednosti posledica su brze reakcije jonotropnog geliranja koja počinje onog trenutka kada kapljice disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata dođu u kontakt sa gelirajućim medijumom. Ova reakcija prvo se odvija na površini kapljica i dovodi do momentalnog formiranja Ca-alginatnog omotača koji otežava "curenje" naproksena u okolni medijum. Osim toga, slaba rastvorljivost naproksena, kao slabe kiseline, u rastvoru hitozana čija je pH vrednost podešena na 5,5 pomoću acetatnog pufera, značajno ograničava gubitak inkapsuliranog leka tokom druge faze mikroinkapsulacije. Kako bi se detaljnije ispitalo kada dolazi do gubitka leka, rastvor kalcijum-hlorida (gelirajući medijum u prvoj fazi mikroinkapsulacije) je nakon filtracije podvrgnut spektrofotometrijskoj analizi (4.2.10). Na isti način vršeno je ispitivanje rastvora hitozana koji je upotrebljen u drugoj fazi

mikroinkapsulacije. Rezultati spektrofotometrijske analize potvrdili su da do gubitka leka dolazi tokom obe faze postupka mikroinkapsulacije. Gubitak naproksena tokom prve faze može se pripisati porozitetu nastalog Ca-alginatnog hidrogela (Gåserød i sar., 1998). Tokom inkubacije Ca-alginatnih mikročestica voda prodire kroz pore hidrogel mreže i rastvara inkapsulirani naproksen koji potom difuzijom izlazi iz mikročestica. Osim toga, prisustvo naproksena u gelirajućem medijumu moguće je pripisati i rastvaranju kristala naproksena čije je prisustvo na površini mikročestica potvrđeno skenirajućom elektronskom mikroskopijom (slika 5.1.5). Evidentne razlike između vrednosti EE% mikročestica inkubiranih u rastvoru hitozana tokom 1 (F1 – F8) i 24 sata (F9 – F16) još su jedna potvrda da do gubitka naproksena dolazi i tokom druge faze postupka mikroinkapsulacije. Drugim rečima, manje vrednosti EE% mikročestica koje su duže inkubirane ukazuju na činjenicu da inkapsulirani naproksen izlazi iz mikročestica tokom inkubacije u rastvoru hitozana, te da je količina leka koji se gubi tokom ove faze srazmerna vremenu inkubacije.

Tabela 5.1.2. Efikasnost inkapsulacije ispitivanih formulacija alginat-hitozan mikročestica (n=3)

Formulacija	EE% ± s.d.	Formulacija	EE% ± s.d.
F1	84,2 ± 2,6	F9	79,6 ± 2,2
F2	84,5 ± 2,2	F10	79,2 ± 2,0
F3	84,2 ± 1,8	F11	80,1 ± 1,3
F4	83,6 ± 2,5	F12	79,7 ± 1,2
F5	81,0 ± 2,7	F13	75,9 ± 1,7
F6	79,9 ± 0,8	F14	75,9 ± 1,8
F7	78,9 ± 2,4	F15	75,2 ± 2,2
F8	79,1 ± 3,2	F16	75,3 ± 1,5

Primenom eksperimentalnog dizajna u kome su vrednosti EE% postavljene kao zavisno promenljive uočeno je da od ispitivanih nezavisno promenljivih (4.2.16) statistički značajan uticaj imaju odnos lek/polimer i vreme inkubacije. Uprkos mogućim interakcijama između negativno naelektrisanih $-\text{COO}^-$ jona naproksena i pozitivno naelektrisanih $-\text{NH}_3^+$ jona, na koje ukazuju i rezultati DSC analize, nije uočen statistički

značajan uticaj koncentracije hitozana na EE% ($p > 0,05$). S obzirom da molekulska masa i koncentracija hitozana nemaju statistički značajan uticaj na EE%, ove promenljive su isključene iz dalje statističke analize.

Izračunate vrednosti faktorskih efekata na EE% prikazane su u tabeli 5.1.3. Negativne vrednosti faktorskih efekata odnosa lek/polimer i vremena inkubacije mikročestica u rastvoru hitozana ukazuju da promenom vrednosti ovih promenljivih sa nižeg na viši nivo opada EE%. Negativan uticaj vremena inkubacije u rastvoru hitozana na EE% može se jednostavno objasniti gubitkom model lekovite supstance iz mikročestica tokom ove faze postupka izrade mikročestica. Što je vreme inkubacije duže, očekivano je da gubitak naproksena bude veći, a time i manja vrednost EE%. Uticaj odnosa lek/polimer na gubitak leka tokom postupka izrade mikročestica, a tako posredno i na EE%, može se pripisati slaboj rastvorljivosti naproksena u gelirajućem medijumu i rastvoru hitozana. Slaba rastvorljivost naproksena je faktor koji ograničava njegovu difuziju u okolni medijum, te se gubitak lekovite supstance prouzrokovan difuzijom zaustavlja onog trenutka kada dođe do zasićenja medijuma naproksenom. Kada je inkapsulirana disperzija sadržala 2 % (m/m) naproksena (odnos lek/polimer = 1/1), procentualno manja količina naproksena je difundovala iz mikročestica do trenutka postizanja zasićenja, nego kada je sadržaj leka u disperziji bio dvostruko manji.

Tabela 5.1.3. Analiza varijanse za faktorske efekte na efikasnost inkapsulacije ispitivanih alginat-hitozan mikročestica

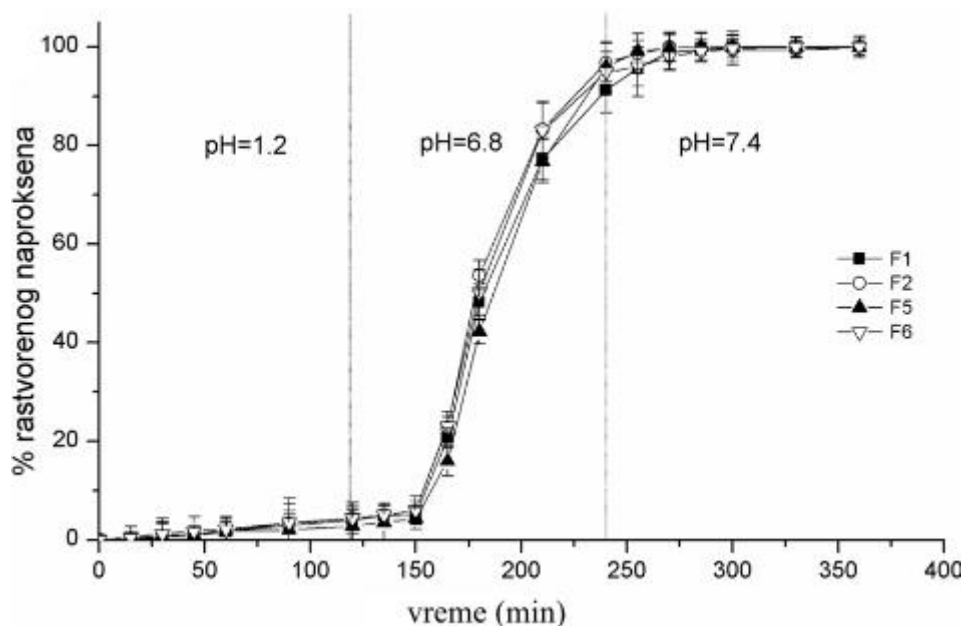
	SK*	BSS**	SK/BSS	F vrednost	Efekat	p vrednost
Model	145,70	2	72,85	242,77		< 0,0001
odnos lek/polimer	71,53	1	71,53	238,36	-2,11	< 0,0001
vreme inkubacije	74,18	1	74,18	247,18	-2,15	< 0,0001
Rezidui	3,90	13	0,30			
Ukupno	149,61	15				

*SK – suma kvadrata

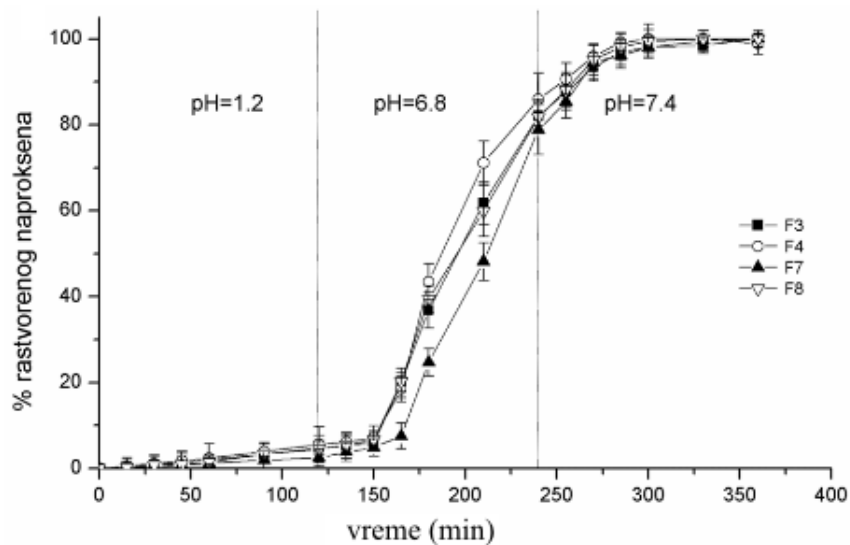
**BSS – broj stepeni slobode

5.1.8. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica

Rezultati dobijeni ispitivanjem brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica *in vitro* prikazani su grafički na slikama 5.1.19 – 5.1.22. Kod svih ispitivanih formulacija uočeno je da se u veštačkom želudačnom soku naproksen oslobađao sporo, a procenat rastvorenog naproksena nakon 2 sata eksperimenta kretao se između 2,9 i 6,2 %. Sporo oslobađanje naproksena u kiselom medijumu (pH vrednosti ~ 1,2) može se pripisati slaboj rastvorljivosti naproksena kao slabe kiseline, pri ovako niskim pH vrednostima i slabo izraženoj sposobnosti bubrenja alginat-hitozan polielektrolitnog kompleksa u kiseloj sredini (Dai i sar., 2008). U skladu sa ovim, moguće je pretpostaviti da najveći deo naproksena oslobođenog u kiselom medijumu potiče od kristala koji su uočeni na površini mikročestica prilikom analize skenirajućim elektronskim mikroskopom (slika 5.1.5).

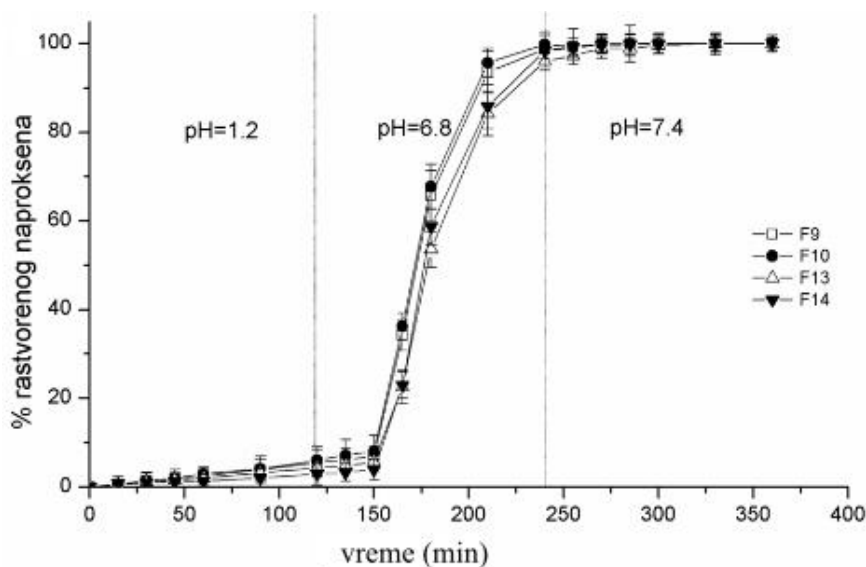


Slika 5.1.19. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih mikročestica inkubiranih 1 sat u rastvoru niskomolekularnog hitozana

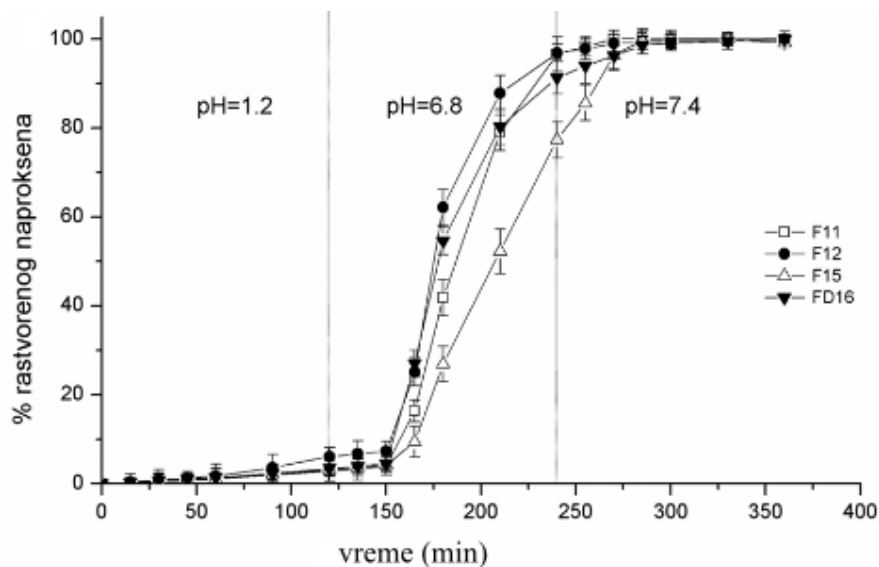


Slika 5.1.20. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih mikročestica inkubiranih 1 sat u rastvoru visokomolekularnog hitozana

Ubrzo nakon izmene medijuma i porasta pH vrednosti do 6,8 uočen je nagli porast brzine oslobađanja inkapsuliranog naproksena. Osnovni razlog za ovaj fenomen je naglo preuzimanje vode i bubrenje mikročestica. Tokom ovog procesa dolazi do obrazovanja viskozne barijere hidrogela koja je od značaja za kontrolu difuzije rastvorenog naproksena iz mikročestica u okolni medijum. Ove pretpostavke potvrđuju rezultati dobijeni primenom matematičkih modela za procenu brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica (5.1.9).



Slika 5.1.21. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih mikročestica inkubiranih 24 sata u rastvoru niskomolekularnog hitozana



Slika 5.1.22. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih mikročestica inkubiranih 24 sata u rastvoru visokomolekularnog hitozana

Iako su sve ispitivane mikročestice imale slične profile oslobađanja, koji se odlikuju sporim rastvaranjem inkapsuliranog naproksena u veštačkom želudačnom soku, a nakon porasta pH vrednosti dolazi do naglog porasta brzine kojom se naproksen rastvara iz mikročestica, uočene su izvesne razlike u brzinama rastvaranja naproksena između različitih formulacija. Ove razlike su bile uočljive naročito nakon porasta pH vrednosti medijuma na 6,8. Da bi se detaljnije proučio uticaj formulacionih faktora i vremena inkubacije na profile oslobađanja leka iz mikročestica primenjen je pun 2^4 eksperimentalni dizajn (tabela 4.7), gde su zavisno promenljive bila vremena potrebna za oslobađanje 50 % inkapsuliranog naproksena za svaku formulaciju – $t_{50\%}$. Vrednosti $t_{50\%}$ za sve formulacije su prikazane u tabeli 5.1.4.

Tabela 5.1.4. Vrednosti $t_{50\%}$ za ispitivane formulacije alginat-hitozan mikročestica ($n=3$)

Formulacija	$t_{50\%}$ (min)	Formulacija	$t_{50\%}$ (min)
F1	182	F9	172
F2	178	F10	170
F3	194	F11	186
F4	187	F12	174
F5	186	F13	178
F6	180	F14	176
F7	212	F15	208
F8	194	F16	177

Rezultati ANOVE za faktorske efekte na $t_{50\%}$ ispitivanih alginat-hitozan mikročestica prikazani su u tabeli 5.1.5, a vrednosti izračunatih faktorskih efekata na slici 5.1.23. Iz tabele 5.1.5. može se videti da svi ispitivani faktori imaju statistički značajan uticaj na $t_{50\%}$ ($p < 0,05$).

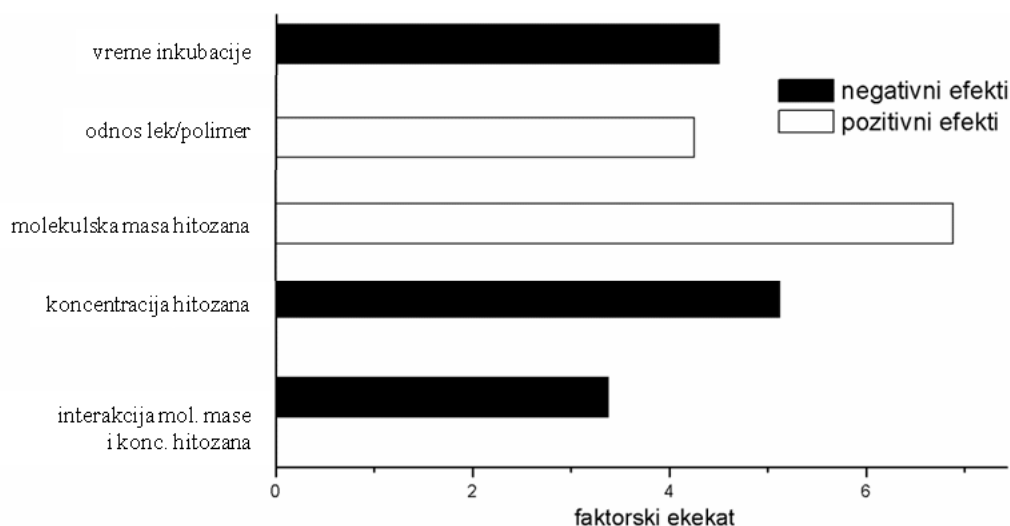
Tabela 5.1.5. Analiza varijanse za faktorske efekte na $t_{50\%}$ ispitivanih alginat-hitozan mikročestica

	SK*	BSS**	SK/BSS	F vrednost	p vrednost
Model	1971,75	5	394,35	16,16	0,0002
odnos lek/polimer	289,00	1	289,00	11,84	0,0063
vrsta hitozana	756,25	1	756,25	30,99	0,0020
koncentracija hitozana	420,25	1	420,25	17,22	0,0045
vreme inkubacije	324,00	1	324,00	13,28	0,0211
interakcija vrste i konc. hitozana	182,25		182,25	7,47	
Rezidui	244,00	10	24,40		
Ukupno	2215,75	15			

*SK – suma kvadrata

** BSS – broj stepeni slobode

Kao što se može videti na slici 5.1.23, odnos naproksena i natrijum-alginata ima pozitivan uticaj na $t_{50\%}$. Kada se vrednost ovog faktora menja sa nižeg (1/1) na veći nivo (1:/2) dolazi do smanjenja brzine kojom se inkapsulirani naproksen rastvara i izlazi iz mikročestica (tj. raste $t_{50\%}$). Rezultati ranijih studija ukazuju da uticaj odnosa lek/polimer na oslobađanje lekovite supstance može da zavisi od njenih osobina, kao što je molekulska masa, ali i mogućih interakcija sa natrijum-alginatom (Kim i Lee, 1992; Acartürk i Takka, 1999). Kako je termalnom analizom potvrđeno da je naproksen inkapsuliran u prvobitnom, kristalnom stanju, moguće je isključiti svaki značajan uticaj interakcija naproksena i natrijum-alginata na brzinu oslobađanja naproksena iz mikročestica. Eliminacijom ovog faktora, može se zaključiti da uočeni uticaj odnosa lek/polimer na oslobađanje naproksena najverovatnije potiče od većeg sadržaja polimera u odnosu na inkapsuliranu model lekovitu supstancu (F5-F8, F13-F16). Mikročestice sa većim sadržajem polimera imaju sposobnost da nakon bubrenja obrazuju postojanije i viskoznije gelove, te se na taj način postiže sporije oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance. Ovo objašnjenje je u korelaciji sa rezultatima analize kinetike oslobađanja (5.1.9), koja je pokazala da je oslobađanje naproksena strogo kontrolisano relaksacijom lanaca polimera i bubrenjem.

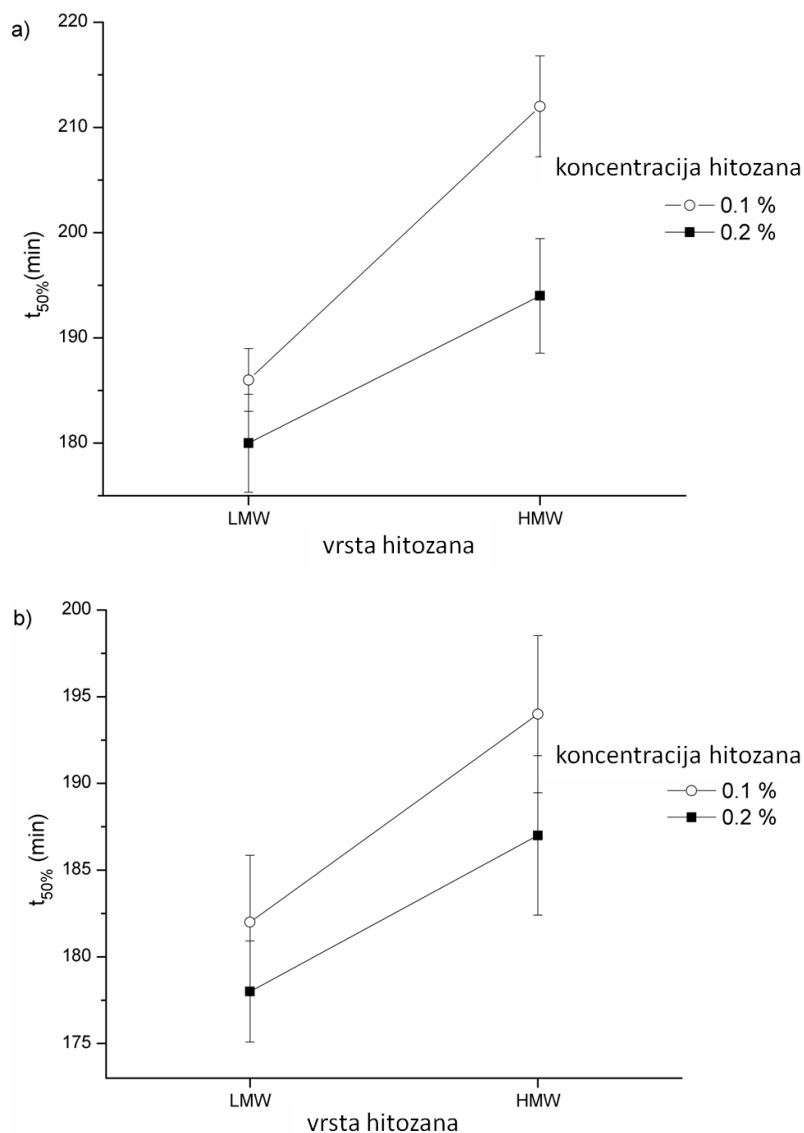


Slika 5.1.23. Uticaj vremena inkubacije, formulacionih faktora i njihovih interakcija na $t_{50\%}$

Među ispitivanim faktorima, molekulska masa hitozana imala je najveći uticaj na brzinu oslobađanja inkapsuliranog naproksena (slika 5.1.23). Pozitivna vrednost

ovog faktorskog efekta ukazuje da hitozan veće molekulske mase pod istim uslovima obezbeđuje sporije oslobađanje naproksena iz mikročestica. Ovi rezultati nisu bili iznenađujući, s obzirom da su prethodne studije potvrdile da hitozani veće molekulske mase imaju sposobnost da obrazuju manje permeabilne i postojanije omotače polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan na površini mikročestica u odnosu na hitozane male molekulske mase (Polk i sar., 1994; Ribeiro i sar., 1999).

Naproksen se brže oslobađao iz mikročestica dobijenih inkubacijom u rastvorima nisko- i visokomolekularnog hitozana veće koncentracije (0,2 % (m/m)), u odnosu na mikročestice inkubirane u rastvorima hitozana manje koncentracije (0,1 % (m/m)). Stoga je izračunati faktorski efekat koji opisuje uticaj koncentracije hitozana u rastvoru za oblaganje imao negativnu vrednost (slika 5.1.23). Ovaj fenomen je moguće objasniti uticajem viskoziteta rastvora hitozana na brzinu i stepen u kome se hitozan vezuje za Ca-alginat mikročestice. Povećanjem molekulske mase hitozana raste i viskozitet rastvora za oblaganje, što otežava vezivanje lanaca hitozana i formiranje polielektrolitnog kompleksa. U prilog ovoj pretpostavci ide statistički značajna interakcija molekulske mase i koncentracije hitozana (slika 5.1.23). Statistička značajnost ove interakcije ukazuje da uticaj koncentracije hitozana u rastvoru za oblaganje zavisi od molekulske mase hitozana, dok negativni predznak faktorskog efekta interakcije ukazuje da porast koncentracije hitozana ima za posledicu veće smanjenje $t_{50\%}$ kada je upotrebljen hitozan veće molekulske mase (slika 5.1.24a i 5.1.24b). Reološka analiza je pokazala da je prividni viskozitet rastvora visokomolekularnog hitozana (2,89 mPa·s za 0,1 i 26,95 mPa·s za 0,2 % (m/m) rastvor na 20 °C) značajno veći u poređenju sa viskozitetom rastvora niskomolekularnog hitozana (1,52 mPa·s za 0,1% i 6,17 mPa·s za 0,2 % (m/m) rastvor na 20 °C). Ovi rezultati su u skladu sa zaključkom da viskozitet rastvora za oblaganje ima značajan uticaj na formiranje polielektrolitnog kompleksa.



Slika 5.1.24. Interakcija između tipa (molekulske mase) i koncentracije hitozana na $t_{50\%}$ mikročestica inkubiranih 1 sat u rastvoru hitozana: a) odnos lek/ polimer = 1/2 i b) odnos lek/polimer = 1/1

Negativan predznak faktorskog efekta vremena inkubacije Ca-alginatnih mikročestica u rastvoru hitozana (slika 5.1.23) ukazuje da produženje vremena inkubacije sa 1 na 24 sata dovodi do smanjenja $t_{50\%}$. Najverovatnije hitozan se vezuje za mikročestice samo tokom prvog sata inkubacije, a dalja inkubacija uz mešanje dovodi do destabilizacije nastalog polielektrolitnog kompleksa, što za posledicu ima brže oslobađanje naproksena iz ovakvih mikročestica u odnosu na mikročestice koje su izdvojene iz rastvora hitozana nakon jednog sata inkubacije.

5.1.9. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica

Poređenjem koeficijenta determinacije svih primenjenih matematičkih modela koji su prikazani u tabeli 5.1.6, može se zaključiti da *Korsmeyer-Peppas* model najbolje opisuje oslobađanje naproksena iz ispitivanih mikročestica. Vrednosti *Korsmeyer-Peppas* eksponenta (n) za sve formulacije su se kretale u opsegu od 1,62 do 3,73. Vrednosti $n > 1$ ukazuju da mehanizam oslobađanja naproksena iz mikročestica odgovara super slučaju II transporta (Peppas i Sahlin, 1989). Ovakav mehanizam oslobađanja karakterističan je za nosače lekova izrađenih od hidrofilnih polimera koji imaju izraženu sposobnost bubrenja, a javlja se usled velikog porasta osmotskog pritiska praćenog relaksacijom lanaca polimera (Brazel i Peppas, 1999).

Relativni doprinos mehanizama difuzije i relaksacije (bubrenja) oslobađanju naproksena iz mikročestica analiziran je primenom *Peppas-Sahlin* modela. Poređenjem vrednosti k_d i k_r može se zaključiti da je proces relaksacije dominantan ($k_r/k_d > 1$). Negativne vrednosti k_d mogu se pripisati praktično zanemarljivom uticaju procesa difuzije u odnosu na mehanizam relaksacije, a slična pojava je ranije opisana kod nekih matriksnih sistema slične prirode, sačinjenih od hidrofilnih polimera koji intenzivno bubre (Ferrero i sar., 2000; Cárdenas i sar., 2003; Llabot i sar., 2004). Ovakvi zaključci su u skladu sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja naproksena. Naime, intenzivna hidratacija mikročestica i njihovo bubrenje uočeni su nakon 30 min pri pH 6,8, što je praćeno naglim porastom brzine oslobađanja naproksena (slike 5.1.19 - 5.1.22). Hidratacija mikročestica praćena je difuzijom, pa je stoga i proces difuzije kontrolisan brzinom relaksacije polimernih lanaca.

Uzimajući u obzir navedene zaključke, te da je *Higuchi* model primenjiv na sisteme kod kojih je brzina oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance kontrolisana procesom difuzije, onda su očekivane niske vrednosti koeficijenta determinacije dobijene primenom ovog matematičkog modela na profile oslobađanja naproksena iz mikročestica (tabela 5.1.6).

Tabela 5.1.6. Parametri dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena u odgovarajuće matematičke modele

Formulacija	<i>Higuchi model</i>		<i>Korsmeyer-Peppas model</i>			<i>Peppas-Sahlin model</i>		
	k_h (min ^{-0.5})	r^2	n	k (min ⁻ⁿ)	r^2	k_d (min ^{-0.5})	k_r (min ⁻¹)	r^2
F1	0,260	0,525	3,365	0,442	0,999	-0,467	0,861	0,920
F2	0,288	0,523	3,399	0,492	0,999	-0,522	0,960	0,918
F3	0,305	0,633	1,765	0,284	0,987	-0,051	0,049	0,990
F4	0,217	0,510	3,706	0,378	0,999	-0,397	0,729	0,894
F5	0,226	0,508	3,769	0,393	0,994	-0,411	0,755	0,888
F6	0,274	0,541	3,108	0,458	0,999	-0,479	0,894	0,938
F7	0,221	0,550	2,266	0,184	0,972	-0,320	0,545	0,922
F8	0,310	0,657	1,618	0,295	0,976	-0,316	0,630	0,985
F9	0,375	0,564	2,655	0,604	0,999	-0,636	1,199	0,972
F10	0,389	0,575	2,553	0,619	0,999	-0,632	1,211	0,975
F11	0,224	0,509	3,649	0,389	0,999	-0,417	0,760	0,902
F12	0,319	0,502	3,734	0,560	0,999	-0,609	1,101	0,898
F13	0,287	0,520	3,425	0,492	0,999	-0,528	0,967	0,918
F14	0,330	0,523	3,425	0,492	0,999	-0,593	1,095	0,913
F15	0,237	0,546	2,257	0,199	0,979	-0,369	0,610	0,944
F16	0,315	0,555	2,754	0,513	0,999	-0,548	1,024	0,966

5.2. REZULTATI DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

5.2.1. Reološka ispitivanja rastvora hitozana različitih molekulskih masa

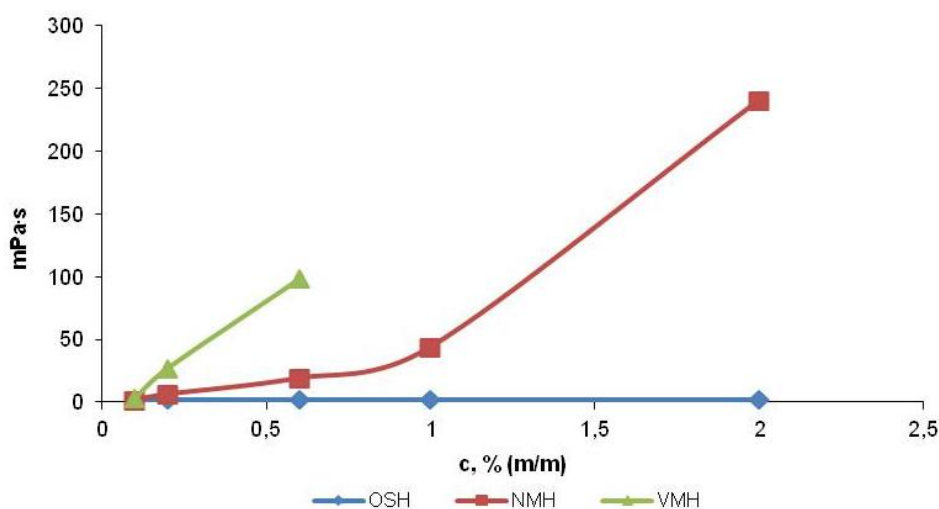
Rezultati prvog dela eksperimentalnog rada pokazali su da izražen viskozitet rastvora hitozana koji se koriste za izradu alginat-hitozan mikročestica može da ograniči brzinu/stepen kojim se hitozan vezuje za Ca-alginatne mikročestice u dvostepenom postupku izrade alginat-hitozan mikročestica. Izražen viskozitet rastvora nisko- i viskomolekularnih hitozana već pri koncentracijama od 1 % (m/m), onemogućava njihovu primenu za ojačavanje strukture Ca-alginatnih mikročestica jednostepenim postupkom. Naime, kada kapljice disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata dođu u kontakt sa viskoznom rastvorom ovih hitozana (1 % (m/m)) u kalcijum-hloridu (2 % (m/m)), usled velikog otpora koji pruža ovaj viskozni medijum za geliranje dolazi do potpune deformacije kapljica i zadržavanja na mestu kontakta, bez mogućnosti da prodru dublje u unutrašnjost medijuma. Ova pojava dovodi do nakupljanja disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata u vidu viskoznog gelskog sloja, čime je obrazovanje mikročestica u potpunosti onemogućeno (slika 5.2.1).



Slika 5.2.1. Izgled površine gelirajućeg medijuma koji sadrži kalcijum-hlorid koncentracije 2% (m/m) i: a) 1 % (m/m) NMH i b) 1 % (m/m) VMH, nakon ukapavanja disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata uz neprekidno mešanje

Za razliku od nisko- i viskomolekularnog hitozana čiji 0,6 % (m/m) rastvori u 1 % (v/v) sirćetnoj kiselini imaju prividne viskozitete $18,98 \pm 0,53$ i $98,27 \pm 0,61$ mPa·s,

redom, oligosaharidni hitozan čak i pri znatno većim koncentracijama obrazuje neviskozne rastvore ($2,17 \pm 0,03$ mPa·s za 0,6 % (m/m) i $2,31 \pm 0,29$ mPa·s za 2 % (m/m), slika 5.2.2). Takvi rastvori znatno su pogodniji za umrežavanje Ca-alginatnih mikročestica, bilo jednostepenim ili dvostepenim postupkom, jer osim što je deformacija kapljica natrijum-alginata sa lekovitom supstancom pri kontaktu sa ovim rastvorima znatno manja, očekivano je da će i hitozan lakše/brže difundovati u unutrašnjost mikročestica iz neviskoznih rastvora.



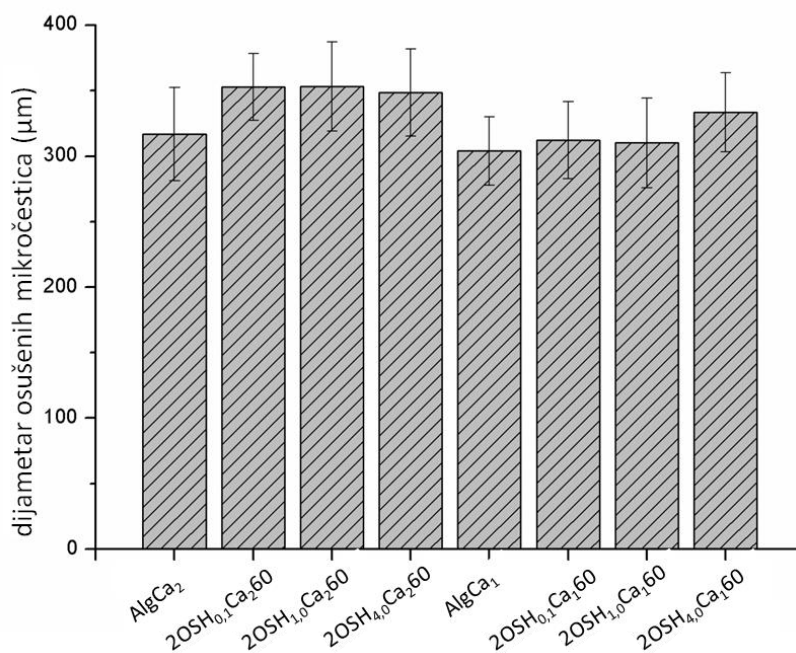
Slika 5.2.2. Srednja vrednost prividnih viskoziteta rastvora hitozana u 1 % (v/v) sirćetnoj kiselini različitih molekulskih masa i koncentracija pri brzini smicanja od $100s^{-1}$

5.2.2. Merenje veličine mikročestica

Srednje vrednosti dijametara osušenih Ca-alginatnih mikročestica i alginat-oligo hitozan mikročestica dobijenih dvostepenim postupkom kretale su se u opsegu između $304,1 \pm 26,1$ i $348,6 \pm 33,2$ μm . Na slici 5.2.3 može se uočiti jasna razlika u srednjim vrednostima dijametara mikročestica dobijenih primenom gelirajućih medijima sa različitim koncentracijama kalcijum-hlorida i može se zaključiti da su dijametri mikročestica inkubiranih u 2 % (m/m) rastvoru kalcijum-hlorida veći u odnosu na dijametre mikročestica inkubiranih u rastvoru kalcijum-hlorida dvostruko niže koncentracije. Dvofaktorska ANOVA je potvrdila postojanje statistički značajnog uticaja koncentracije kalcijum-hlorida u gelirajućem medijumu na veličinu mikročestica ($p < 0,05$). Ovo je očekivano, ukoliko se uzme u obzir da Ca-alginatna hidrogel mreža

čini osnovu strukture mikročestica, te da je kod mikročestica sa nižim sadržajem kalcijuma došlo do intenzivnije kontrakcije ove mreže tokom sušenja mikročestica.

Na slici 5.2.3 vidi se da su srednje vrednosti dijametara mikročestica netretiranih oligosaharidnim hitozanom niže u odnosu na dijemetre mikročestica koje su inkubirane 1 sat u rastvorima oligosaharidnog hitozana različitih koncentracija. Ovo je najverovatnije posledica stabilizacije hidrogel mreže nastalim polielektrolitnim kompleksom koji umanjuje stepen kontrakcije hidrogel mreže tokom procesa sušenja. Međutim, ANOVA nije potvrdila postojanje statistički značajnog uticaja koncentracije oligosaharidnog hitozana ($p > 0,05$) na srednju vrednost dijametara osušenih mikročestica.



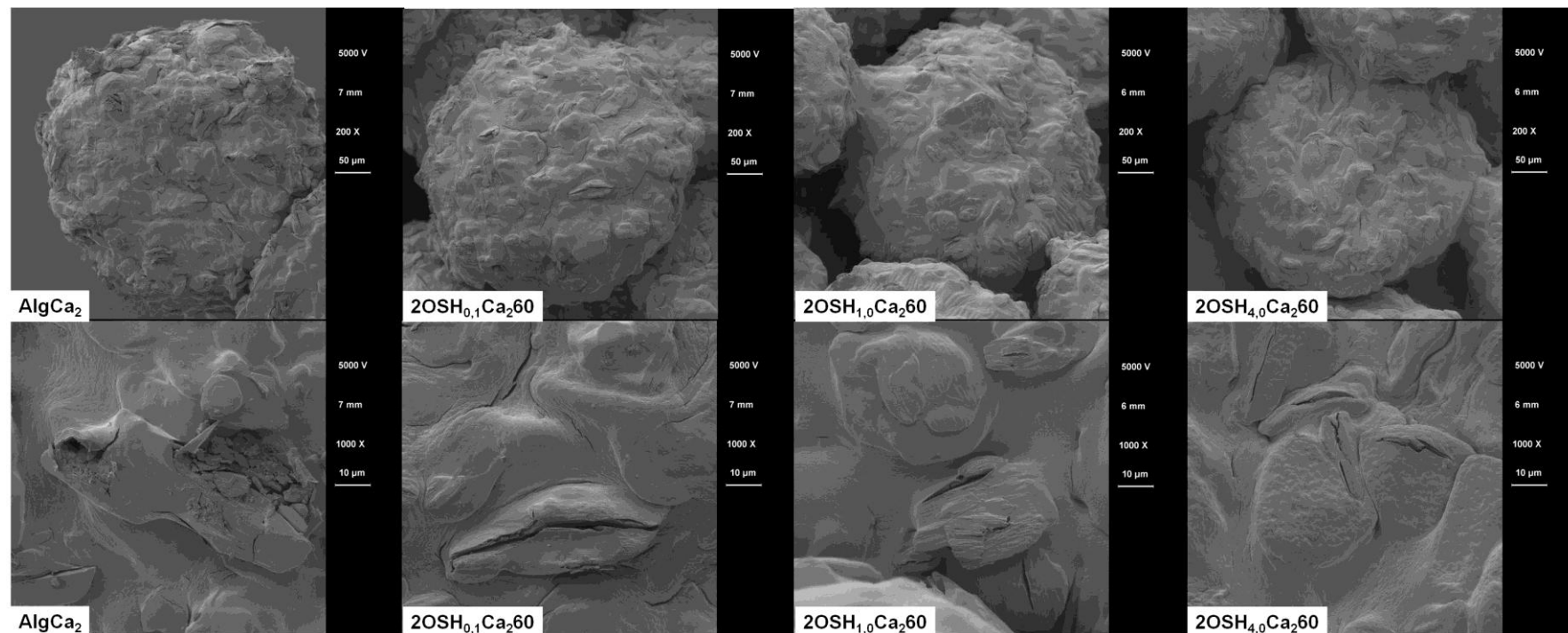
Slika 5.2.3. Srednje vrednosti dijametara osušenih alginat-oligochitozan mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom (n=100)

5.2.3. Ispitivanje morfologije, površinskih karakteristika i unutrašnje strukture mikročestica

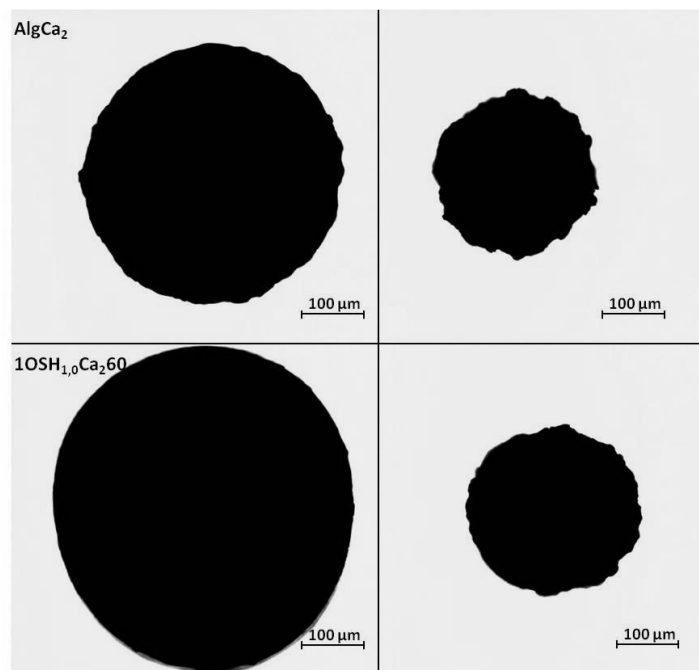
Pregled skenirajućih elektronskih mikrografija osušenih Ca-alginatnih i alginat-oligochitozan mikročestica (slika 5.2.4) ukazuje da je proces sušenja imao sličan uticaj kao i kod mikročestica tretiranih nisko- i visokomolekularnim hitozanom. Kod Ca-

alginatnih mikročestica i mikročestica tretiranih oligohitozanom uočeno je značajno smanjenje veličine praćeno umerenom deformacijom oblika, koja je najverovatnije uzrokovana gubitkom vode tokom procesa sušenja, i kontrakcijom hidrogel mreže koja se dešavala paralelno sa gubitkom vode.

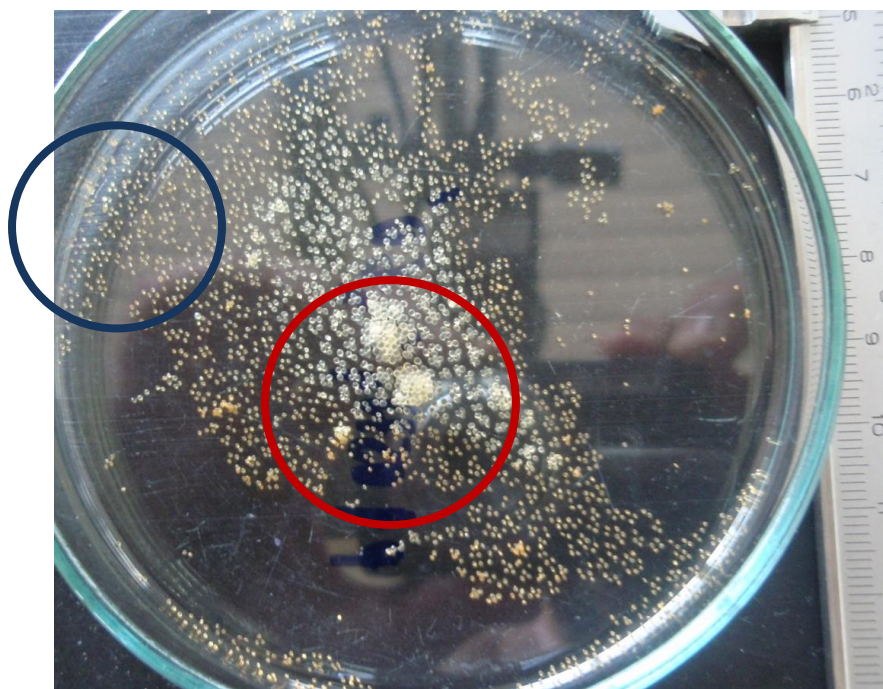
Na slici 5.2.5 prikazane su mikrografije Ca-alginatnih (AlgCa_2) i alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom ($1\text{OSH}_{1,0}\text{Ca}_260$) pre i nakon sušenja gde se jasno vidi razlika u veličini vlažnih i osušenih mikročestica, a koja je nedvosmisleno prouzrokovana gubitkom vode. Ova kontrakcija hidrogel mreže je toliko intenzivna da ju je bilo moguće pratiti golim okom, što se može primetiti na fotografiji placebo alginat-oligohitozan mikročestica napravljenoj tokom procesa sušenja (slika 5.2.6). Jasno se može uočiti razlika u veličini mikročestica koje se nalaze na rubnim delovima Petri šolje, a koje brže gube vodu u odnosu na one koje se nalaze u centralnom delu i koje još uvek sadrže visok udeo vode.



Slika 5.2.4. Skenirajuće elektronske mikrografije Ca-alginatnih mikročestica pre inkubacije u rastvoru oligohitozana (AlgCa₂) i nakon inkubacije u rastvorima oligohitozana koncentracije 0,1 % (m/m) (2OSH_{0,1}Ca₂60), 1,0 % (m/m) (2OSH_{1,0}Ca₂60) i 4,0 % (m/m) (2OSH_{4,0}Ca₂60) pri uvećanju od: 200x (gornji red) i 1000x (donji red)



Slika 5.2.5. Prikaz veličine i oblika Ca-alginatnih mikročestica (AlgCa_2) i alginat-oligohitozan mikročestica ($\text{IOSH}_{1,0}\text{Ca}_260$) sa naproksenom pre (levo) i nakon sušenja (desno)



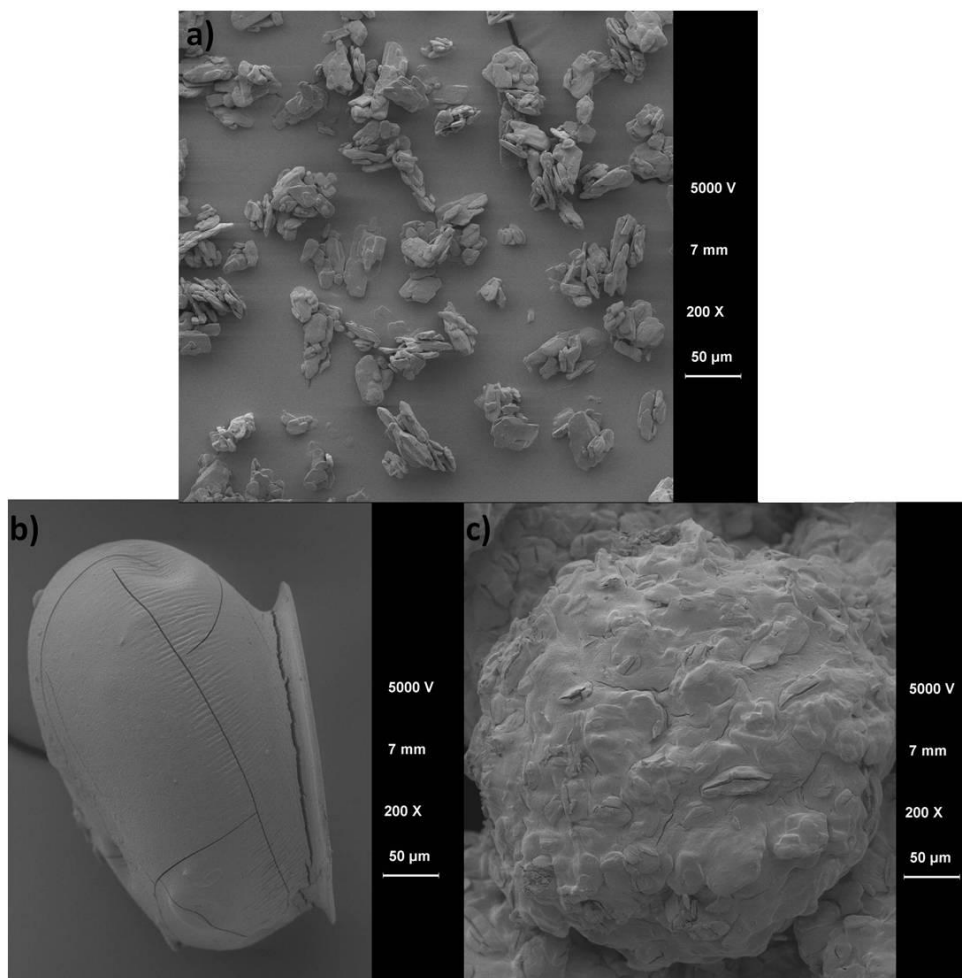
Slika 5.2.6. Izgled placebo alginat-oligohitozan mikročestica tokom procesa sušenja: nepotpuno osušene mikročestice (crvena kružnica) i osušene mikročestice (plava kružnica)

Skenirajuće elektronske mikrofografije površine mikročestica otkrivaju pukotine koje su posledica gubitka vlage i kontrakcije matriksa mikročestica tokom procesa

sušenja. Na slici 5.2.4 (donji red) može se primetiti da su ove pukotine na površini manje izražene kod mikročestica tretiranih oligohitozonom, naročito u rastvorima oligohitozana većih koncentracija, u odnosu na Ca-alginatne mikročestice, što se može pripisati formiranju polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan.

Poređenjem mikrografija placebo alginat-oligohitozan mikročestica (slika 5.2.7b) sa mikročesticama koje sadrže inkapsuliran naproksen (slika 5.2.7c) uočava se da je deformacija oblika znatno intenzivnija kod placebo mikročestica. Ovo je u potpunosti u saglasnosti sa gore navedenim zaključkom da je za deformaciju sferičnog oblika tokom sušenja odgovoran gubitak vode. Naime, usled prisustva kristala naproksena dispergovanih u celokupnom matriksu mikročestica nakon gubitka vode, ostalo je manje praznog prostora za kontrakciju mreže hidrogela, pa je samim tim i deformacija oblika kod mikročestica sa lekovitim supstancom daleko manje izražena nego kod placebo uzoraka. Na mikrografiji koja prikazuje izgled placebo mikročestice (slika 5.2.7b) može se uočiti ravna površina sa strane kojom je mikročestica bila oslonjena na podlogu (Petri šolju) tokom procesa sušenja, a koja nije uočena kod uzoraka sa inkapsuliranim naproksenom. Ovo je još jedna potvrda, da prisustvo kristala naproksena u matriksu hidrogela mikročestica doprinosi mehaničkoj stabilizaciji i umanjuje deformaciju sferičnog oblika tokom procesa sušenja.

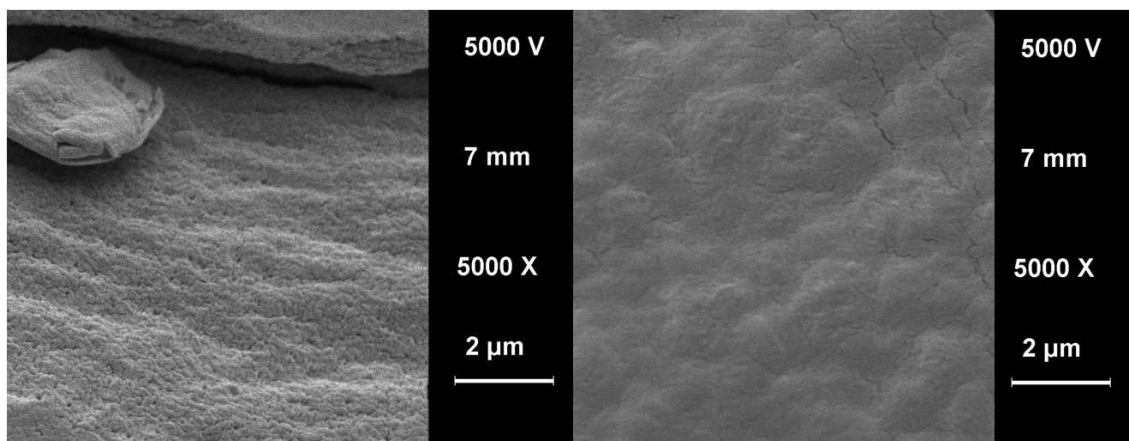
Poređenjem mikrografija placebo uzorka i alginat-oligohitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom može se zaključiti da neravnine na površini mikročestica sa inkapsuliranom lekovitim supstancom potiču upravo od prisustva kristala naproksena. Ovu pretpostavku potvrđuje mikrografija na kojoj su prikazani kristali naproksena (slika 5.2.7a), čiji su veličina i oblik slični neravninama uočenim na površini alginat-oligohitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom. Prethodna zapažanja dovode do zaključka da je naproksen inkapsuliran u kristalnom stanju, što je dodatno potkrepljeno rezultatima termalne analize (5.2.4).



Slika 5.2.7. Skenirajuće elektronske mikrografije: a) kristala naproksena; b) površine placebo alginat-oligohitozan mikročestice i c) površine alginat-oligohitozan mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom

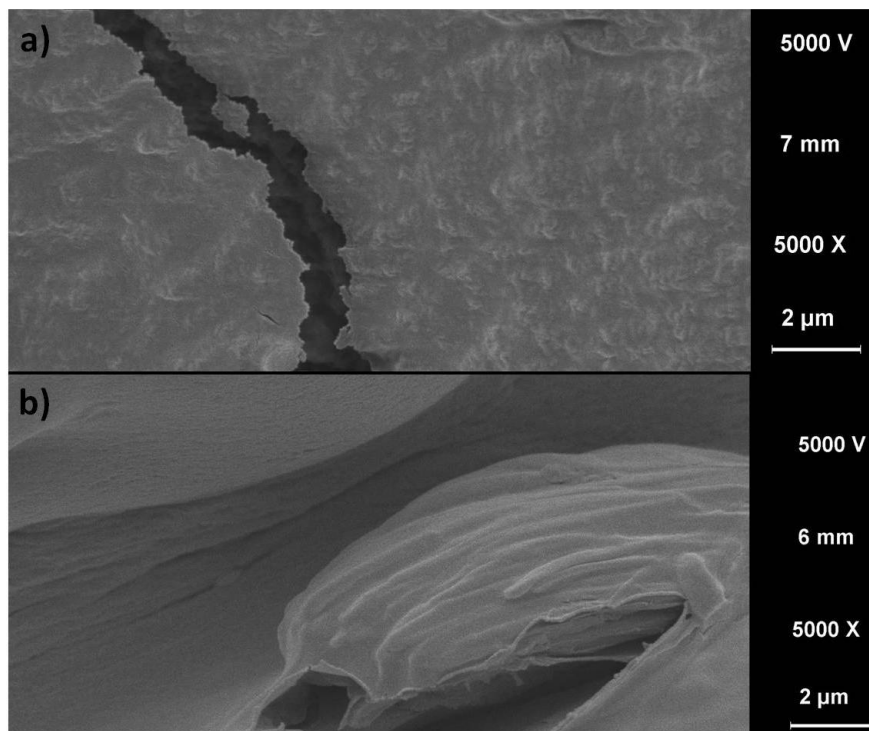
Zbog mogućeg uticaja kristala naproksena na površinske karakteristike mikročestica, detaljnoj analizi površinskih karakteristika mikročestica tretiranih i netretiranih sa oligosaharidnim hitozanom podvrgnute su i placebo Ca-alginat i alginat-oligohitozan mikročestice (slika 5.2.8).

Na površini placebo Ca-alginatih mikročestica uočene su sitne pore čije prisustvo nije potvrđeno na placebo uzorcima tretiranih oligosaharidnim hitozanom. Neravnine na površini alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom bile su manje izražene nego one na mikročesticama netretiranih oligohitozanom (slika 5.2.5).



Slika 5.2.8. Skenirajuće elektronske mikrofografije: površine placebo Ca-alginat mikročestice (levo) i placebo alginat-oligohitosan mikročestice (desno)

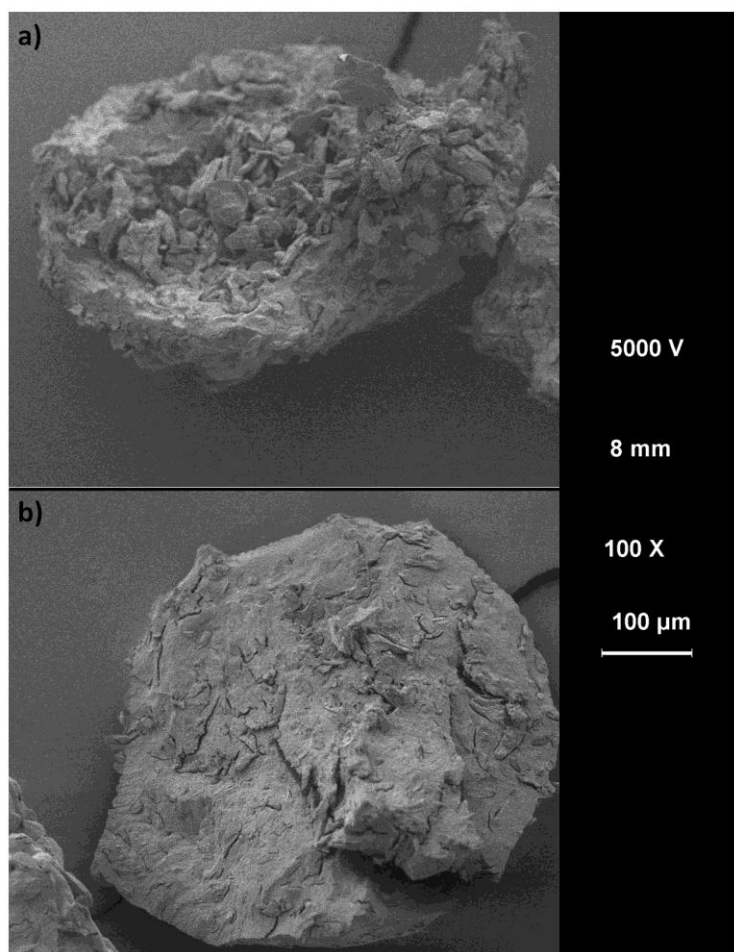
Na slici 5.2.9. su prikazane mikrofografije površine Ca-alginatnih mikročestica nakon 5 i 60 min inkubacije u rastvoru oligosaharidnog hitozana, redom. Nakon 5 min inkubacije u rastvoru oligohitosana nestaju pore koje su uočene na površini mikročestica netretiranih hitozanom (5.2.9a), što ukazuje da vezivanje oligohitosana za površinu mikročestica počinje odmah nakon prenošenja mikročestica u rastvor oligohitosana. Ovo zapažanje potvrđeno je rezultatima određivanja sadržaja hitozana primenom ninhidrinskog reagensa (5.2.8). Blage neravnine i pukotine prisutne na površini ovih mikročestica (slika 5.2.9a) gube se nakon produžene inkubacije u rastvoru oligohitosana (slika 5.2.9b).



Slika 5.2.9. Skenirajuće elektronske mikrografije: površine alginat-oligohitozan mikročestice inkubirane u rastvoru oligohitozana: a) 5 min ($2OSH_{1,0}Ca_25$) i b) 60 min ($2OSH_{1,0}Ca_260$)

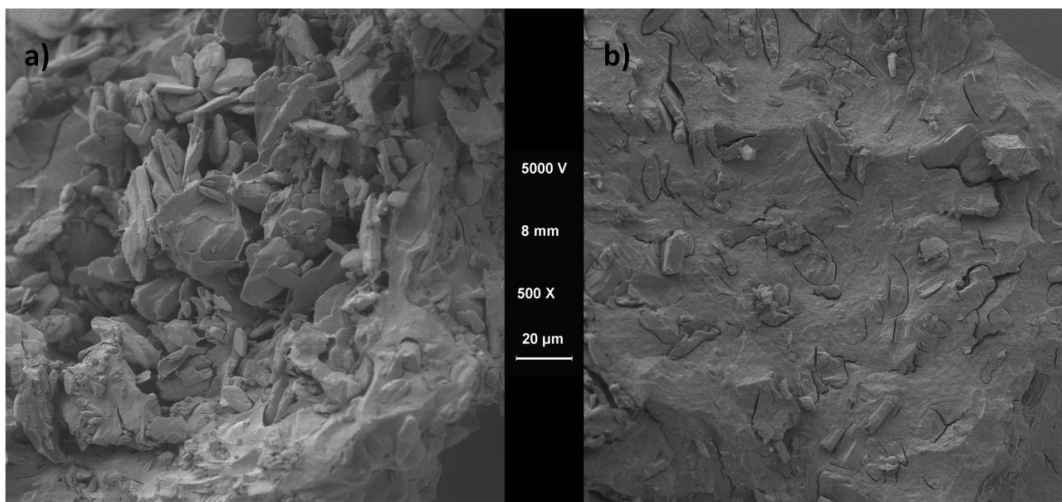
Radi ostvarivanja uvida u unutrašnju strukturu mikročestica i ispitivanja pretpostavke da oligosaharidni hitozan ima sposobnost prodiranja dublje u unutrašnjost mikročestica, urađena je detaljna analiza poprečnog preseka primenom skenirajuće elektronske mikroskopije.

Na slici 5.2.10a prikazan je poprečni presek osušene Ca-alginatne mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom, gde se jasno može uočiti postojanje udubljenja u središtu mikročestice. Nakon inkubacije mikročestica u rastvoru oligosaharidnog hitozana šupljina više nije bila vidljiva na njihovom poprečnom preseku (slika 5.2.10b), potvrđujući pretpostavku da oligosaharidni hitozan ima sposobnost prodiranja u jezgro mikročestica, prvenstveno zahvaljujući maloj molekularnoj masi/dužini lanaca, ali i niskom viskozitetu rastvora ovog oligomera.



Slika 5.2.10. Skenirajuće elektronske mikrografije poprečnog preseka: a) Ca-alginatne mikročestice sa naproksenom i b) alginat-oligohitozan mikročestice sa naproksenom

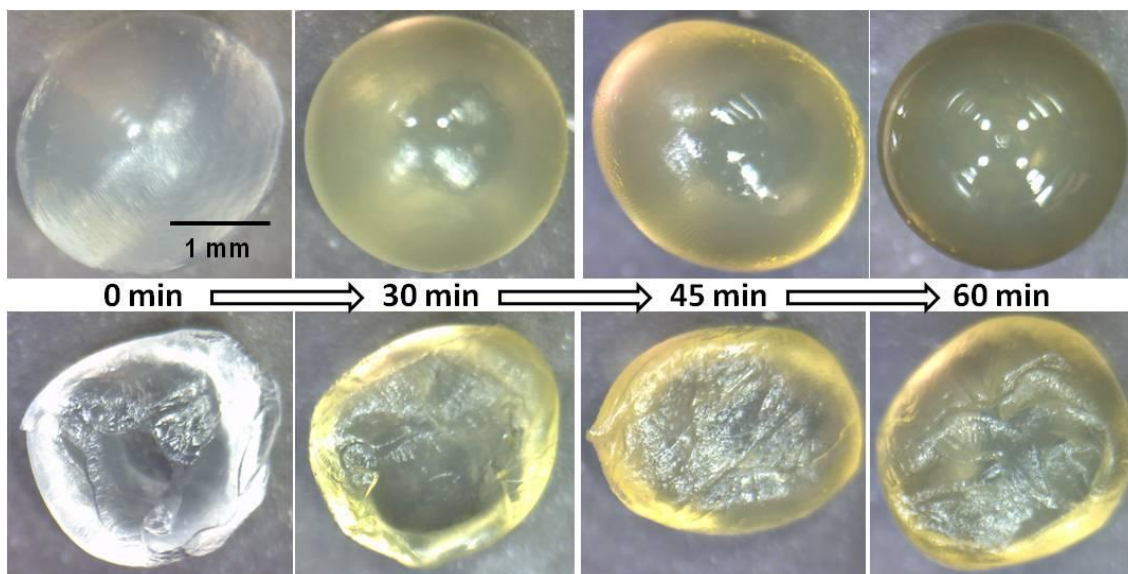
Posmatranjem poprečnog preseka pri uvećanju od 500X uočeno je prisustvo kristala naproksena u jezgri mikročestica tretiranih i netretiranih hitozanom. Razlika se ogleda u tome što kod netretiranih Ca-alginatnih mikročestica ovi kristali okružuju šupljinu jezgra mikročestice (slika 5.2.11a), dok su kod mikročestica tretiranih hitozanom ovi kristali inkapsuliranog naproksena tesno okruženi sa svih strana matriksom mikročestica (slika 5.2.11b).



Slika 5.2.11. Distribucija kristala naproksena u matriksu: a) Ca-alginatnih mikročestica i b) alginat-oligo-hitozan mikročestica (skenirajuće elektronske mikrofografije poprečnog preseka)

Zahvaljujući karakterističnoj žutoj boji oligosaharidnog hitozana, proces njegovog vezivanja i prodiranja u unutrašnjost Ca-alginatnih mikročestica moguće je pratiti i vizuelno. Izgled površine i poprečnog preseka Ca-alginatnih mikročestica neposredno pred prenošenje u rastvor oligosaharidnog hitozana i nakon 30, 45 i 60 min prikazan je na slici 5.2.12. Sve mikročestice su pre mikroskopske analize isprane dejonizovanom vodom kako bi se sa površine uklonio nevezani hitozan.

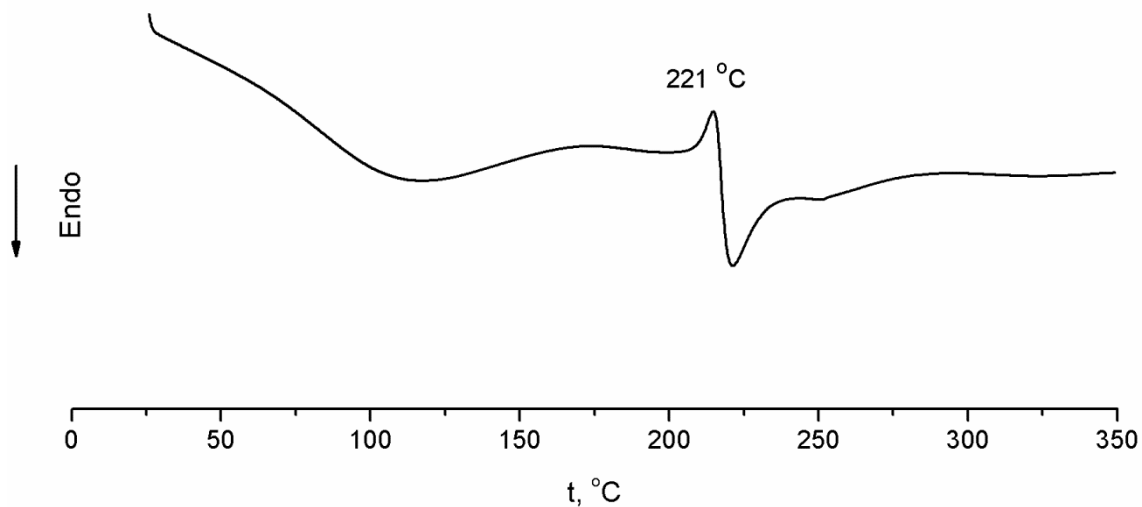
Na slici 5.2.12 uočava se da sa produženjem vremena inkubacije u rastvoru oligohitozana žuta boja mikročestica koja potiče od oligosaharidnog hitozana postaje sve intenzivnija, ne samo na površini, nego i u unutrašnjosti mikročestica, potvrđujući pretpostavku da oligosaharidni hitozan ima sposobnost prodiranja u jezgro Ca-alginatnih mikročestica. Ova vizuelna zapažanja su u skladu sa rezultatima određivanja sadržaja hitozana, koja ukazuju da sa produženjem vremena inkubacije raste i sadržaj hitozana u mikročesticama (5.2.8).



Slika 5.2.12. Izgled površine (gore) i poprečnog preseka (dole) placebo Ca-alginatne hidrogel čestice pre i nakon 30, 45 i 60 min inkubacije u 4 % (m/m) rastvoru oligohitozana

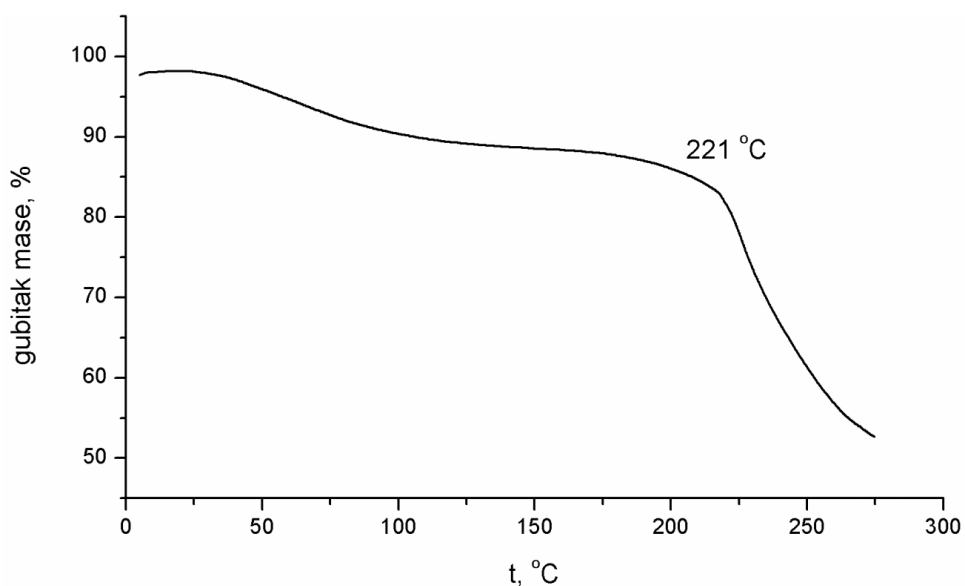
5.2.4. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza

Termalne osobine natrijum-alginata i naproksena detaljno su opisane u prvom delu rada (slike 5.1.7, 5.1.8, 5.1.10 i 5.1.11). DSC termogram oligosaharidnog hitozana prikazan je na slici 5.2.13. Egzoterma sa maksimumom na 221 °C može se pripisati degradaciji oligosaharidnog hitozana. Ovako relativno niska temperatura degradacije, u poređenju sa degradacionim temperaturama nisko- i visokomolekularnog hitozana, nije neočekivana. Naime, ranija ispitivanja termalnih osobina strukturno različitih hitozana pokazala su da smanjenjem molekulske mase i povećanjem stepena deacetilacije opada i temperatura pri kojoj dolazi do njihove degradacije (Kittur FS, 2002). U skladu sa tim, bilo je očekivano da ovaj oligomer molekulske mase 2 – 3 kDa, stepena deacetilacije > 85 % ima značajno nižu degradacionu temperaturu u odnosu na hitozane velike mase koji su korišćeni u prvoj fazi eksperimentalnog rada. Endoterma koja se nalazi na početnom delu termograma odgovara gubitku vode.



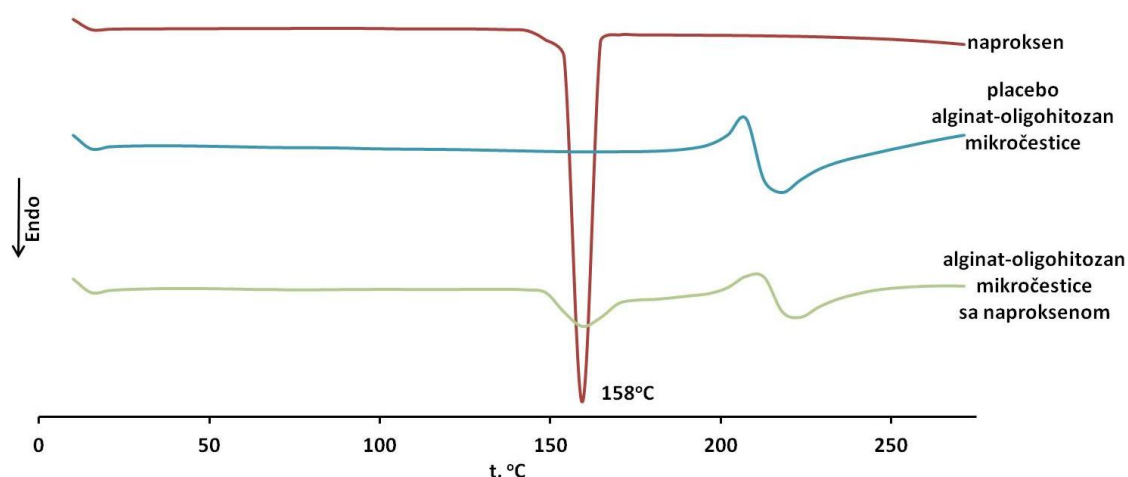
Slika 5.2.13. DSC termogram oligosaharidnog hitozana

TG kriva oligosaharidnog hitozana prikazana je na slici 5.2.14, i na njoj se mogu uočiti dva temperaturna intervala tokom kojih dolazi do gubitka mase. Prvi interval je manje izražen, javlja se već na temperaturama nižim od 50 $^{\circ}\text{C}$, a odgovara gubitku vode. Drugi interval je izraženiji sa naglim padom na 221 $^{\circ}\text{C}$, a potiče od brze termalne degradacije hitozana. Ova zapažanja su u potpunosti u skladu sa zaključcima analize DSC termograma.



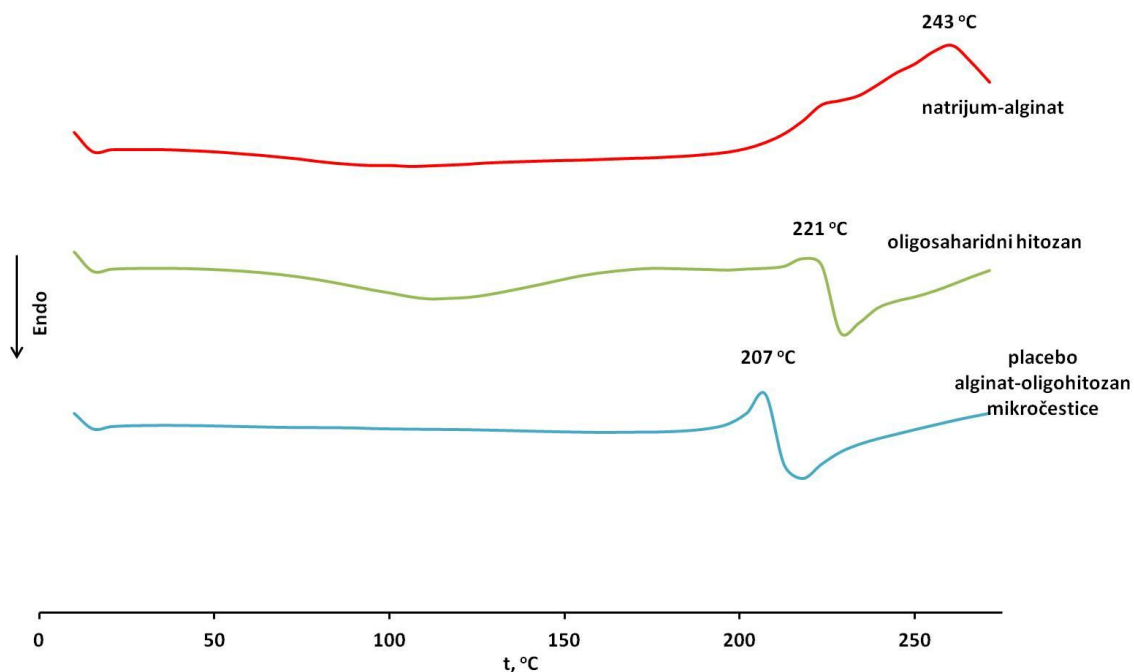
Slika 5.2.14. TG kriva oligosaharidnog hitozana

Da bi se uklonila eventualno prisutna voda, pre termalne analize osušeni uzorci mikročestica čuvani su u eksikatoru. Na slici 5.2.15 prikazani su termogrami naproksena, placebo alginat-oligohitozan mikročestica i alginat-oligohitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom. Oštar endotermni pik naproksena na 158 °C koji odgovara tački topljenja može se uočiti na termogramima naproksena i mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom, ali nije prisutan na termogramu placebo uzoraka, što nedvosmisleno ukazuje da ovaj pik potiče od naproksena, ali i da je naproksen u mikročesticama inkapsuliran u polaznom, kristalnom stanju. Do sličnog zaključka došlo se kada su korišćeni hitozani većih molekulskih masa (5.1.4), što se može pripisati slaboj rastvorljivosti naproksena u gelirajućem medijumu i blagim uslovima pod kojima je izveden proces mikroinkapsulacije.



Slika 5.2.15. DSC termogrami naproksena, placebo i alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom

Na slici 5.2.16 su predstavljeni uporedni termogrami natrijum-alginata, oligosaharidnog hitozana i placebo uzoraka alginat-oligohitozan mikročestica. Može se primetiti da egzoterme koje odgovaraju degradaciji pojedinačnih polimera nisu prisutne na termogramu mikročestica, ali se umesto njih javlja egzoterma sa pikom na 207 °C. Ovu razliku je moguće objasniti jakim elektrostatičkim interakcijama između natrijum-alginata i oligohitozana koje su tokom druge faze izrade mikročestica dovele do formiranja polielektrolitnog kompleksa kao entiteta sa drugačijim termalnim karakteristikama u odnosu na polimere iz kojih je sačinjen.

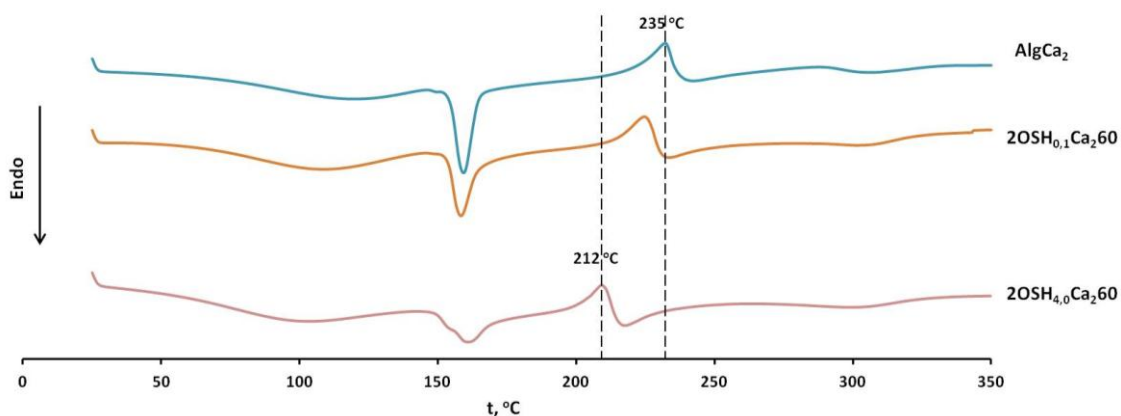


Slika 5.2.16. DSC termogrami natrijum-alginata, oligosaharidnog hitozana i placebo alginat-oligochitozan mikročestica

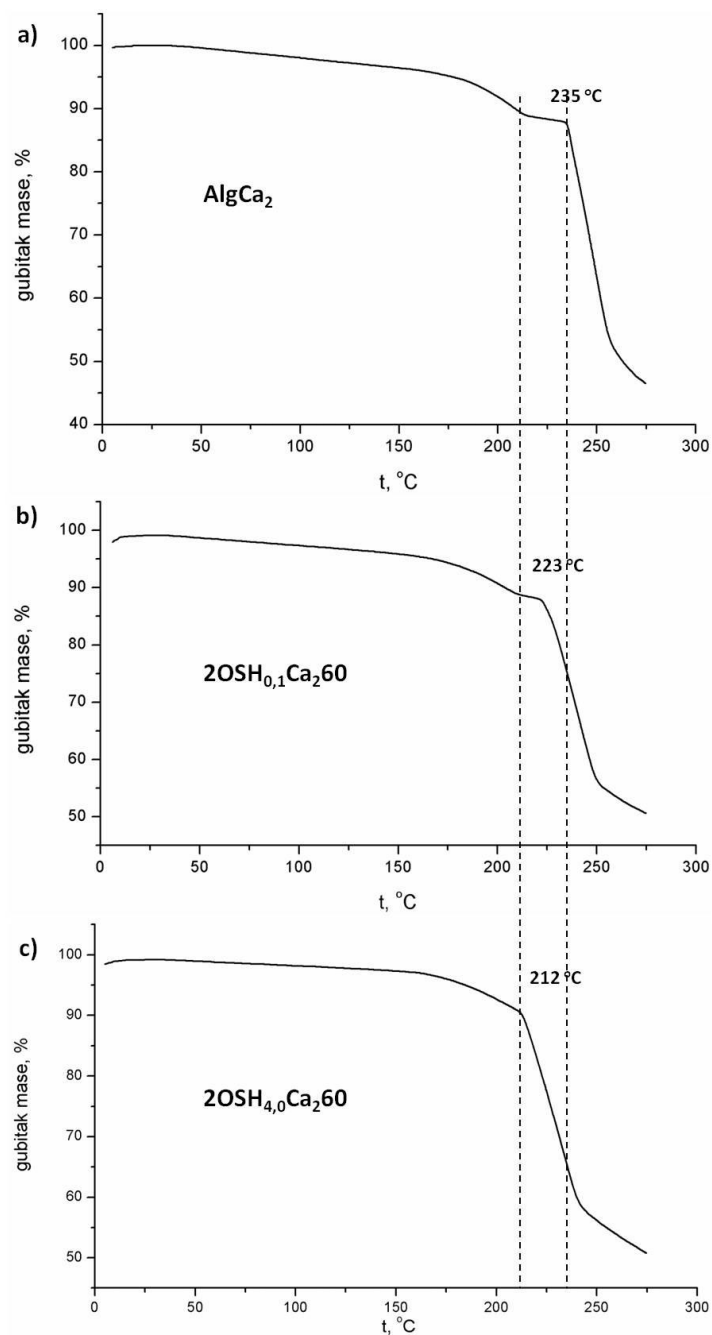
DSC i TG analizom potvrđeno je da inkubacija mikročestica u rastvoru oligosaharidnog hitozana utiče na njihove termalne osobine i u slučaju kada mikročestice sadrže model lekovitu supstancu.

Na slici 5.2.17 prikazani su DSC termogrami Ca-alginatnih i alginat-oligochitozan mikročestica sa različitim sadržajem oligohitozana. Na sva tri termograma uočava se blaga i široka endoterma sa pikom na približno 100 °C koja potiče od gubitka vode. Ova endoterma je praćena znatno oštrijom i intenzivnijom endotermom sa pikom na približno 160 °C, a koja potiče od topljenja inkapsuliranog naproksena, o čemu je već bilo reči. Nakon ove endoterme, na sva tri termograma uočava se egzoterma koja odgovara procesu degradacije, uz bitnu napomenu da se sa prisustvom oligosaharidnog hitozana pik ove egzoterme pomera ka nižim temperaturama. Evidentno je da se sa porastom sadržaja oligohitozana u mikročesticama ovaj pik pomera više ka nižim temperaturama. To je moguće objasniti manjom termalnom stabilnošću oligosaharidnog hitozana u odnosu na alginat.

Navedena zapažanja potvrđena su TG analizom. Na slici 5.2.18 se može uočiti da sa porastom sadržaja hitozana dolazi do pomeranje pada na TG krivoj mikročestica ka nižim temperaturama. Usled veće termalne osetljivosti hitozana i njegovog većeg udela u ukupnoj masi mikročestica, a što je naknadno potvrđeno ninhidrinskom reakcijom (5.2.8), nagli gubitak mase uzrokovan termalnom degradacijom počinje na temperaturama koje su niže za 20 °C kod mikročestica sa visokim sadržajem hitozana u odnosu na Ca-alginatne mikročestice.



Slika 5.2.17. DSC termogrami Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica sa različitim sadržajem oligohitozana

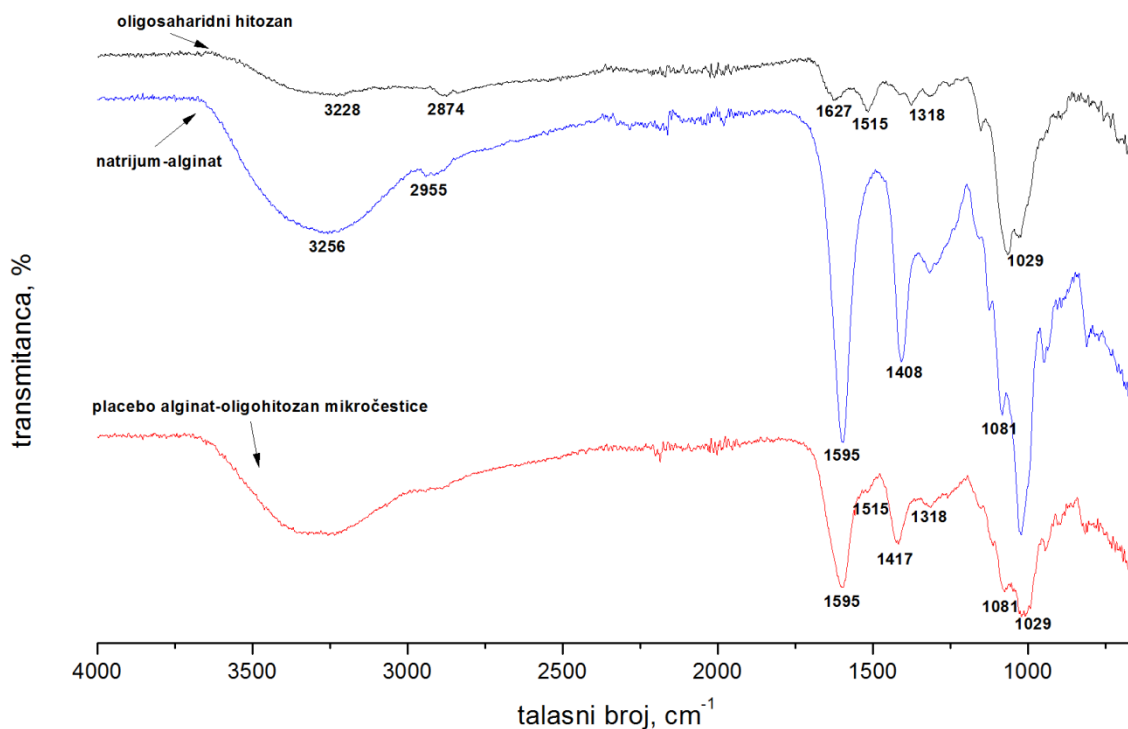


Slika 5.2.18. TG krive Ca-alginatnih (a) i alginat-oligohitozan mikročestica sa različitim sadržajem oligohitozana (b-c)

5.2.5. Infracrvena spektroskopska analiza

Na slici 5.2.19 prikazani FT-IR su spektri natrijum-alginata, oligosaharidnog hitozana i placebo alginat-oligohitozan mikročestica. Detaljno tumačenje karakterističnih apsorpcionih traka spektra natrijum-alginata predstavljeno je u okviru rezultata prve faze (5.1.5).

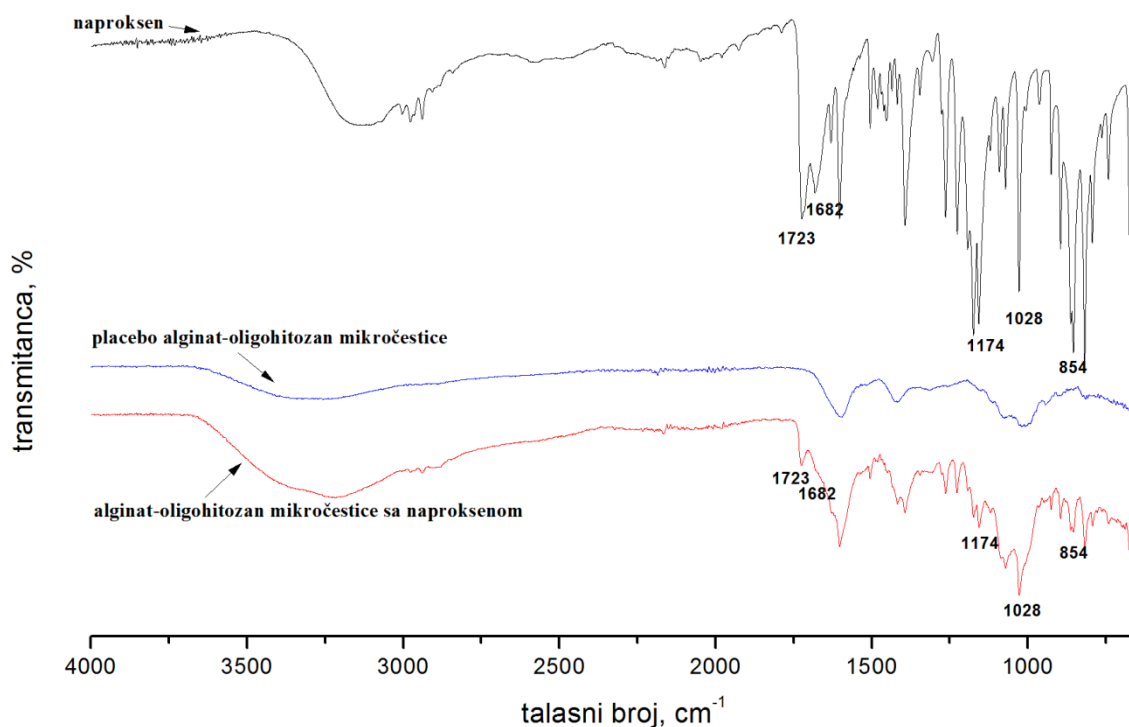
Spektar oligosaharidnog hitozana pokazuje veliku sličnost sa spektrima nisko- i visokomolekularnog hitozana, što je očekivano s obzirom da je reč o molekulima identične hemijske strukture. Slabe apsorpcione trake sa pikovima na 3228 i 2874 cm^{-1} , potiču od O–H i C–H istezanja, redom, dok traka sa pikom na 1318 cm^{-1} ukazuje na prisustvo N–acetilovanih glukozaminskih rezidua (Brugnerotto i sar., 2001; Sarmiento i sar., 2006; Lawrie i sar., 2007). Trake sa pikovima na 1627, 1515 i 1029 cm^{-1} potiču od amid I, amid II vibracija i skeletnih C–O vibracija, redom (Sarmiento i sar., 2006; Lawrie i sar., 2007). Kada se uporede spektri natrijum-alginata i oligosaharidnog hitozana sa spektrom placebo alginat-oligohitozan mikročestica, može se zapaziti da su sve apsorpcione trake karakterističnih grupa pojedinačnih polimera prisutne i na spektru mikročestica, sa izuzetkom trake koja odgovara amid I vibraciji. Međutim, odsustvo ove trake na spektru mikročestica ne može se sa sigurnošću pripisati formiranju polielektrolitnog kompleksa, i verovatnije je da je ona samo sakrivena intenzivnom trakom sa pikom na 1595 cm^{-1} . Prisustvo traka karakterističnih za pojedinačne polimere na spektru mikročestica moglo se i očekivati, s obzirom da proces mikroinkapsulacije i oblaganja hitozanom ne uključuje hemijske procese, nego je zasnovan na elektrostatičkom privlačenju suprotno naelektrisanih grupa dvaju polimera bez obrazovanja novih veza kovalentne prirode (Simsek-Ege i sar., 2003). Jedina razlika koja je uočena je pomeranje intenzivnog pika apsorpcione trake koja potiče od simetričnog COO^- istezanja natrijum-alginata sa 1408 cm^{-1} na 1417 cm^{-1} što je najverovatnije posledica pomenute elektrostatičke interakcije i formiranja polielektrolitnog kompleksa.



Slika 5.2.19. FT-IR spektri oligohitozana, natrijum-alginata i placebo alginat-oligohitozan mikročestica

U cilju procene eventualnih interakcija leka sa polimerima tokom procesa mikroinkapsulacije i ispitivanja oblika u kome se inkapsulirani naproksen nalazi, poređeni su FT-IR spektri naproksena, placebo i alginat-oligohitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom (slika 5.2.20). Detaljna karakterizacija spektra naproksena data je u prvom delu rada (5.1.5).

Uporednom analizom spektara placebo i uzoraka mikročestica sa naproksenom zaključeno je da se razlike ogledaju u prisustvu apsorpcionih traka karakterističnih za naproksen. Ovo je potvrda prisustva naproksena u mikročesticama, ali i pokazatelj da je naproksen inkapsuliran u kristalnom stanju. Drugim rečima, zahvaljujući blagim uslovima mikroinkapsulacije, slaboj rastvorljivosti naproksena u disperziji natrijum-alginata i gelirajućem medijumu naproksen nakon inkapsulacije ostaje u svom prvobitnom, neizmenjenom stanju. Navedeni zaključak je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima sprovedene termalne analize (5.2.5).



Slika 5.2.20. FT-IR spektri: naproksena, placebo alginat-oligohitozan mikročestica i alginat-oligohitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom

5.2.6. Određivanje sadržaja model lekovite supstance

Sadržaj model lekovite supstance u osušanim Ca-alginatnim i mikročesticama inkubiranim u rastvorima oligosaharidnog hitozana različitih koncentracija kretao se u opsegu između $17,8 \pm 1,1$ i $41,4 \pm 0,2$ %. Kao što se može videti iz tabele 5.2.1. najveći sadržaj naproksena imale su Ca-alginatne mikročestice, dok se u mikročesticama tretiranim oligosaharidnim hitozanom sadržaj lekovite supstance smanjivao sa porastom koncentracije hitozana u rastvoru za ojačavanje mikročestica. Uticaj koncentracije hitozana u rastvoru za inkubaciju mikročestica na sadržaj leka potvrđen je i ANOVA testom ($p < 0,05$).

Postoje dva moguća objašnjenja za veći sadržaj lekovite supstance u mikročesticama netretiranih hitozanom, u odnosu na alginat-oligohitozan mikročestice. Prvi je gubitak inkapsuliranog naproksena tokom druge faze izrade alginat-oligohitozan mikročestica, odnosno tokom inkubacije u rastvorima hitozana. Drugi mogući razlog je prisustvo hitozana u strukturi ovih mikročestica, čime se umanjuje procentualni sadržaj

lekovite supstance u odnosu na ukupnu masu mikročestica. Sa porastom koncentracije hitozana u rastvoru za ojačavanje mikročestica, raste i sadržaj hitozana, čime se umanjuje udeo lekovite supstance u ukupnoj masi mikročestica. Ovo je potvrđeno analizom sadržaja hitozana zasnovanom na ninhidrinskoj reakciji (5.2.8).

Mikročestice dobijene inkubacijom u gelirajućem medijumu sa većom koncentracijom kalcijum-hlorida imale su manji sadržaj naproksena, najverovatnije usled većeg relativnog udela kalcijuma u odnosu na ukupnu masu mikročestica. Međutim, ANOVA testom je potvrđeno da uticaj koncentracije jona kalcijuma na sadržaj naproksena nema statističku značajnost ($p > 0,05$).

Tabela 5.2.1. Sadržaj naproksena u ispitivanim formulacijama alginat-oligohitozan mikročestica nakon sušenja (n=3)

Formulacija	DL% ± s.d.	Formulacija	DL% ± s.d.
AlgCa ₂	31,4 ± 1,1	AlgCa ₁	41,4 ± 0,2
2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	27,3 ± 0,8	2OSH _{0,1} Ca ₁ 60	31,8 ± 0,3
2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	24,4 ± 0,2	2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	26,5 ± 0,2
2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	17,8 ± 1,1	2OSH _{4,0} Ca ₁ 60	18,6 ± 0,9

5.2.7. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Srednje vrednosti efikasnosti inkapsulacije Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica kretale su se u opsegu od $78,1 \pm 0,7$ do $94,7 \pm 1,2$ % (tabela 5.2.2). Razlozi za ove relativno velike vrednosti efikasnosti inkapsulacije slični su onima koji su navedeni u prvoj fazi eksperimentalnog rada, a to su: brzina reakcije jonotropnog geliranja koja započinje istog trenutka kada kapljice rastvora natrijum-alginata dođu u kontakt sa gelirajućim medijumom (faza I) i slaba rastvorljivost naproksena u kiselom rastvoru hitozana pH vrednosti 5,5 (faza II).

Uprkos navedenom, utvrđeno je da do gubitka inkapsuliranog naproksena dolazi tokom obe faze izrade mikročestica, pri čemu je gubitak lekovite supstance nešto veći tokom druge faze, odnosno tokom inkubacije u rastvoru hitozana. Do ovog zaključka

može se doći poređenjem efikasnosti inkapsulacije Ca-alginatnih mikročestica i mikročestica tretiranih hitozanom. Na osnovu vrednosti efikasnosti inkapsulacije Ca-alginatnih mikročestica može se uočiti da su gubici tokom prve faze aproksimativno između 6 i 9 %, zavisno od koncentracije kalcijumovih jona u gelirajućem medijumu. Gubitak naproksena tokom druge faze, računato na polaznu količinu, kretao se približno između 11 i 13 %, zavisno od koncentracije hitozana i kalcijumovih jona u rastvoru za oblaganje.

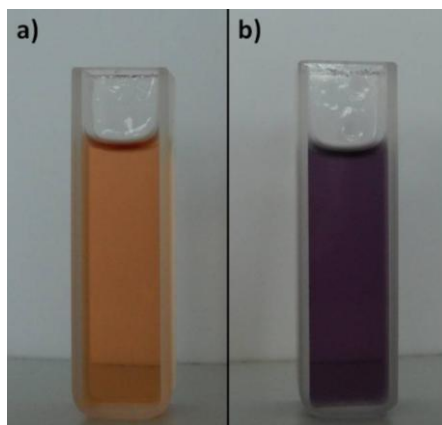
Mikročestice inkubirane u rastvorima sa većim sadržajem kalcijumovih jona imale su niže vrednosti efikasnosti inkapsulacije, najverovatnije usled veće poroznosti Ca-alginatnog hidrogel matriksa. Veći porozitet ovih mikročestica imao je za posledicu brži izlazak inkapsuliranog naproksena u okolni medijum (Ferreira i Almeida, 2004). Nije uočena jasna veza između koncentracije oligosaharidnog hitozana u rastvoru za ojačavanje i efikasnosti inkapsulacije.

Tabela 5.2.2. Efikasnost inkapsulacije ispitivanih formulacija alginat-oligohitozan mikročestica (n=3)

Formulacija	EE% ± s.d.	Formulacija	EE% ± s.d.
AlgCa ₂	91,6 ± 1,4	AlgCa ₁	94,7 ± 1,2
2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	80,0 ± 2,2	2OSH _{0,1} Ca ₁ 60	82,1 ± 2,1
2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	78,1 ± 0,7	2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	83,3 ± 0,5
2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	81,1 ± 1,0	2OSH _{4,0} Ca ₁ 60	81,1 ± 1,8

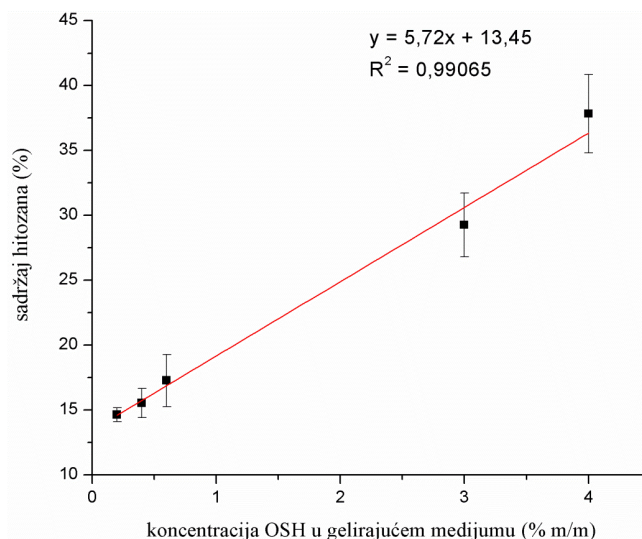
5.2.8. Određivanje sadržaja hitozana

Svi uzorci dobijeni razaranjem alginat-oligohitozan mikročestica u 1 % (m/m) rastvoru natrijum-citrata dali su pozitivnu ninhidrinsku reakciju (*Ruhemann*-ovo ljubičasto; slika 5.2.21b) potvrđujući prisustvo hitozana u strukturi mikročestica.



Slika 5.2.21. Izgled: a) 1 % (m/m) rastvora natrijum-citrata (slepa proba) i b) rastvora dobijenog razaranjem alginat-oligohitozan mikročestica u 1 % (m/m) rastvoru natrijum-citrata, po završetku ninhidrinske reakcije

Rezultati određivanja sadržaja hitozana u osušenim alginat-oligohitozan mikročesticama dobijenih dvostepenim postupkom predstavljani su na slici 5.2.22. Sadržaj oligosaharidnog hitozana u mikročesticama rastao je sa porastom koncentracije hitozana u rastvoru kojim su mikročestice tretirane tokom druge faze izrade i kretao se u rasponu od 14,4 % ($2\text{OSH}_{0,2}\text{Ca}_260$) do 37,9 % ($2\text{OSH}_{4,0}\text{Ca}_260$). Ovaj porast je linearan, a jednačina koja ga opisuje predstavljena je na slici 5.2.22.



Slika 5.2.22. Uticaj koncentracije oligosaharidnog hitozana u gelirajućem medijumu na njegov sadržaj u osušenim mikročesticama izrađenih dvostepenim postupkom

Kako bi se procenio uticaj načina izrade alginat-oligohitozan mikročestica na stepen u kome se oligosaharidni hitozan vezuje za Ca-alginatni hidrogel matriks, ninhidrinskom reakcijom je određen sadržaj hitozana u mikročesticama izrađenim jedno- i dvostepenim postupkom. Rezultati ovog određivanja su predstavljeni u tabeli 5.2.3.

ANOVA testom je potvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju oligosaharidnog hitozana ($p > 0,05$) između mikročestica dobijenih direktnim ukapavanjem natrijum-alginata u rastvor hitozana i kalcijum-hlorida (jednostepeni postupak) i mikročestica dobijenih prenosom Ca-alginatnih mikročestica u rastvor hitozana (dvostepeni postupak). Ovo se može pripisati sposobnosti malih molekula oligosaharidnog hitozana da lako prolaze kroz pore u Ca-alginatnoj hidrogel mreži i nakon njenog formiranja u fazi I postupka inkapsulacije. Time je potvrđena polazna pretpostavka o prednosti oligosaharidnog hitozana u odnosu na hitozane većih molekulskih masa, čije je vezivanje ograničeno uglavnom na površinu mikročestica, upravo zbog dužine lanaca ovih polimera.

Tabela 5.2.3. Uticaj postupka inkapsulacije na sadržaj oligohitozana u osušenim mikročesticama ($n = 3$; konc. kalcijum-hlorida u gelirajućem medijumu 2 % (m/m))

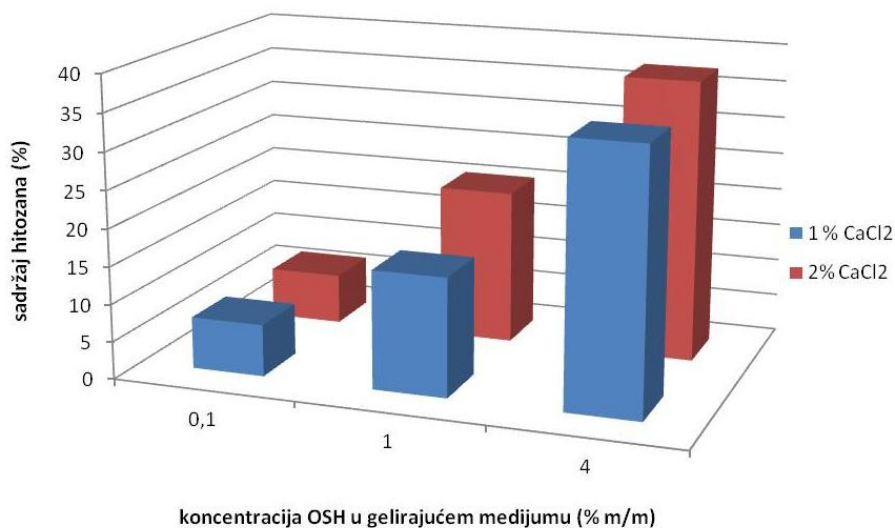
Koncentracija hitozana u rastvoru za oblaganje, % (m/m)	Sadržaj hitozana u mikročesticama, % \pm s.d.	
	Jednostepeni postupak	Dvostepeni postupak
0,1	6,8 \pm 0,3	12,1 \pm 1,3
1,0	20,7 \pm 3,0	20,2 \pm 2,0
4,0	37,6 \pm 3,1	37,9 \pm 1,3

Nakon što je ANOVA testom potvrđeno da izbor metode izrade mikročestica nema značajan uticaj na stepen vezivanja oligosaharidnog hitozana, izvršeno je ispitivanje uticaja koncentracije Ca^{2+} jona na alginat-oligohitozan mikročesticama izrađenih jednostepenim postupkom.

Ispitivane mikročestice dobijene su ukapavanjem disperzije naproksena u rastvoru natrijum-alginata u gelirajući medijum koji se sastojao od oligohitozana koncentracija 0,1, 1,0 i 4,0 % (m/m) i kalcijum-hlorida koncentracija 1,0 i 2,0 % (m/m)

(ukupno šest formulacija). Rezultati određivanja sadržaja oligohitozana u ovim mikročesticama primenom ninhidrinskog reagensa prikazani su na slici 5.2.23.

Sa izuzetkom mikročestica inkubiranih u rastvorima oligohitozana koncentracije 0,1 % (m/m), kod kojih je razlika u sadržaju oligohitozana bila mala (0,2 % od ukupne mase), uočeno je da porast koncentracije Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu pospešuje vezivanje oligohitozana. Sličan fenomen uočili su Gaserod i saradnici 1998. godine kod mikročestica dobijenih primenom hitozana velikih molekulskih masa. Ovi istraživači su zaključili da kada se kalcijumova so doda u rastvor hitozana, reakcija geliranja alginata kalcijumovim jonima je u svojevrsnoj kompeticiji sa reakcijom obrazovanja polielektrolitnog kompleksa, što dovodi do formiranja poroznijeg gela kroz koji hitozan lakše difunduje. Primenom SAXS metode (eng. *Small angle X-ray scattering*) je pokazano da porast koncentracije Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu ima za posledicu formiranje poroznije Ca-alginatne hidrogel mreže (Stokkes i sar., 1997). Takva hidrogel mreža pogoduje lakšem i bržem vezivanju hitozana, pa je očekivano i sadržaj hitozana u ovim mikročesticama veći.

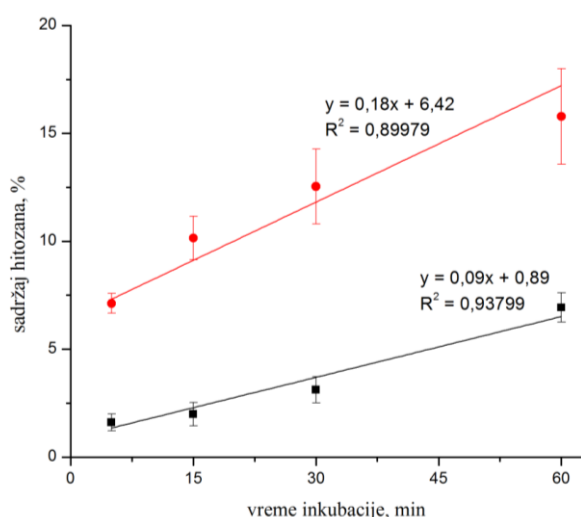


Slika 5.2.23. Uticaj koncentracije Ca^{2+} u gelirajućem medijumu na sadržaj oligohitozana u mikročesticama izrađenih jednostepenim postupkom

Na slikama 5.2.24 i 5.2.25 prikazan je uticaj vremena inkubacije mikročestica u rastvoru oligohitozana i kalcijum-hlorida različitih koncentracija na sadržaj hitozana u mikročesticama. Kao što je bilo očekivano, sa porastom vremena inkubacije

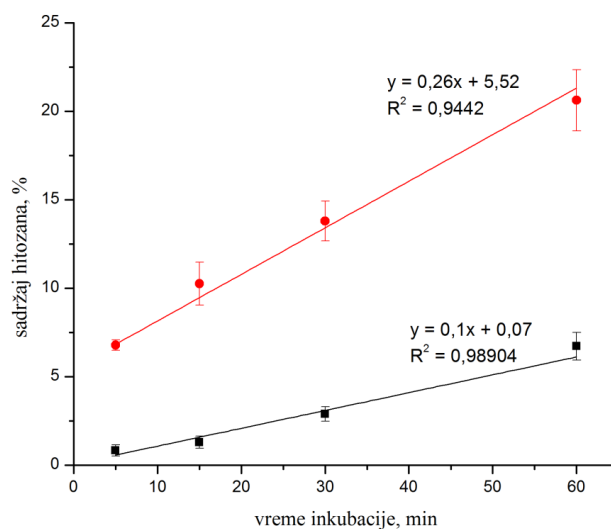
mikročestica, rastao je i sadržaj hitozana u mikročesticama. Interesantno je da je ovaj porast za sve ispitivane formulacije bio gotovo linearan. Ukoliko se uporede nagibi pravih dobijenih linearnom regresionom analizom, može se zaključiti da je porast sadržaja hitozana u mikročesticama, odnosno brzina njegovog vezivanja za Ca-alginatnu hidrogel mrežu mikročestica bila znatno veća kada je koncentracija hitozana iznosila 1,0 % (m/m), nego kada je bila desetostruko manja. Time je još jednom potvrđena izuzetna sposobnost vezivanja oligosaharidnog hitozana za Ca-alginatni matriks.

Ukoliko se posmatra položaj poslednjih tačaka na graficima (koje odgovaraju vremenu inkubacije od 60 min), može se primetiti da su u slučaju visokih koncentracija hitozana ove tačke pozicionirane ispod prave dobijene fitovanjem, što ukazuje da se brzina vezivanja hitozana u periodu između 30 i 60 min postepeno smanjuje. Ovo je moguće pripisati padu koncentracionog gradijenta između okolnog rastvora, odnosno gelirajućeg medijuma i jezgra mikročestica, ali i postepenom zasićenju, odnosno smanjenu slobodnih mesta (COO^-), raspoloživih za elektrostatičku interakciju sa oligohitozonom. Sa druge strane, pri nižim koncentracijama oligohitozana, ove tačke pozicionirane su nešto malo iznad prave, što pokazuje da je u ovom slučaju postojao blagi porast brzine kojom se oligohitozan vezivao za Ca-alginatni matriks u odnosu na inicijalnu brzinu vezivanja.



Slika 5.2.24. Uticaj vremena inkubacije mikročestica u: (■) 0,1 % (m/m) i (●) 1,0 % (m/m) rastvoru oligosaharidnog hitozana na sadržaj hitozana u mikročesticama izrađenih jednostepenim postupkom (konc. kalcijum-hlorida 1 % (m/m))

Ukoliko se uporede nagibi pravih koje opisuju porast sadržaja hitozana u mikročesticama inkubiranim u rastvorima istih koncentracija oligohitozana, ali različitim koncentracija kalcijum-hlorida, može se zaključiti da je porast sadržaja hitozana veći pri višim koncentracijama Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu. Potrebno je istaći da su ove razlike bile znatno veće pri većim ($0,18 < 0,26$ za 1 % (m/m)) nego pri nižim koncentracijama hitozana ($0,09 < 0,10$ za 0,1 %).



Slika 5.2.25. Uticaj vremena inkubacije mikročestica u: (■) 0,1 % (m/m) i (●) 1,0 % (m/m) rastvoru oligosaharidnog hitozana na sadržaj hitozana u mikročesticama izrađenih jednostepenim postupkom (konc. kalcijum-hlorida 2 % (m/m))

Kako bi se došlo do eksperimentalne potvrde da se oligosaharidni hitozan znatno brže i intenzivnije vezuje za Ca-alginatni matriks mikročestica u odnosu na hitozane većeg stepena polimerizacije, izvršeno je određivanje sadržaja hitozana u mikročesticama inkubiranih u rastvorima 0,1 % (m/m) oligosaharidnog, nisko- i visikomolekularnog hitozana.

Mikročestice koje su upotrebljene za ovo ispitivanje dobijene su jednostepenim postupkom, a koncentracija kalcijum-hlorida u rastvoru hitozana iznosila je 1,0 % (m/m). Rezultati ovog ispitivanja izraženi su kao procentualni sadržaj hitozana u ukupnoj masi osušenih mikročestica i predstavljeni u tabeli 5.2.4. iz koje se jasno vidi da je sposobnost vezivanja oligosaharidnog hitozana za Ca-alginatne mikročestice višestruko veća nego kod nisko- i visikomolekularnog hitozana. Međutim, poređenjem sadržaja nisko- i visikomolekularnog hitozana u mikročesticama, uočava se da se

visokomolekularni hitozan vezuje za Ca-alginatne mikročestice u većem stepenu nego niskomolekularni. To znači da iako je sposobnost vezivanja oligosaharidnog hitozana višestruko veća, ne važi generalni zaključak da sa porastom mase hitozana opada sposobnost njegovog vezivanja za mikročestice. Ovo otkriće je u skladu sa rezultatima do kojih se došlo u prvoj fazi istraživanja, a koji su potvrdili da mikročestice inkubirane u rastvoru visokomolekularnog hitozana imaju veću sposobnost da uspore oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance. Ono se može najverovatnije objasniti time što za razliku od oligosaharidnog hitozana, nisko- i visoko molekularni hitozan nemaju sposobnost prodiranja u unutrašnjost mikročestica, već polielektrolitni kompleks formiraju isključivo na površini mikročestica, te je samim tim njihov kapacitet vezivanja za Ca-alginatni matriks značajno ograničen. Razlika u sadržaju ova dva hitozana različitih molekulskih masa u mikročesticama, približno je jednaka razlici njihovih molekulskih masa.

Tabela 5.2.4. Uticaj molekulske mase hitozana na njegov sadržaj u osušanim mikročesticama* (n =3)

Koncentracija hitozana, 0,1 % (m/m)	Kalcijum-hlorid % (m/m)	Vreme inkubacije, min	Sadržaj hitozana, % ± s.d.
OSH	1,0	60	7,0 ± 0,4
NMH	1,0	60	0,1 ± 0,1
VMH	1,0	60	0,3 ± 0,1

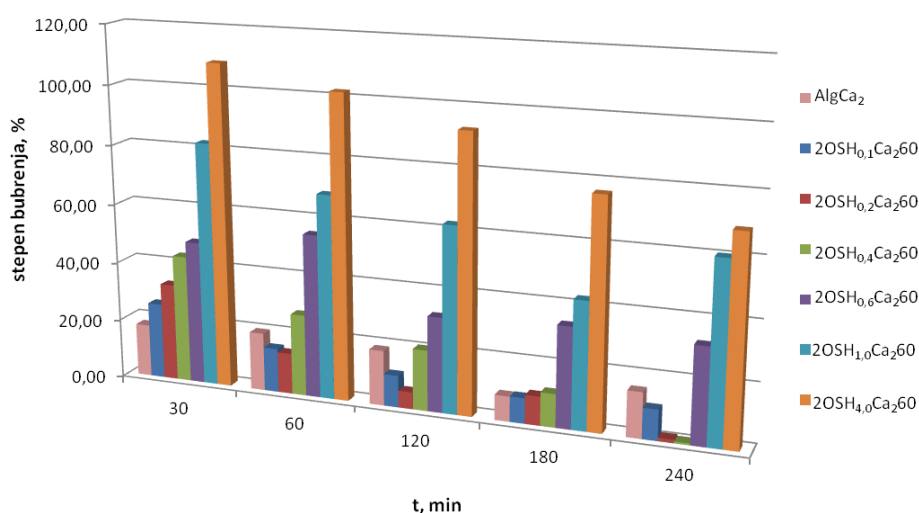
* mikročestice su izrađene jednostepenim postupkom

5.2.9. Ispitivanje sposobnosti bubrenja

Na slici 5.2.26 prikazane su vrednosti stepena bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica u veštačkom želudačnom soku. Sve mikročestice su izrađene dvostepenim postupkom, inkubacijom u rastvorima oligohitozana različitih koncentracija (0,1 do 4,0 % (m/m)). Radi utvrđivanja uticaja oligosaharidnog hitozana na sposobnost bubrenja mikročestica u kiseloj sredini, određen je stepen bubrenja mikročestica netretiranih hitozanom. Nakon 30 min inkubacije stepen bubrenja se kretao u opsegu između 17,76 i 108,77 %, zavisno od sadržaja oligohitozana. Preciznije, najmanju sposobnost preuzimanja vode u kiselom okruženju posedovale su Ca-alginatne mikročestice, dok je

sa porastom sadržaja oligohitozana u mikročesticama ta vrednost postepeno rasla. Ovo ukazuje na veću stabilnost Ca-alginatnih mikročestica u kiselom medijumu u odnosu na mikročestice tretirane hitozanom, što se može pripisati protonovanju $-NH_2$ grupa hitozana, koja je za posledicu imala slabljenje polielektrolitnog kompleksa, mestimično udaljavanje dva polimera i stvaranje pora koje su omogućile lakši prodor vode.

Ovakvi zaključci su u skladu sa rezultatima ispitivanja brzine rastvaranja naproksena *in vitro* u veštačkom želudačnom soku, koji su pokazali da porast sadržaja hitozana ima za posledicu blagi porast brzine rastvaranja inkapsuliranog naproksena. Nakon inicijalnog bubrenja, primetan je blagi pad vrednosti stepena bubrenja, koji je najverovatnije posledica destabilizacije kompleksa i postepenog gubitka sadržaja hitozana u mikročesticama. Da je reč o postepenom, a ne potpunom gubitku sadržaja hitozana kod mikročestica inkubiranih u rastvorima hitozana koncentracije $\geq 0,6$ % (m/m), ukazuje vrednost stepena bubrenja ovih mikročestica nakon 240 min, koji je i dalje znatno veći u odnosu na Ca-alginatne mikročestice.

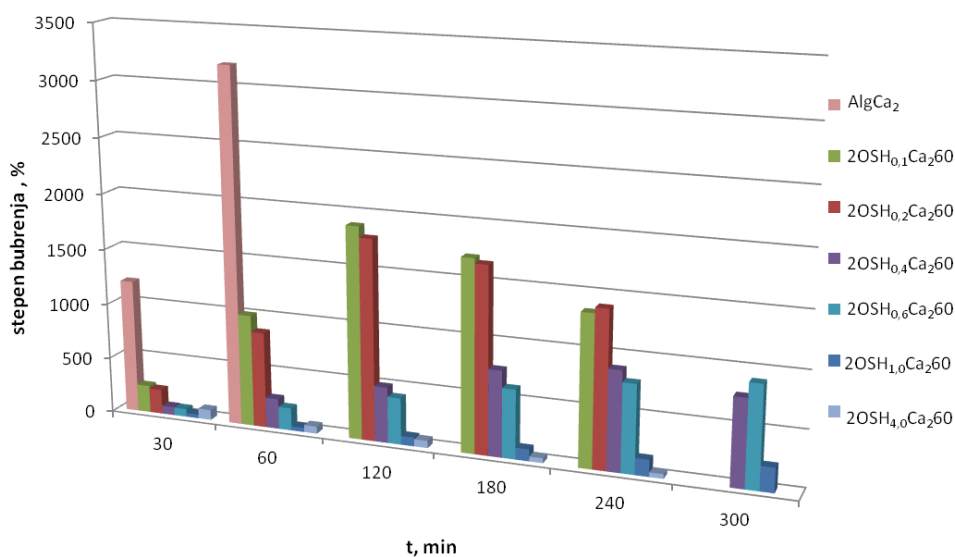


Slika 5.2.26. Stepen bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u veštačkom želudačnom soku

Nakon inkubacije istih formulacija u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 dobijeni su suprotni rezultati (slika 5.2.27). Naime, vrednosti stepena bubrenja bile su višestruko veće i nakon 30 min kretale su se u opsegu od 69,82 do 1201,40 %, gde su znatno nižu sposobnost preuzimanja vode imale mikročestice sa većim sadržajem hitozana. Na slici

5.2.27 može se uočiti da su mikročestice netretirane hitozanom naglo počele da bubre, a zatim i erodiraju, raspadajući se u potpunosti za manje od 90 min. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da inkubacija Ca-alginatnih mikročestica u rastvoru oligohitozana, tokom druge faze izrade mikročestica, za posledicu ima stabilizaciju mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8.

Najveću stabilnost u ovom medijumu imale su mikročestice inkubirane u 1 % (m/m) rastvoru oligosaharidnog hitozana. Sa daljim porastom sadržaja hitozana postepeno je i rasla sposobnost preuzimanja vode, a time i brzina oslobađanja inkapsuliranog naproksena iz mikročestica (5.2.10). Ovim je potvrđeno da formiranje polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan dovodi do povećanja stabilnosti mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8, ali i da sposobnost bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica zavisi od odnosa alginata i oligosaharidnog hitozana.

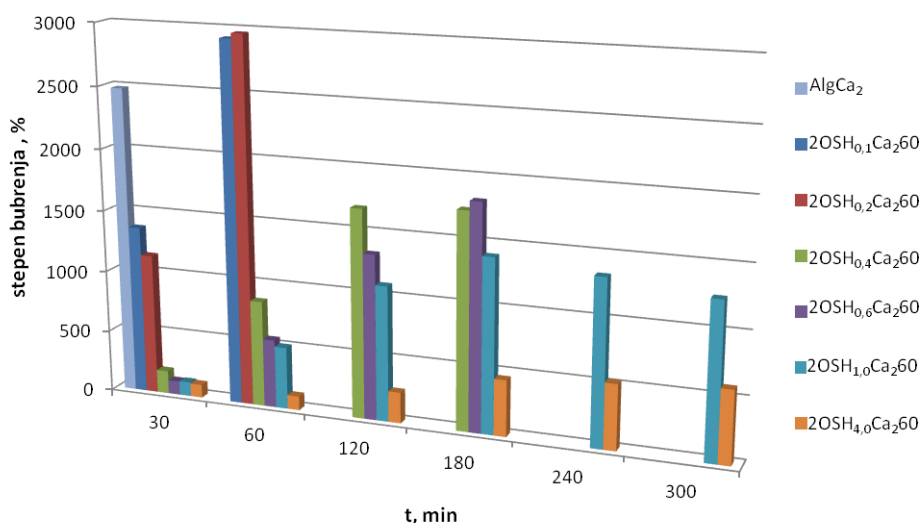


Slika 5.2.27. Stepen bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8

Kao što se može uočiti na slici 5.2.28, slično ponašanje mikročestica je zabeleženo i u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4, uz napomenu da su u ovom medijumu vrednosti stepena bubrenja bile višestruko veće nego pri pH 6,8.

Ca-alginatne mikročestice su brzo nakon inkubacije dostigle maksimalnu vrednost stepena bubrenja i raspale se u potpunosti za manje od 60 min, oslobađajući

inkapsulirani naproksen. Sa porastom sadržaja oligosaharidnog hitozana opadala je sposobnost preuzimanja vode iz okolnog medijuma, a vreme potrebno da dođe do raspadanja mikročestica je postajalo duže. Odnosno, u ovom medijumu stabilnost mikročestica tretiranih hitozanom je rasla sa porastom sadržaja hitozana u njima, a erozija je postepeno zahvatala mikročestice narušavajući njihov sferičan izgled.



Slika 5.2.28. Stepen bubrenja alginat-oligochitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

Na slici 5.2.29 prikazani su ostaci polielektrolitnog kompleksa alginat-oligochitozan zaostalog nakon 200 min inkubacije mikročestica formulacije 2OSH_{0,4}Ca₂60 u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4.



Slika 5.2.29. Izgled ostataka polielektrolitnog kompleksa alginat-oligochitozan nakon 200 min inkubacije mikročestica formulacije 2OSH_{0,4}Ca₂60 u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4 (t = 37 °C)

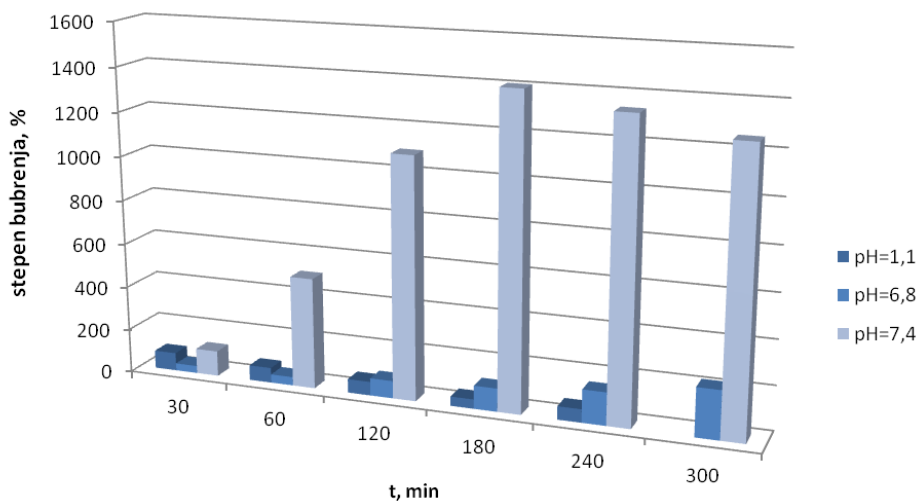
Iz svega navedenog može se zaključiti da je sposobnost bubrenja mikročestica tretiranih oligosaharidnim hitozanom jasno zavisna od pH vrednosti okolnog medijuma. Na slici 5.2.30 prikazane su vrednosti stepena bubrenja mikročestica dobijenih inkubacijom u 1 % (m/m) rastvoru oligohitozana. Očigledno, sa porastom pH vrednosti rasla je i sposobnost preuzimanja vode iz okolnog medijuma, uz izuzetak vrednosti stepena bubrenja dobijenih tokom prvih 60 min, najverovatnije zbog bržeg inicijalnog bubrenja u kiseloj sredini čija je vrednost nakon tog vremena postepeno opadala.

Uočeno pH zavisno bubrenje alginat-oligohitozan mikročestica može se pripisati pH osetljivosti polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan. Ovaj kompleks je zasnovan na elektrostatičkom privlačenju dva suprotno naelektrisana jona, alginata kao polianjona i hitozana kao polikationa. Alginat je slaba kiselina, a hitozan slaba baza, te je njihovo naelektrisanje uslovljeno pH vrednošću okolnog medijuma. Kada je pH vrednost izuzetno niska (veštački želudačni sok, pH ~ 1,2), -COO^- joni lanaca alginata su prevedeni u svoju protonovanu -COOH formu. To za posledicu ima smanjenje intenziteta privlačnih sila između alginata i hitozana, uprkos visokom stepenu protonovanja -NH_2 grupa hitozana, koje egzistiraju u obliku -NH_3^+ jona. Sa porastom pH vrednosti okolnog medijuma opada broj protonovanih -NH_2 grupa hitozana, ali se istovremeno povećava i broj -COO^- jona u lancima alginata stvarajući na taj način uslove za jače i bliže povezivanje dva polimera, odnosno dolazi do povećanja stabilnosti mikročestica, a time i pada sposobnosti preuzimanja vode.

S obzirom na pKa vrednosti alginata i hitozana (2.5.1) pretpostavlja se da je stabilnost polielektrolitnog kompleksa najveća u pH intervalu između 5,0 i 6,0, što je i razlog podešavanja pH vrednosti medijuma za oblaganje hitozanom na 5,5 dodatkom acetatnog pufera.

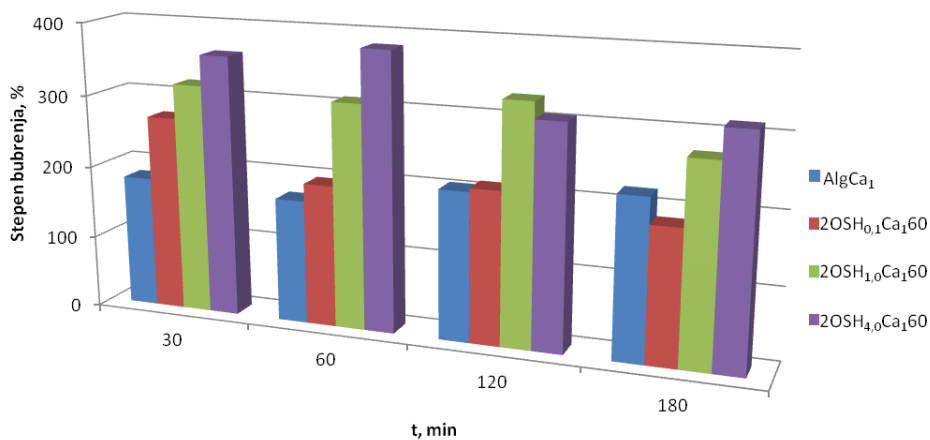
Dalje povećanje pH vrednosti okolnog medijuma u jednom trenutku ponovo dovodi do destabilizacije polielektrolitnog kompleksa, jer uprkos povećanju broja deprotonovanih -COOH grupa lanaca alginata, opada broj protonovanih -NH_2 grupa hitozana. Polielektrolitni kompleks ponovo slabi, lanci polimera se udaljavaju, intermolekulske veze postaju sve ređe i slabije stvarajući na taj način prostor za prodor vode dublje u unutrašnjost mikročestica. Otuda i potiče znatno veća nestabilnost

mikročestica tretiranih hitozanom u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4 nego u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8.



Slika 5.2.30. Uticaj pH vrednosti na stepen bubrenja 2OSH_{1,0}Ca₂₆₀ alginat-oligochitozan mikročestica

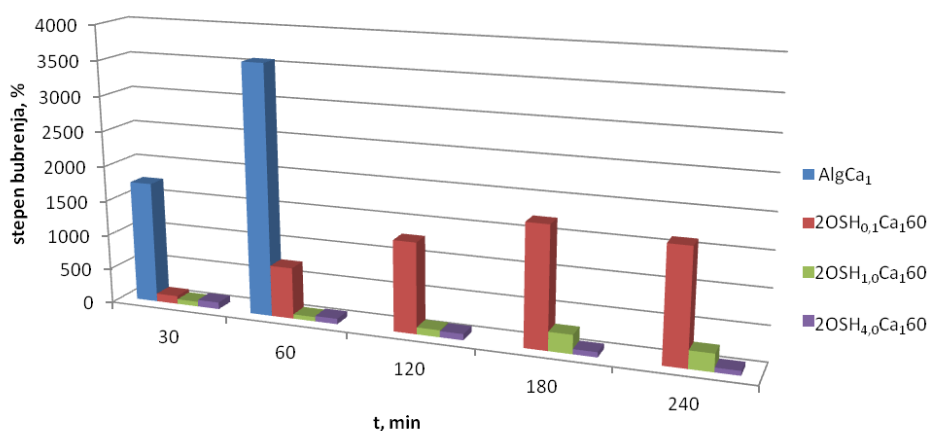
Slično ponašanje u veštačkom želudačnom soku (slika 5.2.31), fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 (slika 5.2.32) i 7,4 (slika 5.2.33) pokazale su Ca-alginatne mikročestice i alginat-oligochitozan mikročestice dobijene inkubacijom u rastvorima sa dvostruko nižim sadržajem kalcijumovih jona. Ovim zapažanjem je potvrđeno da sadržaj kalcijuma ne utiče bitno na pH osetljivost mikročestica, već da je za takvo ponašanje prvenstveno odgovorna pH osetljiva priroda polielektrolitnog kompleksa.



Slika 5.2.31. Stepen bubrenja alginat-oligochitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom (veštački želudačni sok)

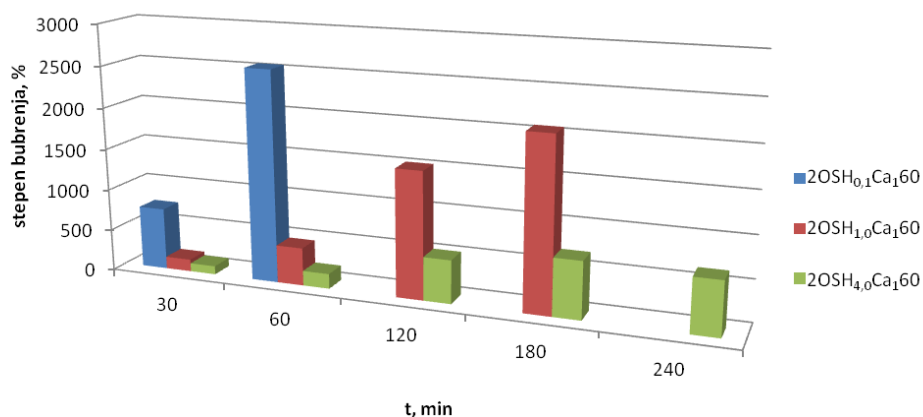
U veštačkom želudačnom soku sposobnost bubrenja ovih mikročestica rasla je sa porastom sadržaja hitozana (slika 5.2.31). Osim toga, nakon prvih 60 min uočen je pad stepena bubrenja kod mikročestica sa visokim sadržajem hitozana (2OSH_{1,0}Ca₁₆₀ i 2OSH_{1,0}Ca₁₆₀), najverovatnije zbog destabilizacije polielektrolitnog kompleksa, usled izraženog protonovanja –NH₂ grupa hitozana, koja je za posledicu imala njegovo delimično odvajanje iz kompleksa sa alginatom.

Poređenjem vrednosti stepena bubrenja mikročestica inkubiranih u rastvorima različitih koncentracija kalcijumovih jona, može se zaključiti da su mikročestice sa nižim sadržajem kalcijuma u kiseloj sredini imale daleko veću sposobnost preuzimanja vode, pa je generalno i brzina oslobađanja naproksena iz ovih mikročestica pri niskim pH vrednostima bila veća (5.2.10). Na osnovu poređenja rezultata predstavljenih na slikama 5.2.27 i 5.2.32, odnosno 5.2.28 i 5.2.33 može se zaključiti da uticaj kalcijuma na sposobnost bubrenja mikročestica dolazi do izražaja u kiselom medijumu, dok su razlike u fosfatnim puferima pH vrednosti pH 6,8 i 7,4 bile daleko manje.



Slika 5.2.32. Stepen bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom (fosfatni pufer pH vrednosti 6,8)

Tokom inkubacije u fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 i 7,4 kod mikročestica sa nižim sadržajem kalcijuma, sposobnost preuzimanja vode je takođe opadala sa porastom sadržaja oligosaharidnog hitozana, odnosno rasla je njihova stabilnost (slika 5.2.32. i 5.2.33).



Slika 5.2.33. Stepen bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom (fosfatni pufer pH vrednosti 7,4)

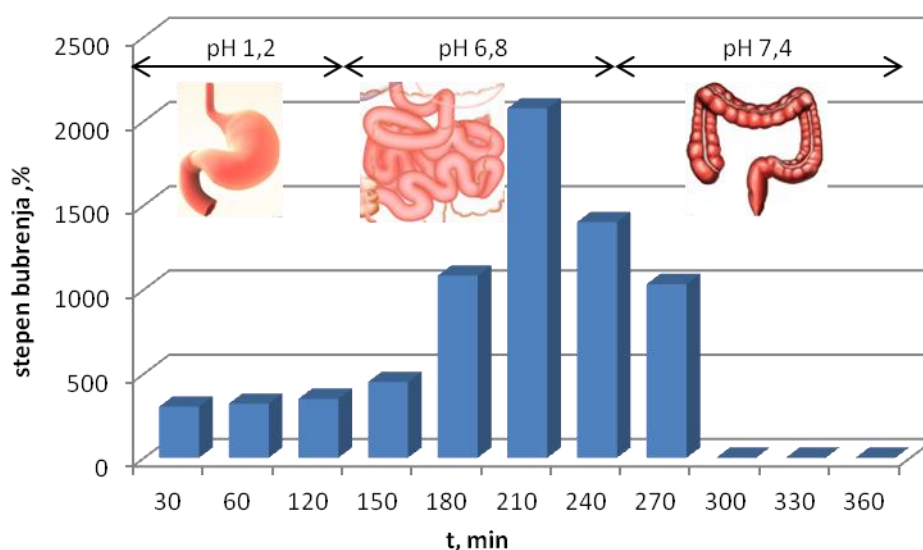
U cilju predviđanja ponašanja mikročestica tretiranih oligosaharidnim hitozanom *in vivo*, ispitivanje sposobnosti bubrenja je vršeno i u uslovima sličnim onima u GIT-u.

Osušene mikročestice su inkubirane tokom 120 min u veštačkom želudačnom soku, zatim 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 i poslednjih 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4. Za ova ispitivanja odabrana je model formulacija 2OSH_{1,0}Ca₁₆₀ koja je pokazala zadovoljavajuću stabilnost, odnosno relativno nisku sposobnost preuzimanja vode u svim ispitivanim medijumima. Iako je formulacija 2OSH_{4,0}Ca₁₆₀ posedovala najmanju sposobnost preuzimanja vode pri višim pH vrednostima, prednost je data formulaciji 2OSH_{1,0}Ca₁₆₀ zbog znatno manje izraženog bubrenja u kiselom medijumu.

Rezultati ovog ispitivanja prikazani su na slici 5.2.34. Može se primetiti da su mikročestice nakon inicijalnog preuzimanja vode tokom inkubacije u veštačkom želudačnom soku sporo preuzimale dodatnu količinu vode, ali da je nakon izmene medijuma, odnosno porasta pH vrednosti na 6,8 stepen bubrenja naglo porastao dostižući svoj maksimum nakon 210 min eksperimenta. Od tog trenutka masa nabubrelih mikročestica naglo počinje da se smanjuje, usled rastvaranja inkapsuliranog naproksena, erozije Ca-alginatne hidrogel mreže i polielektrolitnog kompleksa. Nakon 300 min eksperimenta zabeležena je potpuna erozija matriksa mikročestica.

Poređenjem ponašanja iste model formulacije inkubirane u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8, nakon prethodne inkubacije u kiselom medijumu, sa ponašanjem nakon

direktne inkubacije osušenih mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 može se zaključiti da je prethodno tretiranje mikročestica kiselim medijumom imalo za posledicu povećano preuzimanje vode. Ovo zapažanje se može objasniti izvesnim stepenom destabilizacije polielektrolitnog kompleksa tokom inkubacije u kiselom medijumu, usled intenzivnog protonovanja $-\text{COO}^-$ jona alginata. Ovakvo slabljenje međumolekulskih veza između dva polimera za posledicu je imalo mestimično razmicanje lanaca polimera i stvaranje prostora za ulazak vode u mikročestice.



Slika 5.2.34. Step en bubrenja alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom (formulacija $2\text{OSH}_{1,0}\text{Ca}_160$) tokom inkubacije u veštačkom želudačnom soku, fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 i 7,4, redom

Proces bubrenja model formulacija $1\text{OSH}_{0,1}\text{Ca}_160$ i $1\text{OSH}_{1,0}\text{Ca}_160$ praćen je i vizuelno primenom USB mikroskopa CY-800B (4.2.7). Mikročestice su fotografisane neposredno pred početak eksperimenta, nakon 15, 30, 60, 120 i 180 min, a rezultati su prikazani na slici 5.2.35 (veštački želudačni sok) i 5.2.36. (fosfatni pufer pH vrednosti 6,8).

Kao što se može primetiti na slikama 5.2.35 i 5.2.36 mikročestice sa niskim sadržajem oligosaharidnog hitozana ($1\text{OSH}_{0,1}\text{Ca}_160$) bile su bele boje, koja je karakteristična za Ca-alginatne mikročestice sa inkapsuliranim naproksenom čiji su kristali dispergovani u matriksu mikročestica (dokazano termalnom analizom), dok su

mikročestice sa visokim sadržajem oligohitozana ($1OSH_{1,0}Ca_{160}$) imale izraženiju žutobraon boju, koja se može objasniti visokim sadržajem oligosaharidnog hitozana (prašak izrazito žutobraon boje).

U kiselom medijumu nisu uočene intenzivnije promene izgleda mikročestica, pri datom uvećanju, s obzirom da ni sposobnost bubrenja nije tako izražena u kiselom medijumu kao u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8. Međutim, može se primetiti da je inicijalno bubrenje mikročestica (nakon 30 min) bilo nešto izraženije kod $1OSH_{1,0}Ca_{160}$ mikročestica nego kod $1OSH_{0,1}Ca_{160}$ mikročestica, što je u skladu sa dobijenim vrednostima stepena bubrenja u ovom medijumu. Uočena razlika bila je vidljiva i nakon 180 min eksperimenta (slika 5.2.35).

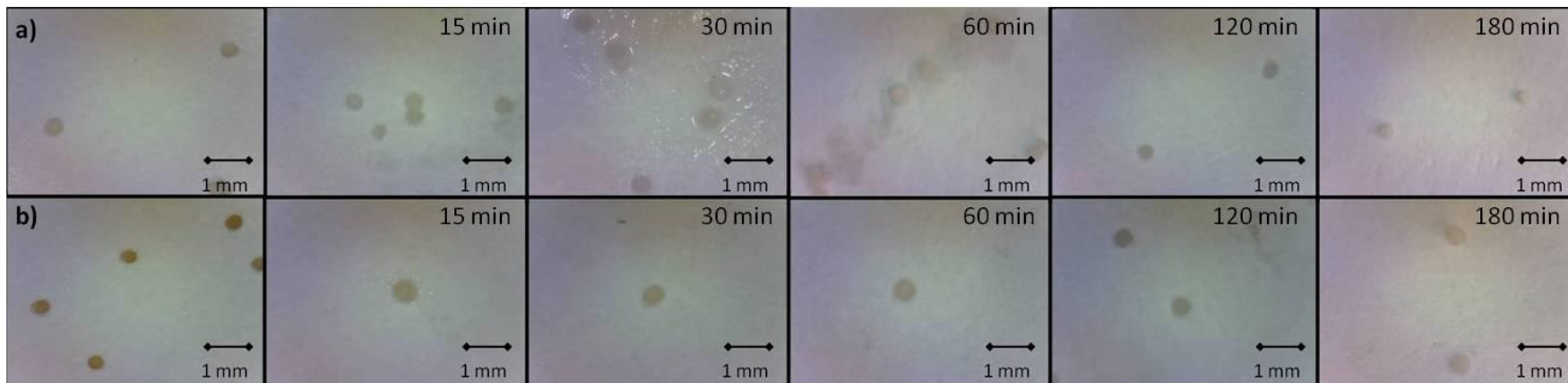
Uticao oligosaharidnog hitozana na sposobnost bubrenja mikročestica u veštačkom želudačnom soku na mikročestice može se uočiti na mikrografijama predstavljenim na slici 5.2.37. Iako je sposobnost bubrenja Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica bila mala, na slici 5.2.37 može se uočiti da je ona bila nešto izraženija kod alginat-oligohitozan mikročestica, što za posledicu ima nešto brže oslobađanje inkapsuliranog naproksena (5.2.10).

Kao što je očekivano, razlike između posmatranih formulacija bile su evidentnije u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8. Na slici 5.2.36 može se jasno uočiti da su već nakon 30 min inkubacije u ovom medijumu $1OSH_{0,1}Ca_{160}$ mikročestice bile znatno uvećane i postale transparentne, što ukazuje ne samo na činjenicu da su preuzele veliku količinu vode, nego i da je veći deo naproksena izašao iz mikročestica. Najverovatnije, mala količina vezanog oligosaharidnog hitozana nije bila dovoljna da stabilizuje Ca-alginatnu hidrogel mrežu.

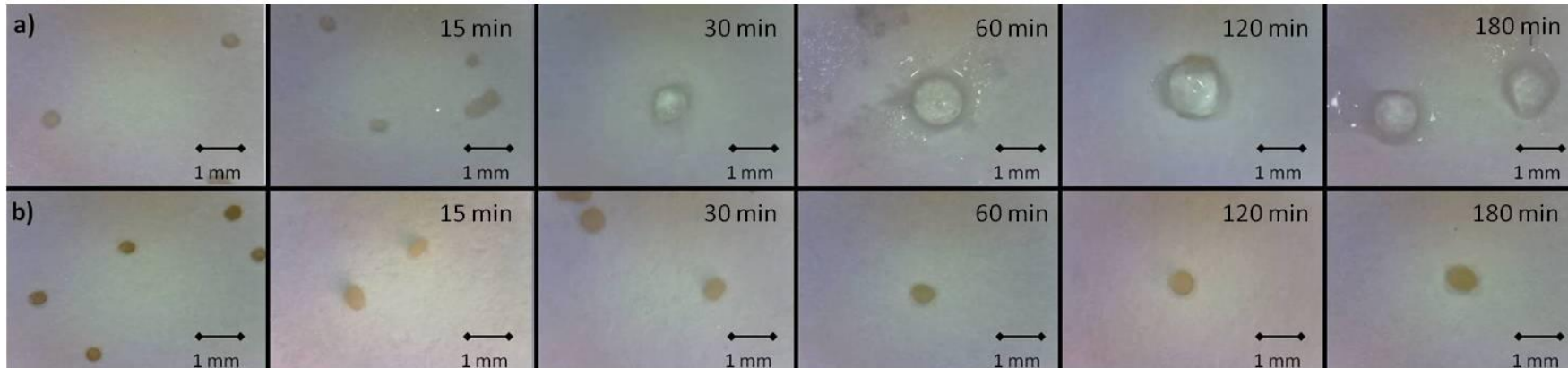
Sa druge strane, $1OSH_{1,0}Ca_{160}$ mikročestice su preuzimale vodu daleko sporije, a može se primetiti da su u velikoj meri zadržale svoju prvobitnu boju koja potiče od hitozana, što znači da je hitozan i nakon 180 min inkubacije u ovom medijumu i dalje bio prisutan u mikročesticama.

Do sličnih rezultata došlo se analizom bubrenja mikročestica tretiranih i netretiranih oligohitozonom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8, primenom mikroskopa Zeiss ApoTome Imager Z1 (slika 5.2.38). Za razliku od Ca-alginatnih

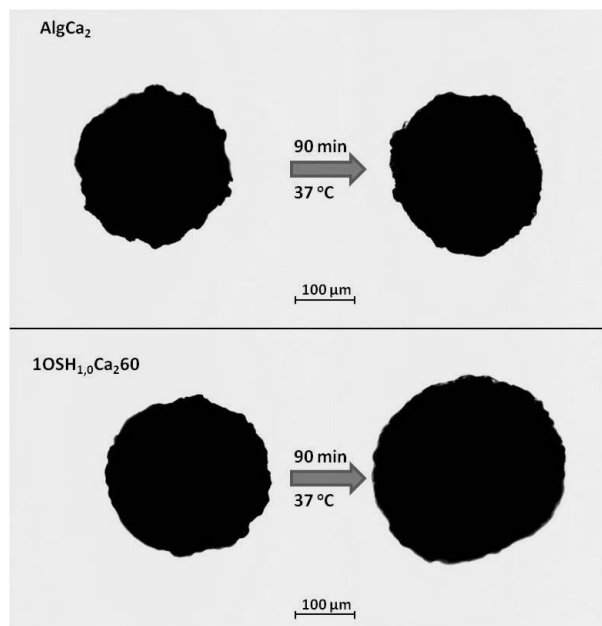
mikročestica koje su nakon 90 min bubrenja u ovom medijumu gotovo u potpunosti erodirale, mikročestice stabilizovane polielektrolitnim kompleksom alginat-oligohitozan očuvale su integritet hidrogel matriksa, što za posledicu ima i usporeno oslobađanje inkapsuliranog naproksena (5.2.10).



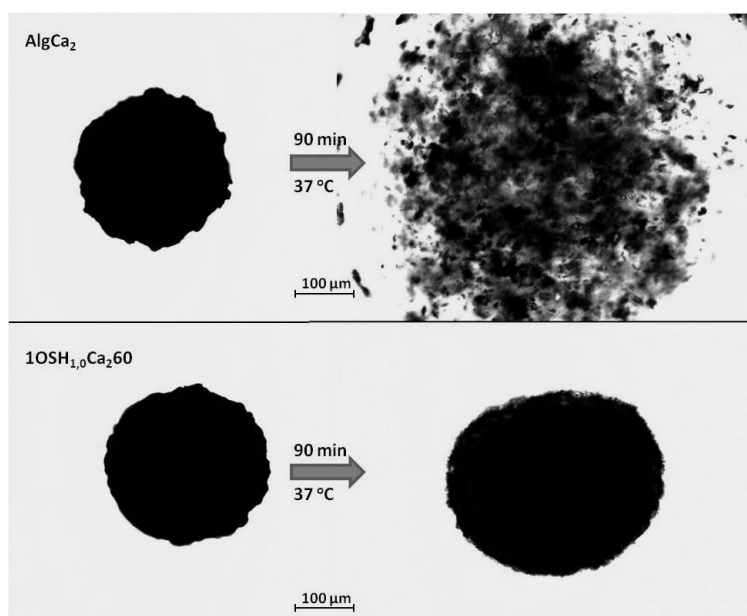
Slika 5.2.35. Izgled mikročestica a) $IOSH_{0,1}Ca_{160}$ i b) $IOSH_1Ca_{160}$: pre bubrenja, nakon 15,30, 60, 120 i 180 min u veštačkom želudačnom soku (sa leva na desno)



Slika 5.2.36. Izgled mikročestica a) $IOSH_{0,1}Ca_{160}$ i b) $IOSH_{1,0}Ca_{160}$: pre bubrenja, nakon 15, 30, 60, 120 i 180 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 (sa leva na desno)



Slika 5.2.37. Izgled Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica pre (levo) i nakon bubrenja u veštačkom želudačnom soku (desno)



Slika 5.2.38. Izgled Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica pre (levo) i nakon bubrenja u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 (desno)

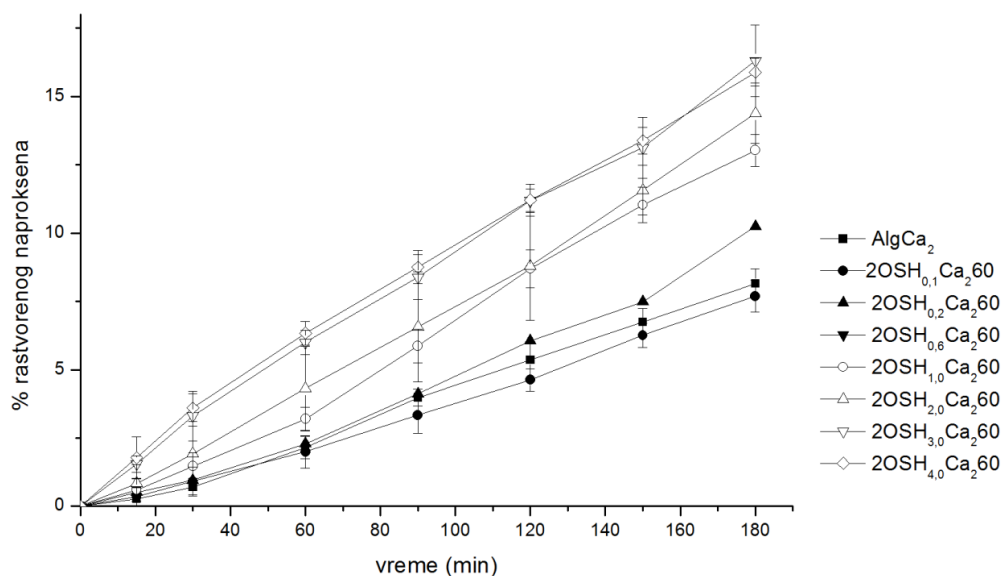
5.2.10. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica

Profili rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih mikročestica netretiranih i tretiranih rastvorima oligosaharidnog hitozana različitih koncentracija u veštačkom želudačnom soku prikazani su na slici 5.2.39.

Na slici se može primetiti da je procenat rastvorenog naproksena u ovom medijumu nakon 180 min bio manji od 17,5 % od celokupne količine inkapsuliranog naproksena za sve ispitivane formulacije. Ovako sporo oslobađanje naproksena može se pripisati nedovoljnoj stabilnosti Ca-alginatne hidrogel mreže i slaboj rastvorljivosti naproksena u kiseloj sredini. Sporije oslobađanje inkapsuliranog naproksena uočeno je kod mikročestica koje nisu tretirane hitozanom (AlgCa_2) ili su inkubirane u rastvorima sa niskim sadržajem hitozana ($2\text{OSH}_{0,1}\text{Ca}_260$). Ovo zapažanje dodatno potvrđuje pretpostavku da je stabilnost Ca-alginatnog matriksa odgovorna za usporeno oslobađanje naproksena iz mikročestica.

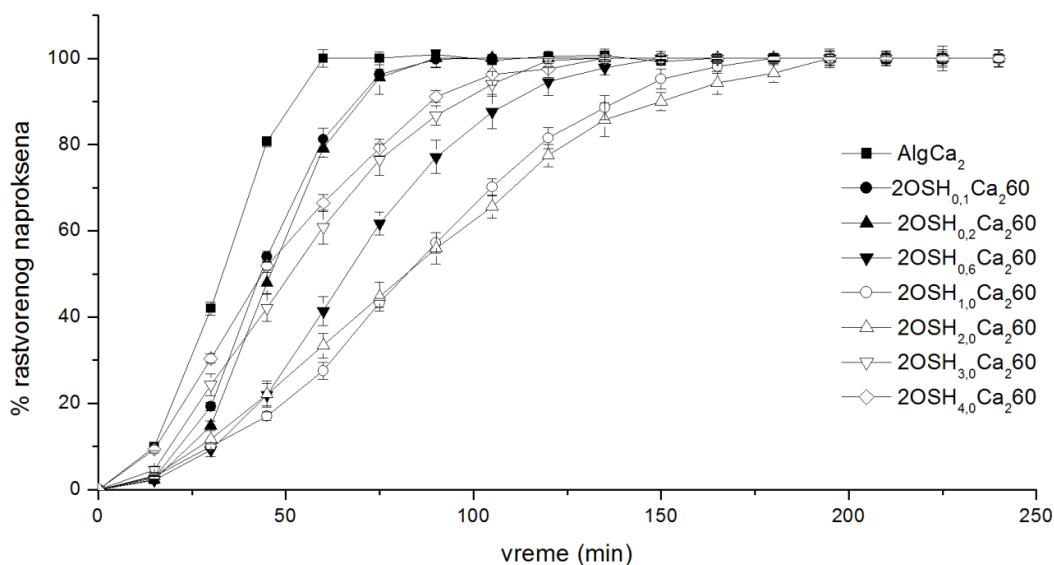
Sa porastom sadržaja hitozana u strukturi mikročestica postepeno je rasla i brzina oslobađanja naproksena, te je najveća količina inkapsuliranog naproksena oslobođena iz $2\text{OSH}_{4,0}\text{Ca}_260$ mikročestica, sa 17,01 % oslobođenog naproksena nakon 180 min. Iako je brzina kojom se lekovita supstanca oslobađala iz mikročestica tretiranih hitozanom bila veća u odnosu na brzinu oslobađanja iz Ca-alginatnih mikročestica, generalno posmatrano, oslobađanje model lekovite supstance u ovom medijumu bilo je sporo kod svih ispitivanih formulacija.

Uočeni uticaj oligohitozana na brzinu kojom se naproksen oslobađao iz mikročestica može se pripisati parcijalnoj destabilizaciji polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan usled intenzivnog protonovanja tokom inkubacije u kiselom medijumu. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da je ispitivanje sposobnosti bubrenja u istom medijumu pokazalo da sa porastom prisustva ovog oligomera raste i sposobnost preuzimanja vode. Navedeno istovremeno ukazuje da je proces bubrenja jedan od mehanizama značajnih za oslobađanje inkapsuliranog naproksena, te da sa porastom sposobnosti bubrenja raste i brzina kojom inkapsulirana lekovita supstanca napušta matriks mikročestica.



Slika 5.2.39. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom u veštačkom želudačnom soku

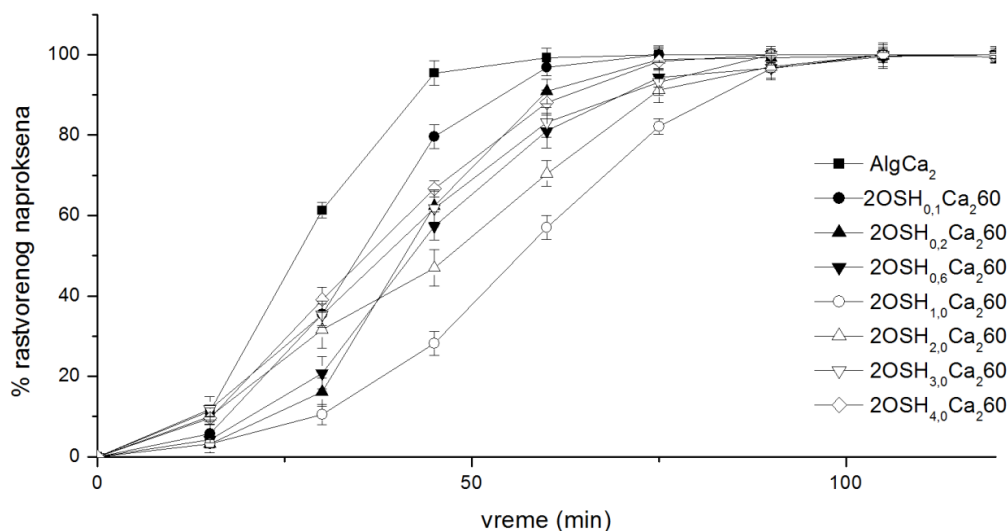
Kod svih ispitivanih formulacija brzina rastvaranja naproksena je bila znatno veća u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 (slika 5.2.40). Pored toga, uticaj hitozana na brzinu rastvaranja bio je potpuno suprotan od onoga u kiselom medijumu. Svega 60 min bilo je dovoljno da se sav naproksen inkapsuliran u Ca-alginatne mikročestice (AlgCa₂) nađe u okolnom medijumu, dok je kod mikročestica tretiranih oligohitozonom za potpuno oslobađanje naproksena bilo neophodno između 70 i 200 min. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da su studije ispitivanja sposobnosti bubrenja ukazale da uticaj inkubacije mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 u velikoj meri zavisi od prisustva i količine oligosaharidnog hitozana, te da mikročestice netretirane oligohitozonom brzo bubre dostižući izuzetno visoke vrednosti stepena bubrenja, a ubrzo potom u potpunosti erodiraju. Sa druge strane, prisustvo oligohitozana znatno je usporavalo stepen i brzinu kojom se proces bubrenja odvijao, produžujući na taj način vreme neophodno da dođe do potpune erozije mikročestica, a time i vreme potrebno da se u potpunosti oslobodi inkapsulirani naproksen.



Slika 5.2.40. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozanih mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8

Porast koncentracije hitozana u rastvoru za inkubaciju mikročestica tokom druge faze procesa inkapsulacije imao je za posledicu smanjenje brzine rastvaranja naproksena samo do koncentracije od 2,0 % (m/m), da bi kod mikročestica inkubiranih u rastvorima hitozana većih koncentracija (3,0 i 4,0 % (m/m)) brzina rastvaranja ponovo rasla. Uočeno upućuje na zaključak da formiranje polielektrolitnog kompleksa između alginata i oligosaharidnog hitozana može da stabilizuje Ca-alginatne mikročestice u medijumu pH vrednosti 6,8 usporavajući brzinu kojom se inkapsulirani naproksen oslobađa iz mikročestica, ali da taj uticaj nedvosmisleno zavisi od odnosa alginata i oligosaharidnog hitozana. Objašnjenje za ovo moguće je potražiti u prirodi nastalog polielektrolitnog kompleksa i njegovoj sposobnosti bubrenja. Moguće je pretpostaviti da je porast koncentracije oligosaharidnog hitozana u rastvoru za inkubaciju do 2,0 % (m/m) uslovio formiranje polielektrolitnog kompleksa koji je imao dovoljnu sposobnost bubrenja da formira viskozni hidrogel omotač oko mikročestica, stvarajući na taj način svojevrsnu barijeru koja je imala za posledicu usporeno kretanje model lekovite supstance procesom difuzije. Daljim povećanjem sadržaja oligohitozana u mikročesticama nastao je polielektrolitni kompleks sa manjom sposobnošću bubrenja, pa je izostalo formiranje ovog viskoznog hidrogel sloja oko mikročestica, ili je nastali

sloj bio znatno tanji i manje viskozan, pa je i njegova sposobnost da uspori difuziju molekula naproksena u okolni medijum bila znatno manja.

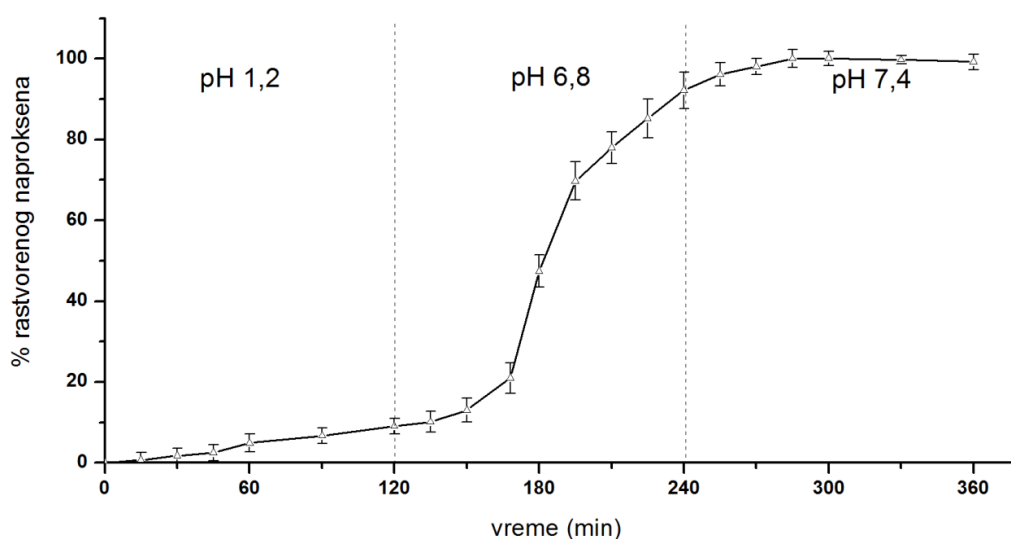


Slika 5.2.41. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligo-hitozanih mikročestica izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

Kako bi se dobili rezultati koji bi na najbolji mogući način predviđali ponašanje mikročestica tretiranih oligosaharidnim hitozanom *in vivo*, ispitivanje brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica vršeno je u uslovima sličnim onima u GIT-u. Tokom prvih 120 min eksperimenta kao medijum je korišćen veštački želudačni sok, zatim 120 min fosfatni pufer pH vrednosti 6,8 i tokom poslednjih 120 min fosfatni pufer pH vrednosti 7,4. Za ova ispitivanja odabrana je model formulacija 2OSH_{1,0}Ca₁60 jer je kod ove formulacije postignuto najsporije oslobađanje u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8, izuzimajući formulaciju 2OSH_{3,0}Ca₁60, ali je oslobađanje iz ove model formulacije bilo nešto brže u preostala dva medijuma.

Na slici 5.2.42 prikazani su rezultati ovog eksperimenta. Nakon prvih 120 min rastvoreno je svega 9,1 % inkapsuliranog naproksena, da bi nakon izmene medijuma brzina rastvaranja naproksena značajno porasla i za 240 min rastvorilo se ukupno 92,1 % naproksena. Kada se ove vrednosti uporede sa onim dobijenim nakon inkubacije u pojedinačnim medijumima, može se zaključiti da je brzina rastvaranja naproksena iz mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 nakon inkubacije u veštačkom želudačnom soku bila nešto veća. Ovo se može objasniti blagim bubrenjem

mikročestica tokom inkubacije u veštačkom želudačnom soku, a koje je posledica intenzivnog protonovanja, tako da se nakon izmene medijuma naproksen brže rastvara iz nabubrelih nego iz osušenih mikročestica. Međutim, ako se uzme u obzir da je za potpuno rastvaranje inkapsuliranog naproksena bilo potrebno više od 240 min, može se zaključiti da je i nakon izmene medijuma, odnosno u uslovima sličnim onima u GIT-u postignuto produženo oslobađanje naproksena iz alginat-oligohitozan mikročestica.

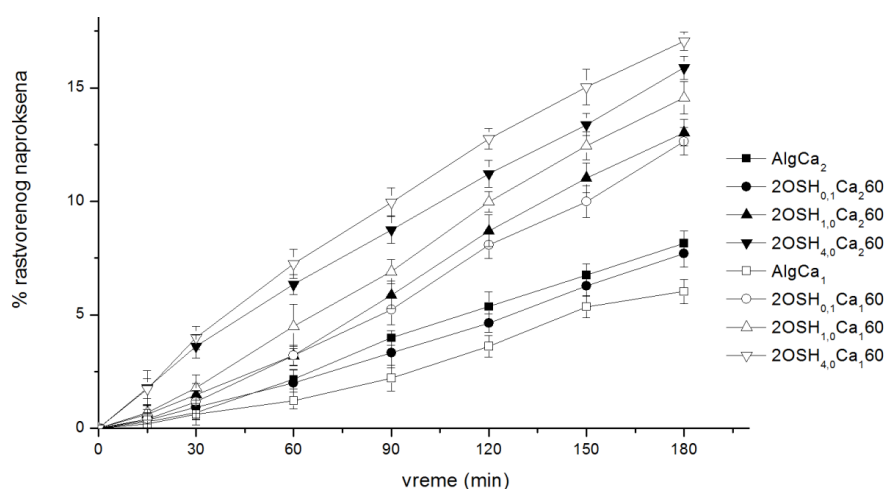


Slika 5.2.42. Profil brzine rastvaranja naproksena iz model formulacije $2OSH_1Ca,60$ uz izmenu medijuma: a) 120 min u veštačkom želudačnom soku, b) 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 i c) 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

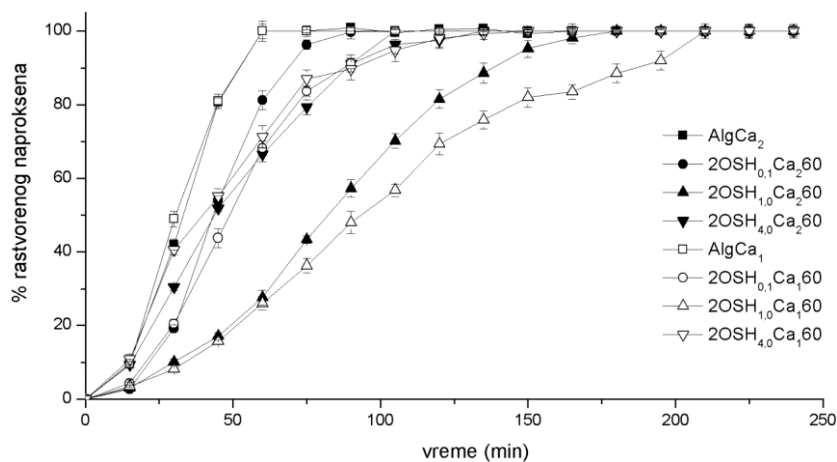
Na slikama 5.2.43, 5.2.44 i 5.2.45 predstavljen je uporedni prikaz profila brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica dobijenih inkubacijom u gelirajućim medijumima sa različitim sadržajem Ca^{2+} jona (1,0 i 2,0 % (m/m)).

U sva tri medijuma pokazano je da koncentracija Ca^{2+} jona nije značajno uticala na pH osetljivost mikročestica tretiranih oligosaharidnim hitozanom. Brzina rastvaranja naproksena iz mikročestica inkubiranih u rastvoru niže koncentracije Ca^{2+} jona (1,0 % (m/m)), je kao i kod mikročestica inkubiranih u rastvoru više koncentracije Ca^{2+} jona (2,0 % (m/m)) rasla sa porastom pH vrednosti okolnog medijuma. Iako su studije određivanja sadržaja hitozana u mikročesticama potvrdile postojanje statistički značajnog uticaja koncentracije Ca^{2+} jona na stepen vezivanja hitozana za Ca-alginatnu

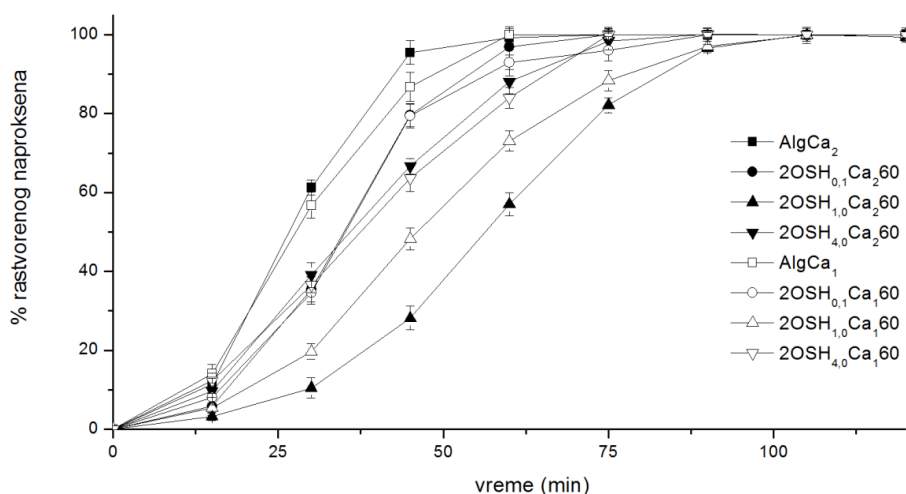
hidrogel mrežu (5.2.8), nije uočen značajniji uticaj ovog formulacionog parametra na brzinu kojom se naproksen oslobađao iz mikročestica, izuzev kod mikročestica koje su inkubirane u 1,0 % (m/m) rastvorima hitozana (2OSH_{1,0}Ca₁60 i 2OSH_{1,0}Ca₂60). Ovo je najverovatnije posledica razlike u sadržaju hitozana između posmatranih mikročestica, a koja je bila znatno veća kod mikročestica koje su inkubirane u rastvorima nižih koncentracija hitozana (2OSH_{0,1}Ca₁60 i 2OSH_{0,1}Ca₂60) u odnosu na mikročestice inkubirane u rastvorima viših koncentracija hitozana (2OSH_{4,0}Ca₁60 i 2OSH_{4,0}Ca₂60) (slika 5.2.23).



Slika 5.2.43. Uticaj koncentracije Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu na brzinu rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica u veštačkom želudačnom soku



Slika 5.2.44. Uticaj koncentracije Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu na brzinu rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8



Slika 5.2.45. Uticaj koncentracije Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu na brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

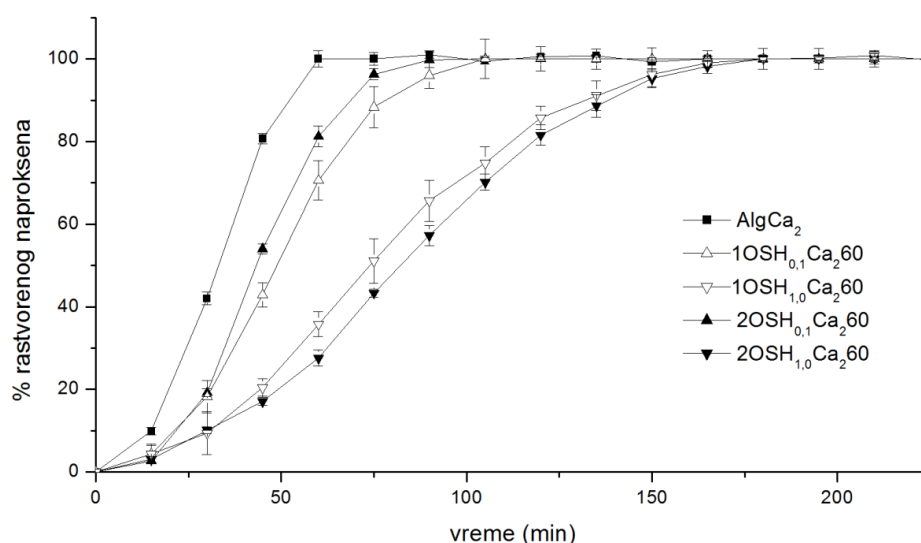
U cilju procene uticaja postupka izrade alginat-oligohitozan mikročestica na brzinu rastvaranja naproksena, poređeni su profili rastvaranja naproksena iz mikročestica izrađenih jednostepenim ($1OSH_{0,1}Ca_260$ i $1OSH_{1,0}Ca_260$) i dvostepenim ($2OSH_{0,1}Ca_260$ i $2OSH_{1,0}Ca_260$) postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 (slika 5.2.46).

Poređenje profila je vršeno na osnovu vrednosti faktora razlike (f_1) i sličnosti (f_2) koji su računati prema sledećim jednačinama:

$$f_1 = \frac{\sum_{i=1}^n |R_i - T_i|}{\sum_{i=1}^n R_i}$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\},$$

gde je n broj tačaka (uzorkovanja), R_i i T_i su % rastvorenog naproksena iz ispitivanih uzoraka mikročestica izrađenih jednostepenim i dvostepenim postupkom u vremenu t = i. Faktori sličnosti i razlike računati su pojedinačno za formulacije inkubirane u rastvorima hitozana koncentracija 0,1 i 1,0 % (m/m).

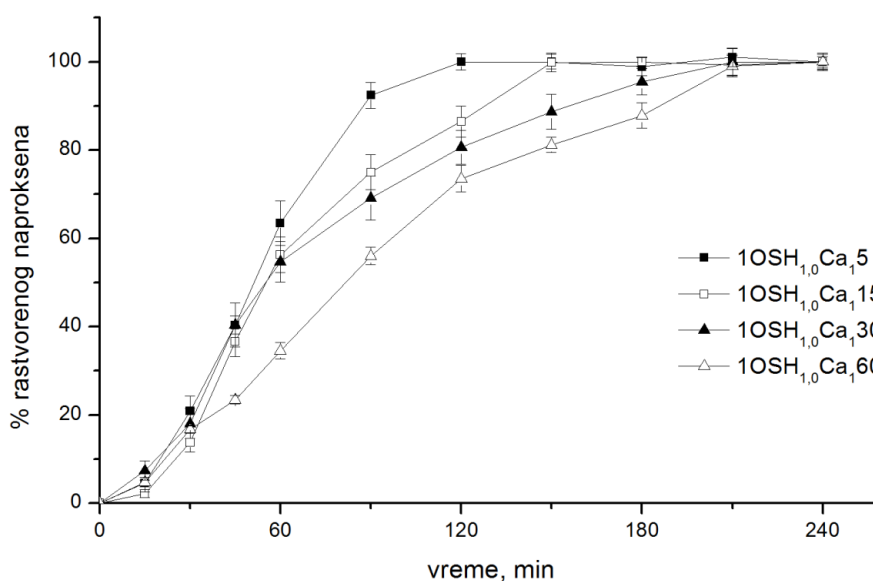


Slika 5.2.46. Poređenje profila brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica izrađenih jednostepenim i dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8

Za formulacije 1OSH_{1,0}Ca₂60 i 2OSH_{1,0}Ca₂60 vrednosti f_1 i f_2 su iznosile 4,45 i 68,44, redom. S obzirom da je za ove formulacije ispunjen uslov $f_1 < 15$ i $f_2 > 50$, može se zaključiti da su profili rastvaranja naproksena iz mikročestica izrađenih jednostepenim i dvostepenim postupkom slični, odnosno da izbor postupka izrade nije imao uticaj na brzinu rastvaranja naproksena. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima određivanja sadržaja oligosaharidnog hitozana u mikročesticama, koji su potvrdili da nema statistički značajne razlike u sadržaju oligohitozana u mikročesticama izrađenim jednostepenim i dvostepenim postupkom. Drugim rečima, za izradu mikročestica tretiranih oligohitozonom moguće je primeniti jednostepeni i dvostepeni postupak, bez nekog značajnijeg uticaja na brzinu kojom se inkapsulirani naproksen rastvara i oslobađa iz mikročestica. To praktično znači da je moguće skratiti i pojednostaviti postupak dobijanja mikročestica, što nije slučaj kada se koriste hitozani velike molekulske mase. Naime, ranije studije su pokazale, da kada se koriste hitozani velikih molekulskih masa, postupak izrade ima veliki uticaj na brzinu i stepen vezivanja hitozana za Ca-alginatne mikročestice. Kada se koriste hitozani velikih molekulskih masa pri istim uslovima, dvostepenim postupkom se postiže vezivanje oko sto puta veće količine hitozana nego pri jednostepenom postupku (Gasserod i sar., 1998). U prvom slučaju, usled prisustva Ca^{2+} jona u gelirajućem medijumu druge faze održava se

hidrogel mreža Ca-alginata nastala u prvoj fazi, što omogućava difuziju molekula hitozana u unutrašnjost mikročestica. Kod jednostepenog postupka membrana polielektrolitnog kompleksa formira se momentalno na kontaktnoj površini rastvora dva polimera i time je onemogućena dalja difuzija dugih lanaca molekula hitozana u tečni matriks koji čini jezgro mikročestica (Gasserod i sar., 1998).

Očvršćivanje unutrašnjosti ovih mikročestica najverovatnije je posledica difuzije malih Ca^{2+} jona iz gelirajućeg medijuma kroz polielektrolitnu membranu gde dolazi do formiranja Ca-alginatnog hidrogel matriksa. Prednost oligosaharidnog hitozana, ogleda se upravo u veličini njegovih lanaca, zahvaljujući kojoj ima sposobnost prodiranja dublje u unutrašnjost tečnog jezgra, baš kao i Ca^{2+} joni nakon formiranja membrane koju čini polielektrolitni kompleks alginat-hitozan.



Slika 5.2.47. Uticaj vremena inkubacije mikročestica u rastvoru oligosaharidnog hitozana na brzinu rastvaranja naproksena u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8

Na slici 5.2.47 prikazan je uticaj dužine inkubacije mikročestica u rastvoru oligosaharidnog hitozana na brzinu rastvaranja naproksena u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8. Očekivano, sa porastom vremena inkubacije opadala je brzina rastvaranja naproksena, što se može dovesti u vezu sa sadržajem hitozana u mikročesticama. Što je vreme inkubacije bilo duže, veći je bio sadržaj hitozana u mikročesticama, a time i povećana stabilnost polielektrolitnog matriksa mikročestica i njegova sposobnost da

uspори oslobađanje inkapsulirane model lekovite supstance. Ovo otkriće je potvrđeno rezultatima određivanja sadržaja oligohitozana u mikročesticama, prema kojima je produženje vremena inkubacije praćeno porastom sadržaja oligohitozana u strukturi mikročestica (5.2.8).

5.2.11. Primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica

Poređenjem koeficijenta determinacije svih primenjenih matematičkih modela koji su prikazani u tabeli 5.2.5, a koji su dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica u veštačkom želudačnom soku, može se zaključiti da *Korsmeyer-Peppas* model najbolje opisuje oslobađanje naproksena iz mikročestica ($r^2 > 0,99$). Uopšteno, to ukazuje na postojanje kombinovanog uticaja mehanizama difuzije i erozije na oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance (Korsmeyer i sar., 1983). Vrednosti *Korsmeyer-Peppas* eksponenta (n) za sve ispitivane formulacije su se kretale u opsegu od 0,79 do 1,52. Među njima samo su formulacije sa izuzetno visokim sadržajem oligosaharidnog hitozana u svom sastavu imale vrednost $0,43 < n < 1$, odnosno samo u slučaju ovih mikročestica zabeležen je tzv. anomalni transport koji predstavlja svojevrsnu kombinaciju mehanizama difuzije i erozije. Ovo je najverovatnije posledica delimične destabilizacije polielektrolitnog kompleksa do koje dolazi pri izuzetno niskim pH vrednostima, a koja se povećava sa porastom sadržaja hitozana u mikročesticama. U prilog tome idu znatno veće brzine rastvaranja inkapsuliranog naproksena iz ovih mikročestica u kiseloj sredini.

Na osnovu poređenja vrednosti stepena bubrenja mikročestica sa različitim sadržajem oligosaharidnog hitozana u kiseloj sredini, može se zaključiti da je nakon inicijalnog bubrenja, odnosno porasta mase kod mikročestica sa visokim sadržajem hitozana uočen značajan gubitak mase, koji se može pripisati eroziji. Kod ostalih formulacija mehanizmi oslobađanja naproksena odgovarali su tzv. super slučaju II transporta ($n > 1$) (Ritger i Peppas, 1987; Lao i sar., 2011). Kao što je već rećeno u prvom delu rada, ovakvi mehanizmi su bili očekivani, uzimajući u obzir da je reć o sistemima izrađenim od hidrofilnih polimera koji imaju sposobnost bubrenja, a javljaju

se usled porasta osmotskog pritiska praćenog relaksacijom lanaca polimera (Brazel i Peppas, 1999).

Parametri dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena u fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 i 7,4 iz mikročestica u odgovarajuće matematičke modele prikazani su u tabelama 5.2.7. i 5.2.7, redom. Ovde je uočen znatno manji stepen uklapanja u primenjene matematičke modele, u poređenju sa rezultatima dobijenim za veštački želudačni sok. Vrednosti koeficijenta determinacije ukazuju da se profili brzine rastvaranja za mikročestice sa visokim sadržajem oligosaharidnog hitozana najbolje uklapaju u model nultog reda. Drugim rečima, brzina rastvaranja naproksena iz mikročestica tretiranih rastvorima oligosaharidnog hitozana koncentracije 1,0 i 4,0 % (m/m) primiče se “idealnom“ slučaju, kod koga se u jednakim vremenskim intervalima oslobađaju jednake količine inkapsulirane lekovite supstance iz mikročestica. Ranija istraživanja sprovedena na mikročestičnim nosačima na bazi hitozana ukazala su na mogućnost primene ovog polimera i njegovih derivata za postizanje kinetike oslobađanja nultog reda (Lee i sar., 2009; Sevgi i sar., 2009; Barakat i Almurshedi, 2011). U prilog ovome idu i vrednosti *Korsmeyer-Peppas* eksponenta n kod ispitivanih mikročestica, koje su bliske vrednosti 1, a naročito za profile rastvaranja u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4. U tom slučaju, *Korsmeyer-Peppas* matematički model svodi se na jednačinu nultog reda.

Tabela 5.2.5. Parametri dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena u odgovarajuće matematičke modele (medijum: veštački želudačni sok)

Matematički model	Parametri	Formulacija							
		AlgCa ₂	2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	AlgCa ₁	2OSH _{0,1} Ca ₁ 60	2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	2OSH _{4,0} Ca ₁ 60
Nulti red	r ²	0,9946	0,9958	0,9954	0,9970	0,9785	0,9962	0,9984	0,9899
	k ₀	0,0474	0,0446	0,0781	0,0836	0,0371	0,0747	0,0861	0,0920
Prvi red	r ²	0,9979	0,9944	0,9945	0,9986	0,9700	0,9944	0,9985	0,9940
	k ₁	0,0068	0,0005	0,0008	0,0009	0,0004	0,0008	0,0009	0,0001
<i>Higuchi</i>	r ²	0,9734	0,9547	0,9611	0,9894	0,9245	0,9586	0,9769	0,9969
	k _h	0,8460	0,7622	1,3403	1,1456	0,6302	1,2806	1,4875	1,6133
<i>Korsmayer-Peppas</i>	r ²	0,9901	0,9995	0,9914	0,9994	0,9920	0,9971	0,9970	0,9990
	k	0,0670	0,0128	0,0170	0,2080	0,0025	0,0188	0,0514	0,2897
	n	1,1942	1,2327	1,2905	0,8328	1,5161	1,2554	1,0929	0,7873
<i>Hixon-Crowell</i>	r ²	0,9978	0,9949	0,9948	0,9982	0,9775	0,9951	0,9986	0,9927
	k _c	0,0008	0,0007	0,0013	0,0014	0,0006	0,0012	0,0014	0,0015

Tabela 5.2.6. Parametri dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena u odgovarajuće matematičke modele (medijum: fosfatni pufer pH vrednosti 6,8)

Matematički model	Parametri	Formulacija							
		AlgCa ₂	2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	AlgCa ₁	2OSH _{0,1} Ca ₁ 60	2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	2OSH _{4,0} Ca ₁ 60
Nulti red	r ²	0,9448	0,9229	0,9712	0,9890	0,9529	0,9472	0,9874	0,9810
	k ₀	1,8275	1,4249	0,7200	1,1224	1,8821	1,1725	0,5980	1,2452
Prvi red	r ²	0,8509	0,8384	0,8880	0,9644	0,8869	0,8829	0,9341	0,9718
	k ₁	0,0358	0,0273	0,0135	0,0214	0,0370	0,0188	0,0116	0,0212
<i>Higuchi</i>	r ²	0,7575	0,7101	0,8057	0,8842	0,7785	0,7498	0,8596	0,8833
	k _h	10,862	9,7900	7,7422	9,4802	11,292	8,1715	7,5098	9,2557
<i>Korsmayer-Peppas</i>	r ²	0,9602	0,8178	0,9040	0,9829	0,9528	0,8955	0,9252	0,9835
	k	0,8879	0,6362	0,5793	0,8738	0,8502	0,7293	0,5732	0,9108
	n	1,1123	1,0430	0,9595	1,0353	1,1278	1,0025	0,9475	1,0584
<i>Hixon-Crowell</i>	r ²	0,8879	0,8739	0,9252	0,9819	0,9167	0,9085	0,9612	0,9811
	k _c	0,0432	0,0332	0,0166	0,0262	0,0446	0,0246	0,0141	0,0271

Tabela 5.2.7. Parametri dobijeni uklapanjem profila brzine rastvaranja naproksena u odgovarajuće matematičke modele (medijum: fosfatni pufer pH vrednosti 7,4)

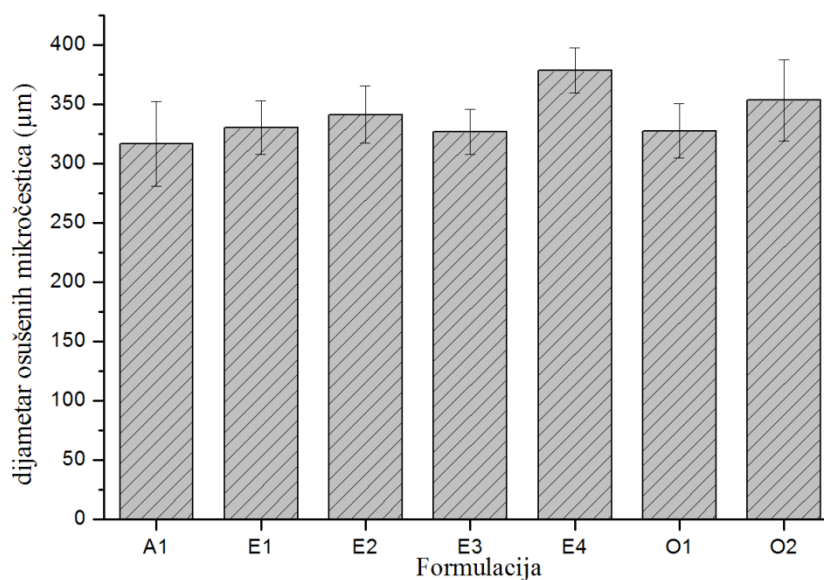
Matematički model	Parametri	Formulacija							
		AlgCa ₂	2OSH _{0,1} Ca ₂ 60	2OSH _{1,0} Ca ₂ 60	2OSH _{4,0} Ca ₂ 60	AlgCa ₁	2OSH _{0,1} Ca ₁ 60	2OSH _{1,0} Ca ₁ 60	2OSH _{4,0} Ca ₁ 60
Nulti red	r ²	0,8836	0,9064	0,9117	0,9620	0,9214	0,9120	0,9406	0,9751
	k ₀	2,0430	1,7904	1,1237	1,5285	1,8913	1,7645	1,2587	1,4351
Prvi red	r ²	0,8437	0,8111	0,8018	0,9153	0,8800	0,8099	0,8694	0,9255
	k ₁	0,0316	0,0343	0,0215	0,0246	0,0279	0,0339	0,0215	0,0224
<i>Higuchi</i>	r ²	0,6970	0,6941	0,6949	0,7931	0,7541	0,7068	0,7417	0,8212
	k _h	9,6659	10,400	8,7640	9,2122	9,1145	10,3110	8,7551	8,7420
<i>Korsmayer-Peppas</i>	r ²	0,9502	0,8955	0,8515	0,9659	0,9765	0,9398	0,9194	0,9872
	k	0,9024	0,7795	0,6219	0,8752	0,9324	0,8297	0,7570	0,9211
	n	1,1222	1,0787	0,9905	1,0752	1,1276	1,0842	1,0151	1,0677
<i>Hixon-Crowell</i>	r ²	0,8565	0,8462	0,8459	0,9345	0,8938	0,8466	0,8978	0,9453
	k _c	0,0420	0,0418	0,0261	0,0321	0,0377	0,0412	0,0274	0,0296

5.3. REZULTATI TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

5.3.1. Merenje veličine mikročestica

Srednje vrednosti dijametara Ca-alginatnih, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica su se kretale u opsegu između $316,8 \pm 35,6$ i $378,3 \pm 18,9$ μm (slika 5.3.1). Kao što je već objašnjeno (5.2.2), inkubacija Ca-alginatnih mikročestica u rastvoru oligohitozana imala je za posledicu povećanje veličine usled formiranja polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan, kako na površini, tako i u unutrašnjosti mikročestica, što je uticalo na smanjenje kontrakcije matriksa mikročestica tokom sušenja.

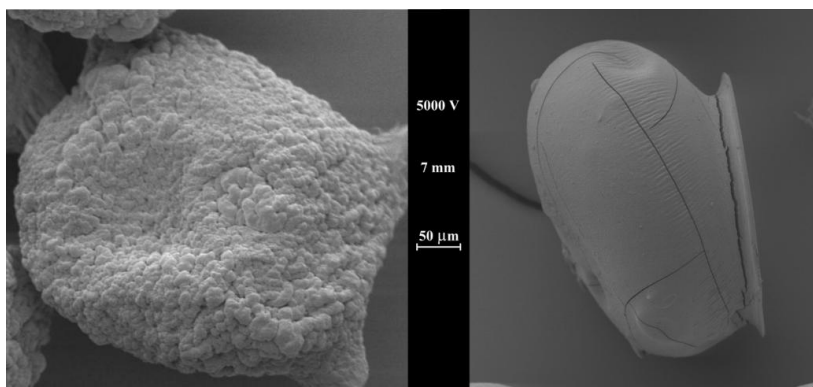
Naknadna inkubacija ovih mikročestica u rastvoru Eudragit®-a L 100-55, sa izuzetkom formulacije O4, nije dovela do značajnijeg rasta dijametra mikročestica. Ovo potvrđuje pretpostavku da se Eudragit® L 100-55 vezuje na površini mikročestica u vidu tankog polielektrolitnog kompleksa čije je postojanje potvrđeno detaljnom SEM, termalnom i FT-IR analizom.



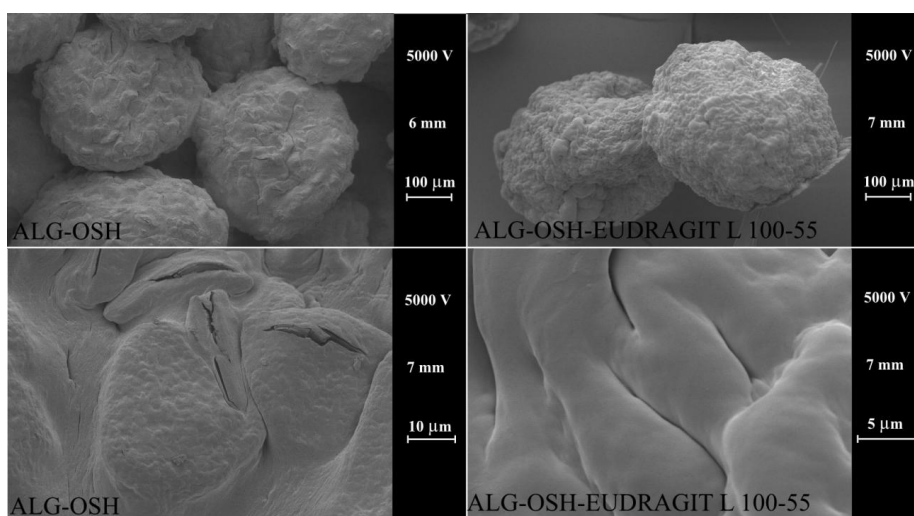
Slika 5.3.1. Srednje vrednosti dijametara osušenih Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica (n=100)

5.3.2. Ispitivanje morfologije i površinskih karakteristika mikročestica

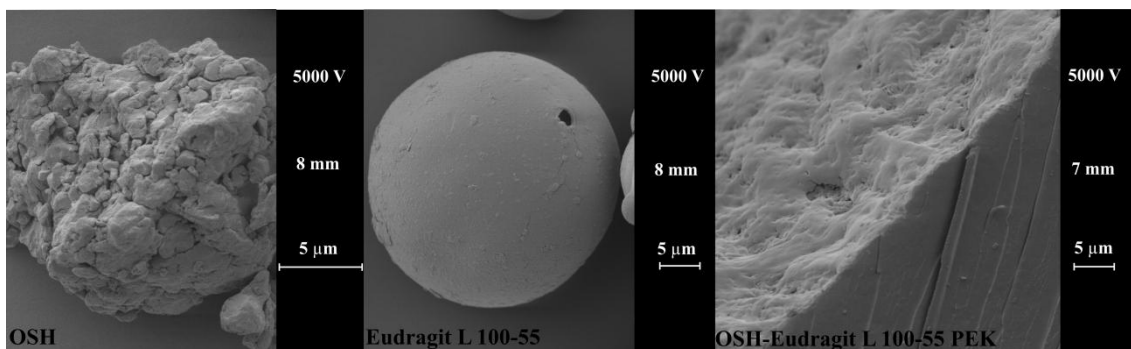
Poređenjem skenirajućih elektronskih mikrografija placebo alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica uočeno je da je inkubacija alginat-oligohitozan mikročestica u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 imala za posledicu formiranje površinskih vijuga u vidu nabora zaobljenih ivica koje potiču od oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 polielektrolitnog kompleksa (slika 5.3.2). Do sličnog zaključka može se doći poređenjem mikrografija alginat-oligohitozan mikročestica sa naproksenom, pre i nakon inkubacije u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 (slika 5.3.3), kao i poređenjem mikrografija pojedinačnih polimera sa mikrografijom polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 (slika 5.3.4).



Slika 5.3.2. Skenirajuće elektronske mikrografije placebo alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestice (levo) i placebo alginat-oligohitozan mikročestice (desno)

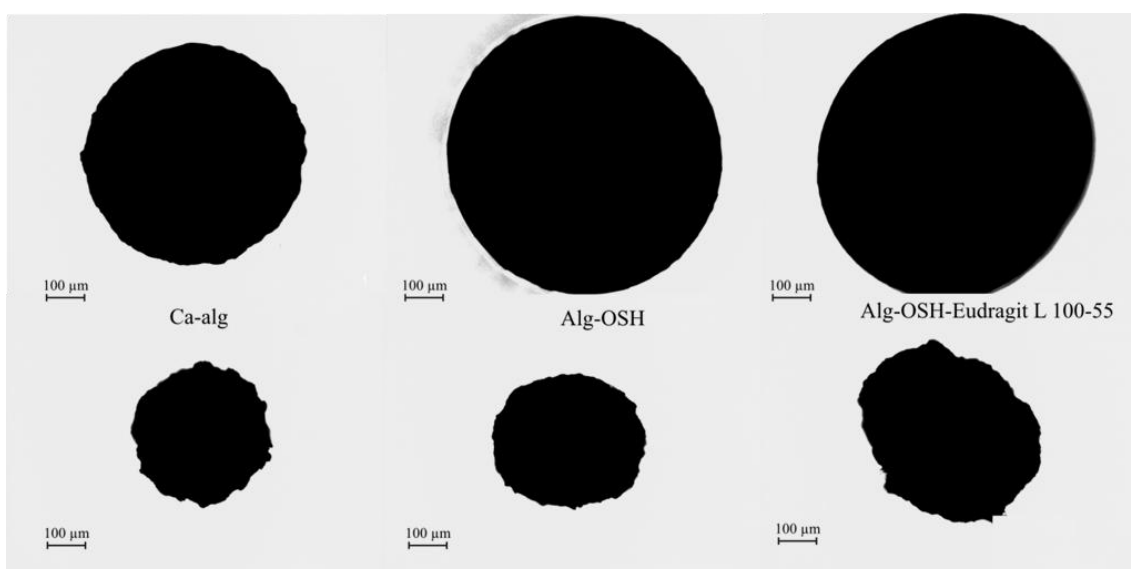


Slika 5.3.3. Skenirajuće elektronske mikrografije alginat-oligohitozan (levo) i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L100-55 mikročestica sa naproksenom (desno)



Slika 5.3.4. Skenirajuće elektronske mikrofografije oligohitozana, Eudragit[®]-a L 100-55 i polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L100-55 (sa leva na desno)

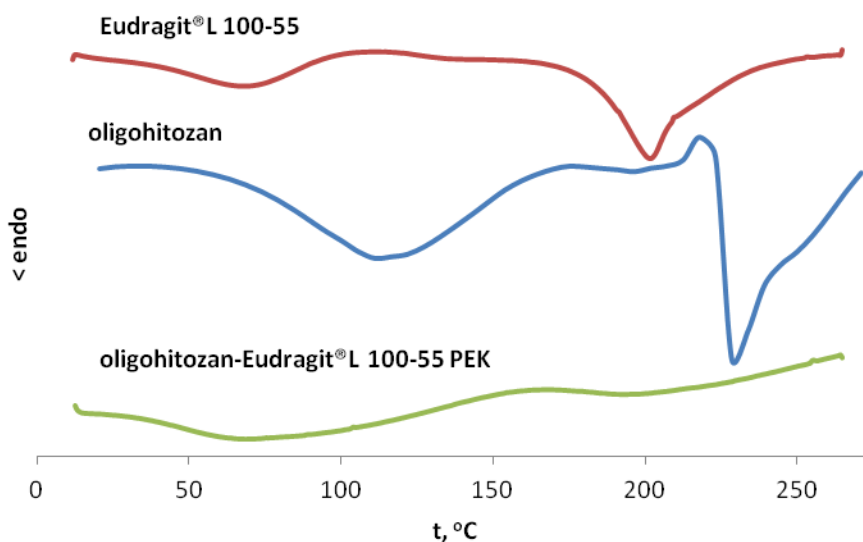
Mikročestice tretirane Eudragit[®]-om L 100-55 su imale sferičan oblik pre sušenja (slika 5.3.5), sličan onome kod alginat-oligohitozan mikročestica, na osnovu čega se može zaključiti da sam proces inkubacije u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 i formiranje polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 nisu uticali na oblik mikročestica. Međutim, tokom sušenja došlo je do značajne kontrakcije hidrogel matriksa alginat-oligohitozan, praćene blagom deformacijom sferičnog oblika, a čiji je uzrok gubitak velike količine vode, o čemu je već bilo reči u drugom delu rada (5.2.3). Na osnovu svega navedenog, moguće je zaključiti da inkubacija mikročestica u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 nije značajnije uticala na morfološke karakteristike mikročestica.



Slika 5.3.5. Uporedni prikaz veličine i oblika Ca-alginatnih (Ca-alg), alginat-oligohitozan (Alg-OSH) i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 (Alg-OSH-Eudragit[®] L 100-55) mikročestica sa naproksenom pre (gornji red) i nakon sušenja (donji red)

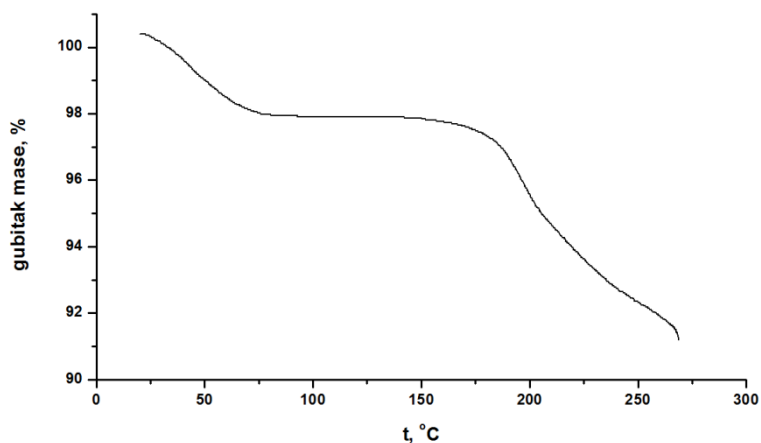
5.3.3. Termogravimetrijska i diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza

DSC termogrami oligohitozana, Eudragit[®]-a L 100-55 i polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 prikazani su na slici 5.3.6. Inicijalna endoterma (< 100 °C) koja je uočena na termogramu Eudragit[®]-a L 100-55 potiče od gubitka vode, a praćena je gubitkom mase koji se može uočiti na termogramu Eudragit[®]-a L 100-55 dobijenom TG analizom (slika 5.3.7). Nakon ove endoterme, na DSC termogramu Eudragit[®]-a L 100-55 uočen je slabo izražen pik na 128 °C koji se može pripisati staklastom prelazu amorfne frakcije polimera, što je u skladu sa literaturnim podacima (Miller i sar., 2008). Endotermni pik uočen na 202 °C odgovara procesu topljenja kristalne frakcije Eudragit[®]-a L 100-55 (Cebalos i sar., 2005; Corti i sar., 2008). Na termogramu polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 nisu primećeni ovi pikovi, kao ni pikovi koji potiču od termalnih karakteristika oligohitozana (detaljno objašnjenje termalnih karakteristika oligohitozana predstavljeno je u poglavlju 5.2.4). Navedena zapažanja ukazuju da su jake interakcije između dva polimera dovele do formiranja kompleksa sa potpuno drugačijim termalnim karakteristikama, kao i da u uzorku polielektrolitnog kompleksa nije bilo slobodnih (nevezanih) domena konstitutivnih polimera.

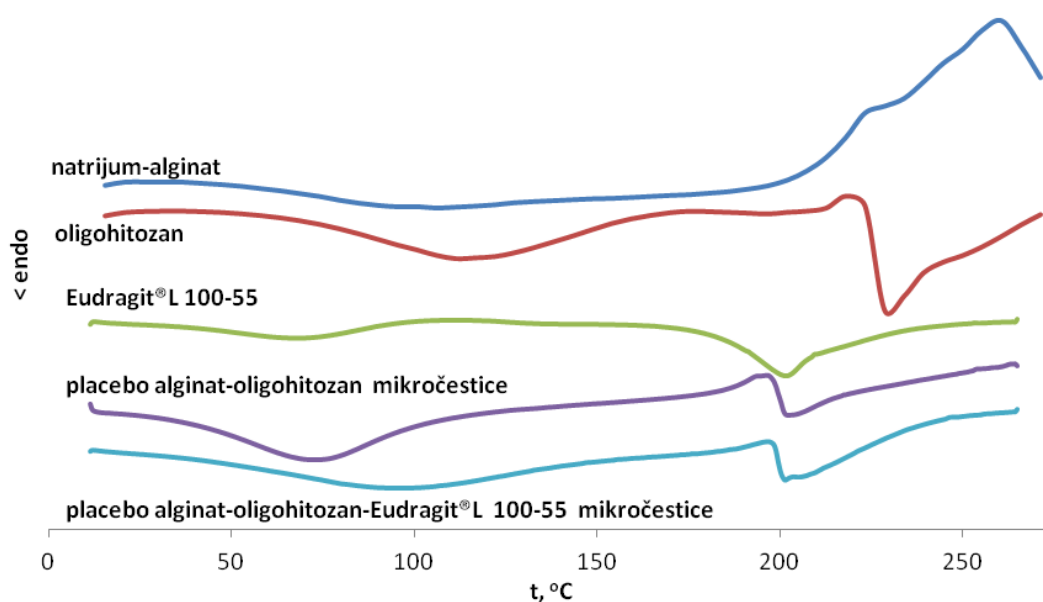


Slika 5.3.6. DSC termogrami oligohitozana, Eudragit[®]-a L 100-55 i polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55

Do sličnog zaključka može se doći poređenjem DSC termograma placebo alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica sa termogramima konstitutivnih polimera (slika 5.3.8).



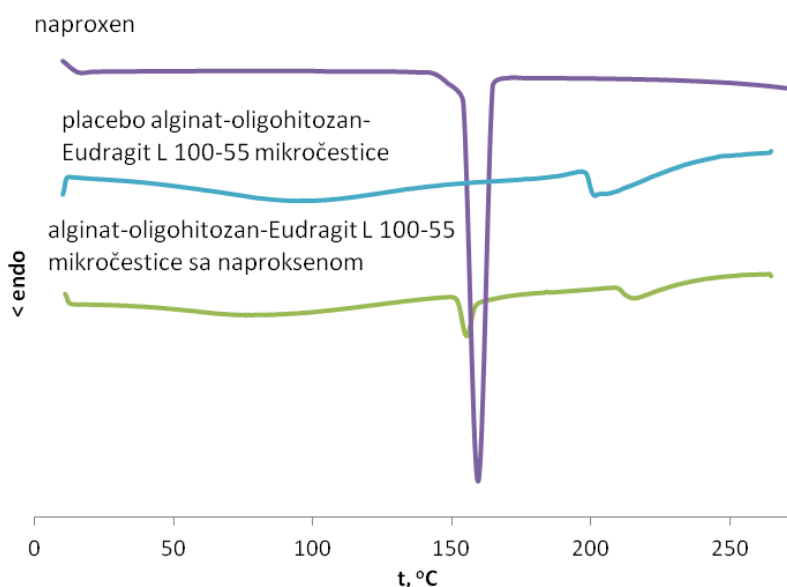
Slika 5.3.7. TG kriva Eudragit[®]-a L 100-55



Slika 5.3.8. DSC termogramima natrijum-alginata, oligohitozana, Eudragit[®]-a L 100-55, placebo alginat-oligohitozan mikročestica i placebo alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica

Na slici 5.3.9 prikazani su DSC termogrami naproksena, placebo i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica sa naproksenom. Poređenjem ovih termograma, može se zaključiti da je naproksen u mikročesticama tretiranim Eudragit[®]-om L 100-55, kao i u alginat-oligohitozan mikročesticama, inkapsuliran u kristalnom

stanju (oštar endotermni pik na 158°C potiče od topljenja kristala naproksena). Ovo dovodi do zaključka da postupak inkubacije mikročestica u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55 nije imao uticaj na inkapsuliranu model lekovitu supstancu, a što je dodatno potvrđeno rezultatima FT-IR spektroskopske analize (5.3.4).



Slika 5.3.9. DSC termogrami naproksena, placebo i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica sa naproksenom

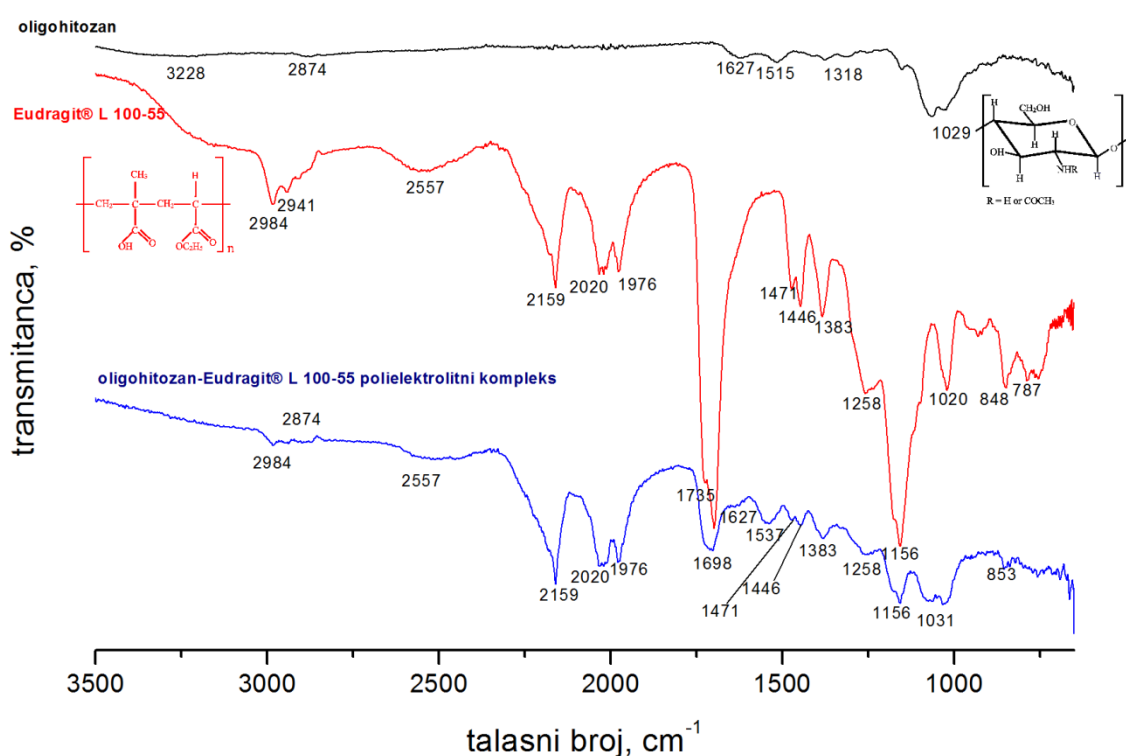
5.3.4. Infracrvena spektroskopska analiza

Na slici 5.3.10 prikazani su FT-IR spektri polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 i polimera koji ulaze u njegov sastav.

Na spektru Eudragit[®]-a L 100-55 uočene su sledeće karakteristične apsorpcione trake: široka traka u opsegu između 3500 i 2500 cm^{-1} koje potiču od O–H vibracija, trake C–H vibracija sa pikovima na 2984, 2941, 1471, 1446 i 1383 cm^{-1} , dve intenzivne trake koje potiču od C=O vibracija, i to jedna od COOH grupe sa pikom na 1705 cm^{-1} i druga od estarske grupe sa pikom na 1735 cm^{-1} , i još dve trake istežućih vibracija estarske grupe sa maksimumima na 1258 i 1156 cm^{-1} .

Navedene apsorpcione trake Eudragit[®]-a L 100-55, kao i one karakteristične za spektar oligohitozana, uočene su i na spektru polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55, što ukazuje na nekovalentnu prirodu interakcije između dva

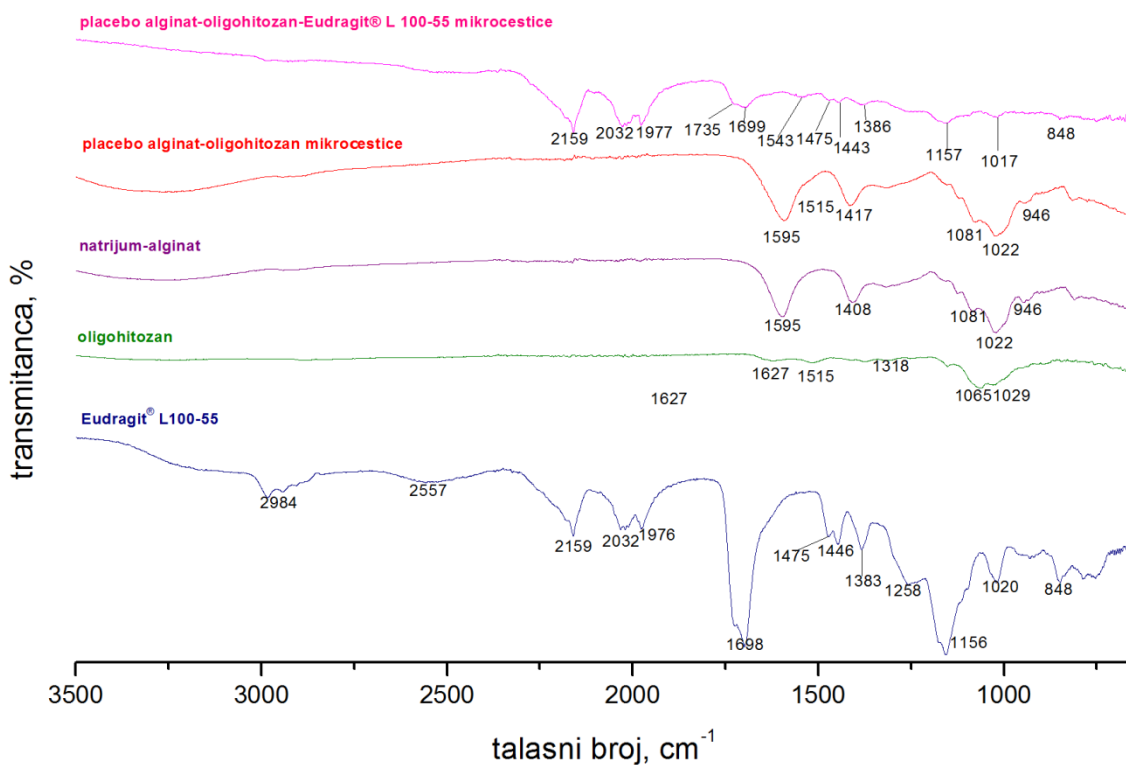
polimera. Kao kod interakcije između alginata i oligohitozana, i ovde je ovakav zaključak bio očekivan, ako se uzme u obzir da je reč o dva suprotno naelektrisana polimera, koji stupaju u elektrostatičku interakciju, gradeći polielektrolitni kompleks. Međutim, na spektru polielektrolitnog kompleksa uočena je nova traka sa maksimumom na 1537 cm^{-1} . Ovaj fenomen su uočili i Moustafine i sar. 2008. godine, koji su ispitali interakciju Eudragit® L 100-55 sa hitozanima velike molekulske mase ($M_r \geq 160\text{ kDa}$), a pripisali su ga jonskim interakcijama između jonizovanih $-\text{COOH}$ grupa Eudragit®-a L 100-55 i protonovanih $-\text{NH}_2$ grupa hitozana.



Slika 5.3.10. FT-IR spektri oligohitozana, Eudragit®-a L 100-55 i polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit® L 100-55

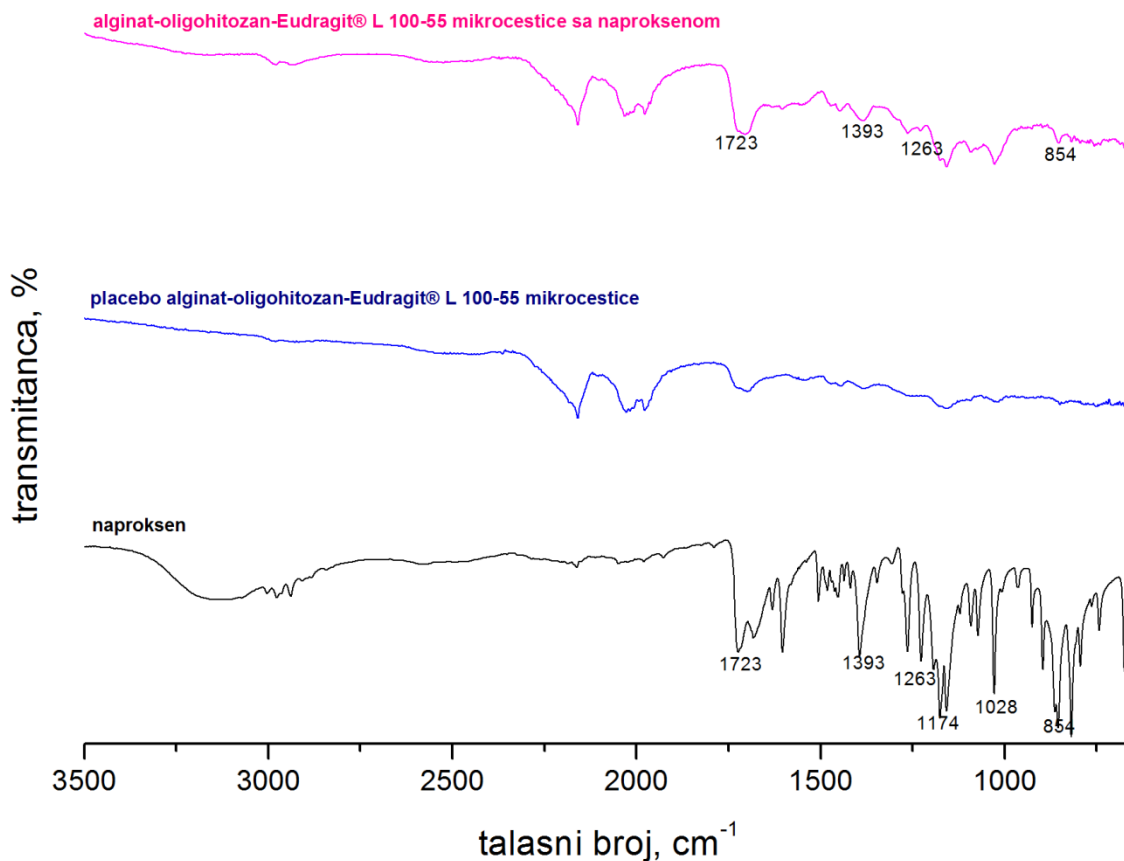
Do sličnog zaključka se došlo i poređenjem spektara placebo alginat-oligohitozan mikročestica tretiranih i netretiranih Eudragit®-om L 100-55 (slika 5.3.11). Tačnije, apsorpcione trake koje potiču od individualnih polimera uočene su na spektru mikročestica tretiranih Eudragit®-om L 100-55, kao i dodatna traka sa pikom na 1543 cm^{-1} . Jedini izuzetak su trake koje potiču od simetričnog i asimetričnog istezanja COO^- ostataka lanaca alginata, koje nisu uočene na spektru mikročestica. Međutim, kako se na

termogramu mikročestica netretiranih Eudragit®-om L 100-55 maksimumi ovih traka javljaju na 1595 i 1417 cm^{-1} , moguće je da su one na termogramu mikročestica tretiranih Eudragit®-om L 100-55 preklopljeni apsorpcionim trakama koje potiču od ovog polimera.



Slika 5.3.11. FT-IR spektri Eudragit®-a L 100-55, oligohitozana, natrijum-alginata, placebo alginat-oligohitozan mikročestica i placebo alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica

Na slici 5.3.12 prikazani su spektri naproksena, placebo i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom. Sve apsorpcione trake karakteristične za naproksen uočene su na spektru mikročestica sa inkapsuliranom lekovitom supstancom, što potvrđuje zaključak dobijen na osnovu termalne analize, da inkubacija alginat-oligohitozan mikročestica u rastvora Eudragit®-a L 100-55 i formiranje polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit®-a L 100-55 ne dovode do hemijskih promena u strukturi naproksena.



Slika 5.3.12. FT-IR spektri: naproksena, placebo alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikrocestica i alginat-oligohitozan mikrocestica sa inkapsuliranim naproksenom

5.3.5. Određivanje sadržaja model lekovite supstance

Srednje vrednosti sadržaja naproksena u ispitivanim mikročesticama prikazane su u tabeli 5.3.1.

Najveći sadržaj naproksena imale su Ca-alginatne mikročestice, a najmanji alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestice. Postoje dva moguća objašnjenja za ovakve rezultate. Prvo, da se sa porastom vremena izrade, odnosno broja faza potrebnih za izradu mikročestica, smanjuje apsolutna vrednost inkapsuliranog naproksena usled difuzije u okolni medijum. Drugo objašnjenje je da se dodatkom oligohitozana, a zatim Eudragit®-a L 100-55 i njihovim vezivanjem za mikročestice, smanjuje udeo naproksena u ukupnoj masi mikročestica. Ovo objašnjenje je potkrepljeno rezultatima merenja veličine mikročestica, koji pokazuju da vezivanje Eudragit®-a L 100-55, a naročito oligohitozana ima za posledicu porast srednje vrednosti dijametra mikročestica, što je ujedno praćeno porastom mase mikročestica u

odnosu na masu Ca-alginatnih mikročestica iz kojih su dobijene. Kako je apsolutna količina inkapsuliranog naproksena u ovim mikročesticama ista, ili manja zbog difuzije iz mikročestica tokom druge i treće faze postupka izrade, očekivano je da sa porastom mase mikročestica opada udeo naproksena u ukupnoj masi mikročestica.

Tabela 5.3.1. Sadržaj naproksena u ispitivanim formulacijama Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica nakon sušenja (n=3)

Formulacija	DL% ± s.d.	Formulacija	DL% ± s.d.
A1	31,4 ± 1,1	E1	24,3 ± 2,2
O1	28,7 ± 2,4	E2	28,3 ± 2,7
O2	24,4 ± 0,2	E3	19,9 ± 1,8
		E4	18,4 ± 3,1

5.3.6. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Poređenjem dobijenih vrednosti efikasnosti inkapsulacije u Ca-alginatnim, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročesticama, koje su prikazane u tabeli 5.3.2, može se zaključiti da produženje postupka izrade mikročestica, odnosno uvođenje dodatnih faza, ima za posledicu smanjenje efikasnosti inkapsulacije. Međutim, generalni zaključak je da se najviše lekovite supstance gubi tokom prve faze inkapsulacije (izrada Ca-alginatnih mikročestica) i da je taj gubitak nešto manji od 10 % od ukupne količine naproksena, dok su gubici lekovite supstance tokom druge i treće faze izrade mikročestica znatno manji. Ovo se može objasniti činjenicom da naproksen najlakše napušta Ca-alginatne mikročestice, usled poroznosti njihovog matriksa. Kako se tokom druge faze izrade formira polielektrolitni kompleks alginat-oligohitozan ta poroznost se smanjuje i usporava dalji gubitak naproksena. Ovaj fenomen je još manje izražen tokom treće faze u kojoj se mikročestice tretirane oligohitozonom dodatno ojačavaju polielektrolitnim kompleksom oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55. To je i osnovni razlog zbog koga su razlike između efikasnosti inkapsulacije alginat-oligohitozan mikročestica tretiranih i netretiranih Eudragit[®]-om L 100-55 male, iako treća faza traje duže (120 min) nego prve dve faze zajedno (90 min). Dakle, opšti zaključak je da su vrednosti efikasnosti inkapsulacije alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica relativno visoke (> 74 %), zahvaljujući brznoj reakciji jonotropnog

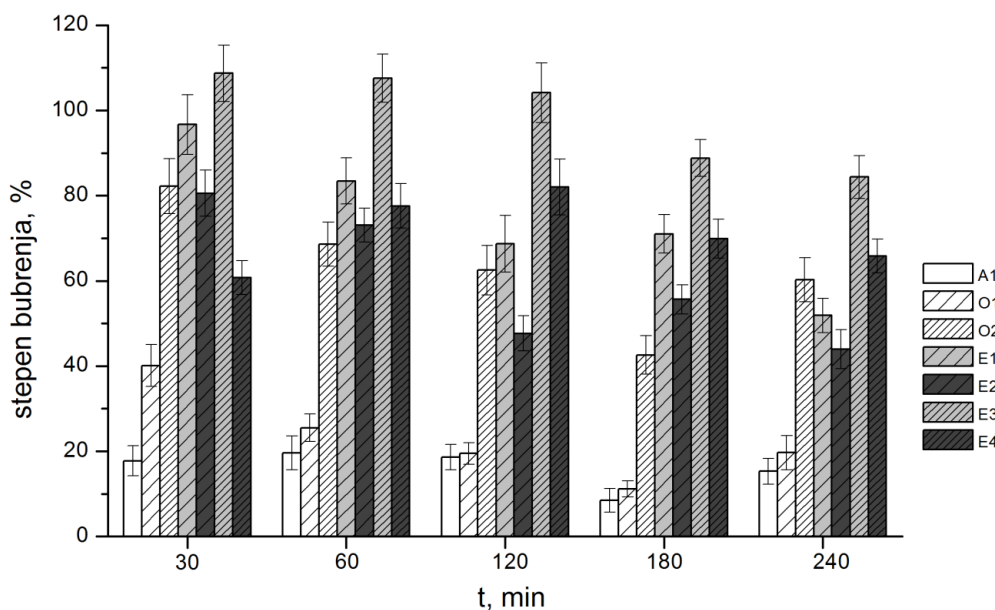
geliranja u prvoj fazi sa jedne strane, te efikasnom oblaganju mikročestica oligohitozonom u drugoj, odnosno Eudragit[®]-om L 100-55 u trećoj fazi izrade mikročestica. Ovome dodatno doprinosi i slaba rastvorljivost naproksena kao slabe kiseline pri pH vrednostima 5,5 i 5,6 medijuma za inkubaciju mikročestica u rastvoru oligohitozana i Eudragit[®]-a L 100-55, redom.

Tabela 5.3.2. Efikasnost inkapsulacije ispitivanih formulacija Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica (n=3)

Formulacija	EE% ± s.d.	Formulacija	EE% ± s.d.
A1	91,6 ± 1,4	E1	76,2 ± 2,4
O1	77,3 ± 2,1	E2	74,4 ± 1,8
O2	78,1 ± 0,7	E3	77,1 ± 2,4
		E4	77,9 ± 1,9

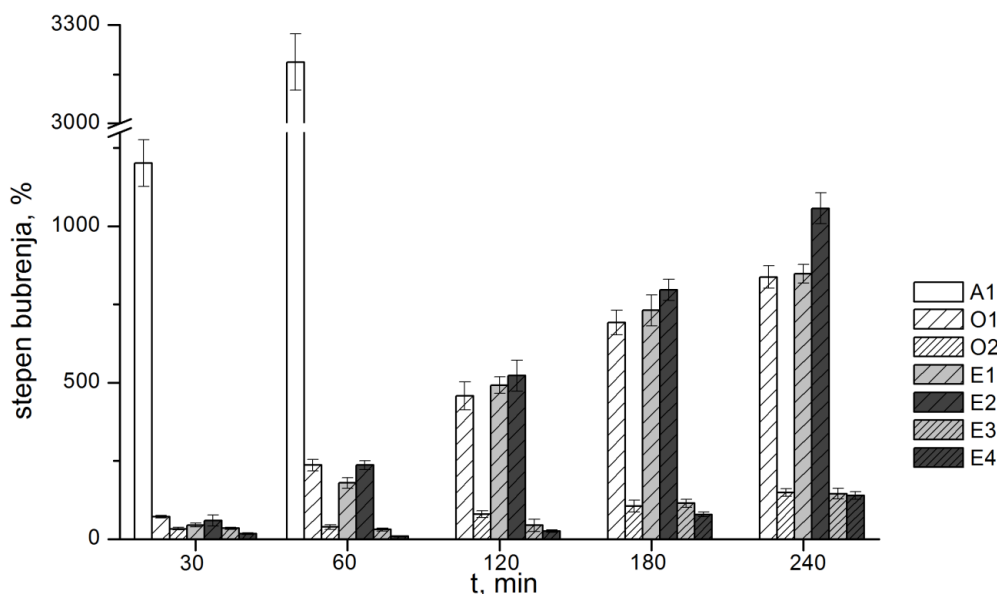
5.3.7. Ispitivanje sposobnosti bubrenja

Vrednosti stepena bubrenja alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestica u veštačkom želudačnom soku predstavljene su histogramima na slici 5.3.13. Mikročestice koje su tretirane koncentrovanijim rastvorima Eudragit[®]-a L 100-55 (1 % (m/m)) imale su manju sposobnost preuzimanja vode iz okolnog medijuma. Interesantno zapažanje je da su mikročestice E4 formulacije dostigle svoj maksimalan stepen bubrenja nakon 120 min inkubacije, dok su sve ostale mikročestice maksimalan stepen bubrenja dostigle za manje od 30 min, nakon čega je usledilo smanjenje njihove mase, najverovatnije kao posledica postepene erozije matriksa mikročestica. Moguće je pretpostaviti da mikročestice sa većim sadržajem oligohitozana imaju i veću sposobnost vezivanja Eudragit[®]-a L 100-55, čime se može objasniti zašto je efekat odložene erozije u kiseloj sredini uočen samo kod formulacije E4, a ne i kod formulacije E2, iako su obe tretirane 1 % (m/m) rastvorima Eudragit[®]-a L 100-55.



Slika 5.3.13. Stepen bubrenja Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u veštačkom želudačnom soku

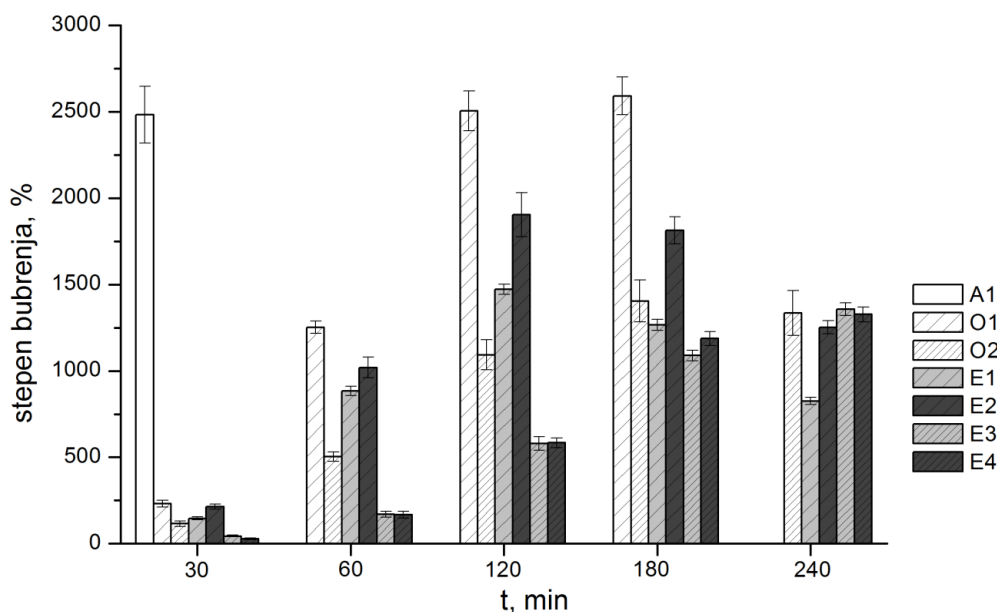
Znatno intenzivnije bubrenje alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica je uočeno u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 (slika 5.3.14). Za razliku od Ca-alginatnih mikročestica koje su brzo preuzimale vodu i erodirale u potpunosti, mikročestice tretirane oligohitozonom su pokazale znatno veću stabilnost u ovom medijumu, što je posledica stabilizacije alginat-oligohitozan polielektrolitnim kompleksom, o čemu je već bilo reči (5.2.9). Najveću stabilnost, odnosno najmanje vrednosti stepena bubrenja su pokazale alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestice sa višim sadržajem oligohitozana (E3 i E4), što je još jedna potvrda značaja oligohitozana za stabilizaciju mikročestica u ovom medijumu. Osim što je stabilizovao mikročestice formirajući kompleks sa alginatom, oligohitozan je kod ovih mikročestica omogućio i vezivanje Eudragit®-a L 100-55, pri čemu sa porastom sadržaja oligohitozana raste i broj protonovanih $-NH_2$ grupa po jedinici površine. Što je raspored pozitivnog naelektrisanja gušći, to je i intenzivnije vezivanje Eudragit®-a L 100-55 tokom treće faze izrade mikročestica. Niže vrednosti stepena bubrenja E4 u odnosu na O2 mikročestice ukazuju da je formiranje dodatnog polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit®-a L 100-55 imalo za posledicu smanjenje intenziteta bubrenja mikročestica.



Slika 5.3.14. Stepen bubrenja Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8

Slični rezultati su dobijeni kada je kao medijum korišćen fosfatni pufer pH vrednosti 7,4, uz napomenu da su vrednosti stepena bubrenja sva tri tipa mikročestica (Ca-alginatnih, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55) u ovom medijumu bile veće nego kada je pH vrednost iznosila 6,8. Ovo je ujedno potvrda da su i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestice pH osetljive, uz napomenu da je njihova stabilnost nešto veća od stabilnosti odgovarajućih alginat-oligohitozan mikročestica.

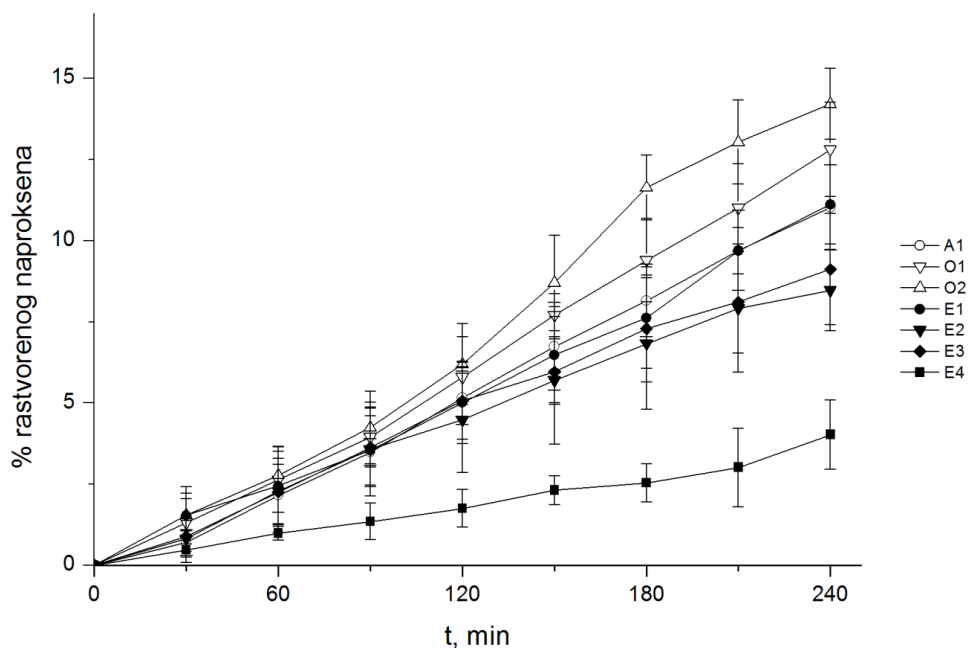
Ovakvi rezultati su očekivani ako se uzme u obzir da su ove mikročestice u osnovi hidrogelovi stabilizovani polielektrolitnim kompleksima alginat-oligohitozan i oligohitozan-Eudragit® L 100-55, čija je stabilnost zavisna od stepena jonizacije polimera koji ulaze u njihov sastav. Kako su ovi polimeri slabe kiseline (alginat i Eudragit® L 100-55) i slabe baze (oligohitozan), onda njihov stepen jonizacije direktno zavisi od pH vrednosti medijuma u kome se nalaze.



Slika 5.3.15. Stepen bubrenja Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

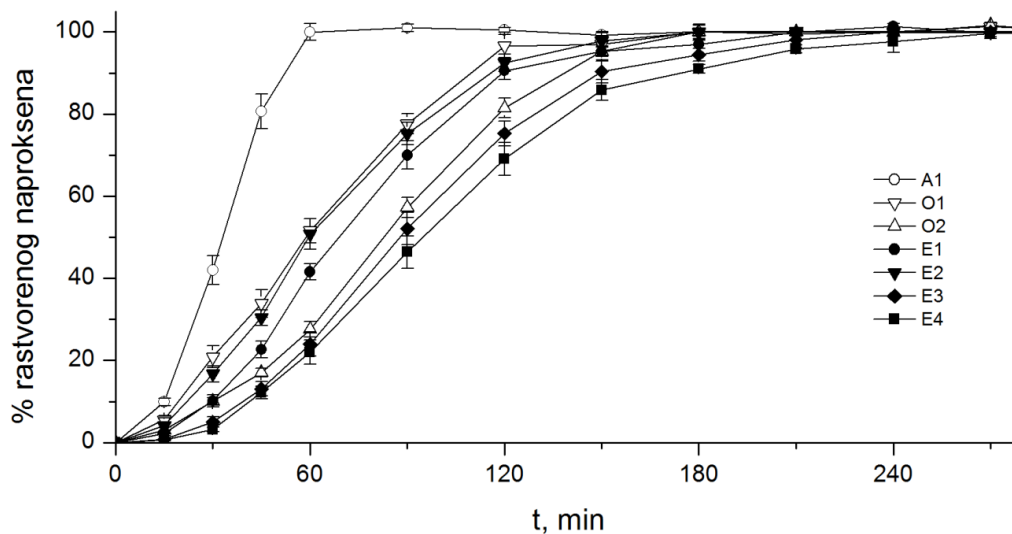
5.3.8. In vitro ispitivanje brzine rastvaranja model lekovite supstance iz mikročestica

Na slici 5.3.16 prikazani su profili rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica u veštačkom želudačnom soku. Kao što je uočeno i opisano u drugom delu rada (5.2.10) naproksen se nešto brže oslobađao iz mikročestica tretiranih oligohitozonom, nego iz Ca-alginatnih mikročestica, a taj porast je srazmeran sadržaju oligohitozana u mikročesticama. Međutim, na slici 5.3.16 vidi se da je tretiranje alginat-oligohitozan mikročestica Eudragit®-om L 100-55 dovelo do smanjenja brzine oslobađanja inkapsuliranog naproksena iz mikročestica. Najbolji rezultati postignuti su sa formulacijom E4, gde je nakon 240 min oslobođeno manje od 5 % inkapsuliranog naproksena. To je u skladu sa rezultatima studije bubrenja (5.3.7), kojom je pokazano da mikročestice formulacije E4 najsporije preuzimaju vodu iz okolnog medijuma, a počinju da erodiraju tek nakon 180 min.

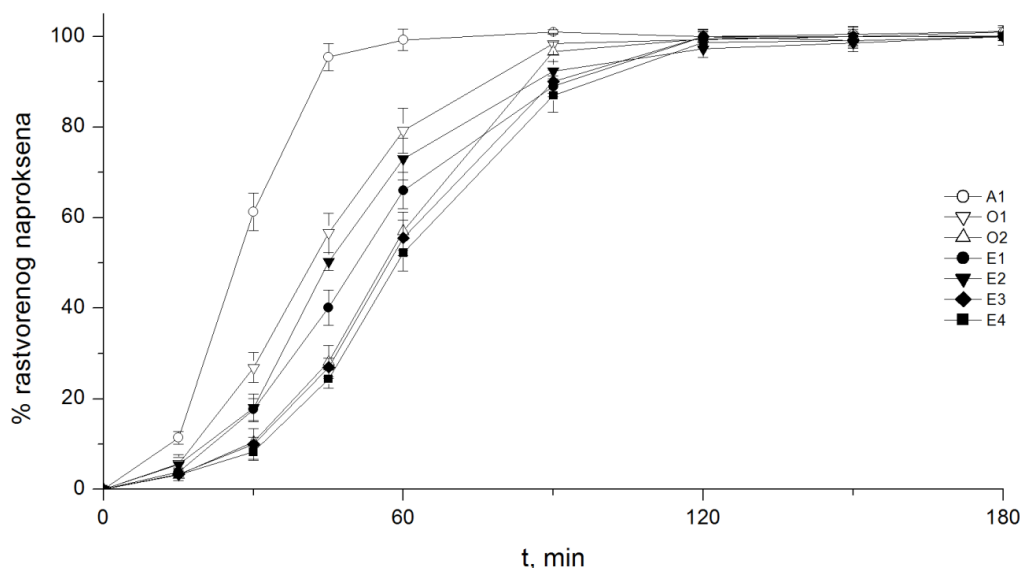


Slika 5.3.16. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u veštačkom želudačnom soku

Poređenje profila rastvaranja naproksena iz mikročestica tretiranih oligohitozonom i Eudragit®-om L 100-55 sa profilima Ca-alginatnih mikročestica u fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 i 7,4 (slike 5.3.17 i 5.3.18) može se zaključiti da je formiranje polielektrolitnih kompleksa alginat-oligohitozan i oligohitozan-Eudragit® L 100-55 uticalo na značajno smanjenje brzine rastvaranja naproksena. Poređenjem profila rastvaranja naproksena iz alginat-oligohitozan mikročestica tretiranih i netretiranih Eudragit®-om L 100-55 može se primetiti da je rastvaranje iz mikročestica tretiranih Eudragit®-om L 100-55 bilo nešto sporije, a najsporije oslobađanje je i u ovim medijumima postignuto za mikročestice formulacije E4.



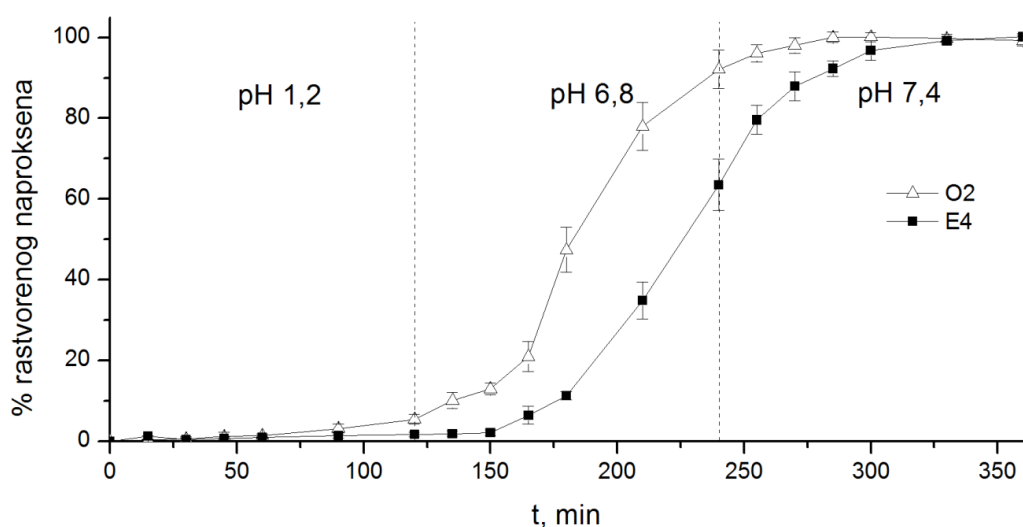
Slika 5.3.17. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu vrednosti pH 6,8



Slika 5.3.18. Profili brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginat, alginat-oligohitozan i alginat-oligohitozan-Eudragit® L 100-55 mikročestica sa naproksenom izrađenih dvostepenim postupkom u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

Pravi efekat stabilizacije alginat-oligohitozan mikročestica polielektrolitnim kompleksom oligohitozan-Eudragit® L 100-55 je uočen pod eksperimentalnim uslovima koji su slični onima u GIT-u. Naime, kada se uporede profili rastvaranja naproksena iz alginat-oligohitozan mikročestica tretiranih i netretiranih Eudragit®-om L 100-55, dobijeni uz izmenu medijuma na način prikazan na slici 5.3.19, razlika postaje znatno veća. Razlog za to je što prethodna inkubacija alginat-oligohitozan u kiselom medijumu

ima za posledicu destabilizaciju polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan, te se na taj način umanjuje sposobnost ovog kompleksa da uspori oslobađanje naproksena kada dođe do izmene medijuma i porasta pH vrednosti. Sa druge strane, mikročestice tretirane Eudragit[®]-om L 100-55, imaju zaštitni sloj koga čini polielektrolitni kompleks oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55, pa je stepen destabilizacije kompleksa alginat-oligohitozan znatno manji. To znači da kompleks oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 obezbeđuje visok stepen zaštite mikročesticama koji je značajan iz dva razloga. Prvi je usporavanje brzine kojom se naproksen oslobađa iz mikročestica u kiselom medijumu, a drugi pružanje zaštite kompleksu alginat-oligohitozan, čime omogućava da se nakon porasta pH vrednosti postigne znatno sporije oslobađanje naproksena. To objašnjava zašto se nakon 240 min naproksen gotovo u potpunosti (92,13 %) oslobodio iz mikročestica formulacije O2 netretirane Eudragit[®]-om L 100-55, dok se iz mikročestica formulacije E4 oslobodilo približno dve trećine (65,56 %) inkapsuliranog naproksena.



Slika 5.3.19. Profil brzine rastvaranja naproksena iz model formulacija O2 (alginat-oligohitozan) i E4(alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55) uz izmenu medijuma: a) 120 min u veštačkom želudačnom soku, b) 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8 i c) 120 min u fosfatnom puferu pH vrednosti 7,4

6. ZAKLJUČAK

Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Primenom ručno izrađenog uređaja sa koaksijalnim cilindrom uspešno su izrađene alginat-hitozan mikročestice čiji se dijametar nakon sušenja kretao u opsegu između $262,3 \pm 14,9$ i $358,4 \pm 21,7$ μm . Statistička analiza je pokazala da na veličinu mikročestica značajno utiče sadržaj naproksena u disperziji iz koje su mikročestice dobijene postupkom eksternog geliranja, te da ona raste sa porastom sadržaja lekovite supstance.
- Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je pokazano da su sve mikročestice sa naproksenom imale blago deformisan sferičan oblik, sa površinskim pukotinama i neravninama koje potiču od prisustva kristala naproksena. Deformacija oblika i površinske pukotine posledica su gubitka vlage iz mikročestica tokom sušenja. Uočene su blage deformacije mikročestica na jednom od krajeva, do kojih dolazi usled udara kapljice disperzije leka u rastvoru natrijum-alginata o površinu gelirajućeg medijuma. Na poprečnom preseku mikročestica tretiranih hitozanima velike i male molekulske mase uočena je centralna šupljina, slična onoj kod mikročestica netretiranih hitozanom, što navodi na pretpostavku da ovi hitozani nemaju značajniju sposobnost prodiranja u jezgro, nego da se najvećim delom zadržavaju na površini mikročestica gde formiraju polielektrolitni kompleks.
- Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i termogravimetrijska analiza potvrdile su da proces mikroinkapsulacije ne utiče na prvobitno stanje model lekovite supstance, te da se naproksen u mikročesticama nalazi u neizmenjenom, kristalnom obliku. Termalna analiza pokazala je da nakon inkubacije Ca-alginatnih mikročestica u rastvorima hitozana dolazi do promene termalnih karakteristika mikročestica, što se može objasniti formiranjem polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan.

- Poređenjem FT-IR spektara placebo i alginat-hitozan mikročestica sa inkapsuliranim naproksenom potvrđeno je da tokom inkapsulacije ne dolazi do kovalentne interakcije naproksena sa alginatom i hitozanom.
- Sadržaj naproksena u osušenim mikročesticama bio je relativno visok i kretao se u intervalu između $37,09 \pm 1,23$ i $44,01 \pm 0,94$ %. Utvrđeno je da produžena inkubacija mikročestica u rastvoru hitozana dovodi do smanjenja sadržaja naproksena, što je posledica njegove produžene difuzije iz mikročestica u rastvor hitozana. Nije uočen značajan uticaj molekulske mase hitozana na sadržaj naproksena u mikročesticama.
- Efikasnost inkapsulacije ispitivanih formulacija kretala se u opsegu od $75,19 \pm 2,11$ do $84,45 \pm 2,16$ %. Ovako relativno visoke vrednosti mogu se objasniti brzom reakcijom jonotropnog geliranja i slabom rastvorljivošću naproksena u slabo kiselom rastvoru hitozana pH vrednosti 5,5. Primenom eksperimentalnog dizajna utvrđeno je da od ispitivanih formulacionih parametara i vremena inkubacije statistički značajan uticaj imaju odnos lek/polimer i vreme inkubacije. Negativan uticaj vremena inkubacije u rastvoru hitozana na efikasnost inkapsulacije uzrokovan je gubitkom naproksena iz mikročestica tokom ove faze mikroinkapsulacije. Pokazano je da mikročestice dobijene iz disperzije sa većim sadržajem naproksena imaju veću efikasnost inkapsulacije, što je posledica slabe rastvorljivosti naproksena u gelirajućem medijumu i rastvoru hitozana.
- Rezultati *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica svih ispitivanih formulacija pokazali su da se u veštačkom želudačnom soku naproksen oslobađa sporo, a procenat rastvorenog naproksena nakon 120 min bio je manji od 6,12 %. Zaključeno je da najveći deo naproksena oslobođenog u kiselom medijumu potiče od kristala naproksena koji su uočeni na površini mikročestica. Nakon porasta pH vrednosti do 6,8 uočen je porast brzine rastvaranja inkapsuliranog naproksena. Osnovni razlog za ovaj fenomen je brzo preuzimanje vode i bubrenje mikročestica. Tokom ovog procesa dolazi do obrazovanja viskozne hidrogel barijere koja kontroliše difuziju naproksena iz mikročestica u okolni medijum, što je potvrđeno rezultatima dobijenih primenom matematičkih modela za procenu brzine rastvaranja

naproksena iz mikročestica. Najznačajnije razlike u brzinama rastvaranja naproksena iz mikročestica tretiranih nisko- i visokomolekularnim hitozanom su uočene u fosfatnom puferu pH vrednosti 6,8. Utvrđeno je da molekulska masa hitozana ima najveći uticaj na brzinu oslobađanja inkapsuliranog naproksena među svim posmatranim promenljivim. Pokazalo se da mikročestice tretirane hitozanom velike molekulske mase imaju veću sposobnost da uspore oslobađanje inkapsuliranog naproksena, što je posledica sposobnosti hitozana velike molekulske mase da obrazuju postojanije i manje permeabilne alginat-hitozan polielektrolitne komplekse. Pokazano je i da mikročestice sa većim sadržajem alginata u odnosu na inkapsuliranu model lekovitu supstancu imaju sposobnost da nakon bubrenja obrazuju postojanije i viskoznije gelove, i na taj način obezbeđuju sporije oslobađanje naproksena. Ovo objašnjenje je u korelaciji sa rezultatima analize kintetike oslobađanja koja je pokazala da je oslobađanje naproksena kontrolisano relaksacijom lanaca polimera i bubrenjem. Iznenadujuće, faktorski efekat koji opisuje uticaj koncentracije hitozana u rastvoru za oblaganje imao je negativnu vrednost, što se može pripisati uticaju viskoziteta rastvora hitozana na brzinu i stepen u kome se hitozan vezuje za Ca-alginat mikročestice. Preciznije, povećanjem molekulske mase hitozana raste i viskozitet rastvora za oblaganje, otežavajući vezivanje lanaca hitozana i formiranje polielektrolitnog kompleksa. Ovoj tvrdnji u prilog ide statistički značajna interakcija molekulske mase i koncentracije hitozana koja ukazuje da uticaj koncentracije hitozana u rastvoru za oblaganje zavisi od molekulske mase hitozana, dok negativni predznak faktorskog efekta interakcije ukazuje da porast koncentracije hitozana ima za posledicu veće smanjenje $t_{50\%}$ kada je korišćen hitozan veće molekulske mase.

- Primenom matematičkih modela za procenu profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica zaključeno je da *Korsmeyer-Peppas* model najbolje opisuje oslobađanje naproksena iz mikročestica. Vrednosti *Korsmeyer-Peppas* eksponenta za sve ispitivane formulacije kretale su se u opsegu od 1,62 do 3,73, odnosno mehanizam oslobađanja naproksena iz mikročestica odgovarao je super slučaju II transporta. Ovakav mehanizam oslobađanja karakterističan je za nosače lekova izrađenih od hidrofилnih polimera koji imaju izraženu sposobnost bubrenja, a javlja se usled velikog porasta osmotskog pritiska praćenog relaksacijom

lanaca polimera. Poređenjem vrednosti k_d i k_r zaključeno je da proces relaksacije kontroliše oslobađanje inkapsuliranog naproksena iz mikročestica.

Opšti zaključak prve faze eksperimentalnog dela rada je da se nisko- i visikomolekularni hitozan mogu uspešno koristiti za dobijanje alginat-hitozan mikročestica sa NSAIL, blago deformisanog sferičnog oblika, mikrometarskih veličina, povoljnih profila oslobađanja i relativno visoke efikasnosti inkapsulacije. Međutim, uočeni su i pojedini nedostaci upotrebljenih hitozana, koji u značajnom stepenu ograničavaju njihovu upotrebu za izradu alginat-hitozan mikročestica, poput njihove velike molekulske mase, veličine lanaca i viskoziteta njihovih rastvora.

Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- Reološka ispitivanja rastvora hitozana različitih molekulske mase pokazala su da viskozitet rastvora nisko- i visikomolekularnih hitozana predstavlja ograničavajući faktor kada je reč o njihovoj primeni za izradu alginat-hitozan mikročestica jednostepenim postupkom, jer dovodi do zadržavanja kapljica natrijum-alginata na njihovoj površini, usled nemogućnosti da prodru dublje u unutrašnjost rastvora. Ovo za posledicu ima trajnu koalescenciju kapi i manifestuje se već pri koncentraciji od 1 % (m/m) navedenih hitozana. Sa druge strane, oligohitozan obrazuje neviskozne vodene rastvore čak i pri znatno većim koncentracijama (> 4 % (m/m)), te su njegovi koncentrovani rastvori pogodni za izradu alginat-hitozan mikročestica ne samo dvostepenim, nego i jednostepenim postupkom, čime se otvara mogućnost za značajno skraćanje i pojednostavljenje postupka mikroinkapsulacije.
- Srednje vrednosti dijametara osušenih Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica dobijenih dvostepenim postupkom kretale su se u opsegu između $304,1 \pm 26,1$ i $348,6 \pm 33,2$ μm . Mikroskopska analiza je pokazala da su alginat-oligohitozan mikročestice većeg dijametara u odnosu na mikročestice netretirane hitozanom. Ovo je posledica intenzivnog vezivanja oligohitozana za poroznu strukturu Ca-alginatnog hidrogela, čime je smanjena kontrakcija mikročestica tokom

sušenja. Kod mikročestica sa nižim sadržajem kalcijuma dolazi do intenzivnije kontrakcije tokom sušenja, pa samim tim ove mikročestice imaju manje dimenzije.

- Mikrografije osušenih mikročestica tretiranih i netretiranih oligohitozonom potvrdile su da proces sušenja ima sličan uticaj na njihove morfološke karakteristike kao i na morfologiju mikročestica tretiranih hitozanima velike molekulske mase. Blago deformisan sferičan oblik i površinske pukotine rezultat su gubitka vode tokom sušenja i posledične kontrakcije matriksa mikročestica. Utvrđeno je da sa porastom sadržaja hitozana prisustvo ovih pukotina postaje manje uočljivo, što je najverovatnije posledica povećane stabilnosti matriksa mikročestica sa većim sadržajem hitozana. Poređenjem mikrografija placebo i alginat-oligohitozan mikročestica potvrđeno je da površinske neravnine potiču od kristala naproksena, što ukazuje da je lekovita supstanca inkapsulirana u kristalnom stanju. Odsustvo šupljine u jezgru mikročestica potvrdilo je da oligohitozan, zahvaljujući maloj molekulskoj masi i malim dimenzijama, ima sposobnost prodiranja u unutrašnjost mikročestica.
- Termalnom analizom potvrđeno je da se naproksen u alginat-oligohitozan mikročesticama nalazi inkapsuliran u neizmenjenom, kristalnom stanju. Pomeranja degradacionih egzoterma na termogramima mikročestica tretiranih oligohitozonom, u odnosu na degradacione egzoterme Ca-alginatnih mikročestica, ukazala su na postojanje/formiranje polielektrolitnog kompleksa.
- FT-IR spektroskopska analiza pokazala je da je naproksen inkapsuliran u neizmenjenom obliku i time potvrdila rezultate termalne i mikroskopske analize. Osim toga, prisustvo pikova svih grupa karakterističnih za individualne polimere na termogramu alginat-oligohitozan mikročestica, uz pomeranje trake koja potiče od simetričnog COO^- istežanja natrijum-alginata, potvrdilo je nekovalentnu prirodu interakcije alginat-oligohitozan.
- Sadržaj naproksena u osušnim Ca-alginatnim mikročesticama i mikročesticama tretiranim rastvorima oligohitozana različitih koncentracija kretao se u opsegu

između $17,8 \pm 1,1$ i $41,4 \pm 0,2$ %. Najveći sadržaj naproksena imale su Ca-alginatne mikročestice, a smanjivao se sa porastom sadržaja oligohitozana.

- Efikasnost inkapsulacije Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica kretala se u opsegu od $78,1 \pm 0,7$ do $94,7 \pm 1,2$ %. Razlozi za ove relativno velike vrednosti identični su onima koji su navedeni u prvoj fazi rada. Mikročestice inkubirane u rastvorima sa većim sadržajem kalcijumovih jona imale su nešto niže vrednosti efikasnosti inkapsulacije usled veće poroznosti Ca-alginatnog hidrogel matriksa.
- Rezultati određivanja sadržaja hitozana potvrdili su da sa porastom koncentracije hitozana u rastvorima za inkubaciju Ca-alginatnih mikročestica raste i sadržaj hitozana u mikročesticama. Primenom ninhidrinske reakcije potvrđeno je da je stepen vezivanja oligohitozana za Ca-alginatne mikročestice znatno veći u odnosu na stepen vezivanja nisko- i viskokomolekuranog hitozana. Osim toga, nije uočena statistički značajna razlika u stepenu vezivanja oligohitozana između mikročestica izrađenih jednostepenim i dvostepenim postupkom. Potvrđeno je da rast koncentracije Ca^{2+} jona dovodi do rasta sadržaja hitozana u mikročesticama, najverovatnije usled povećanja poroziteta mikročestica.
- Studije bubrenja u medijumima različitih pH vrednosti ukazale su na pH osetljivost polielektrolitnog kompleksa alginat-oligohitozan. U kiselom medijumu, sa porastom sadržaja hitozana postepeno je rasla sposobnost preuzimanja vode, dok je pri pH vrednostima 6,8 i 7,4 oligohitozan imao suprotan uticaj na sposobnost bubrenja. Najniže vrednosti stepena bubrenja mikročestice su imale u veštačkom želudačnom soku, dok je sposobnost preuzimanja vode bila najveća pri pH vrednosti 7,4.
- Poređenjem rezultata *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja naproksena iz Ca-alginatnih i alginat-oligohitozan mikročestica zaključeno je da tretiranje Ca-alginatnih mikročestica oligohitozanom ima za posledicu povećanje njihove pH osetljivosti. Dodatak oligohitozana je za posledicu imao blagi porast brzine oslobađanja naproksena iz mikročestica u kiselom medijumu, ali je sa druge strane usporio oslobađanje naproksena u fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 i 7,4.

Optimalna formulacija u pogledu profila oslobađanja naproksena, dobijena je inkubacijom Ca-alginatnih mikročestica u 1 % (m/m) rastvoru oligohitozana, sa oko 10 % oslobođenog naproksena nakon 120 min u kiselom medijumu, dok je za oslobađanje preostale količine inkapsulirane lekovite supstance nakon izmene medijuma i porasta pH vrednosti na 6,8, potom i 7,4 bilo potrebno još približno 180 min.

- Primenom matematičkih modela za procenu profila brzine oslobađanja model lekovite supstance iz mikročestica potvrđeno je postojanje kombinovanog uticaja mehanizama difuzije i erozije na oslobađanje inkapsulirane lekovite supstance. U fosfatnim puferima pH vrednosti 6,8 i 7,4 profili brzine rastvaranja za mikročestice sa visokim sadržajem oligohitozana pokazali su najbolje uklapanje u model nultog reda, odnosno, brzina rastvaranja naproksena iz ovih mikročestica primiče se „idealnom“ slučaju, kod koga se u jednakim vremenskim intervalima rastvaraju jednake količine inkapsulirane lekovite supstance iz mikročestica.

Na osnovu navedenog zaključeno je da oligohitozan značajno poboljšava fizičko-hemijske karakteristike i farmaceutsko-tehnološke Ca-alginatnih mikročestica, u odnosu na mogućnost njihove *per os* primene kao nosača NSAIL, a posebno u pogledu brzine rastvaranja inkapsulirane model lekovite supstance. Osim toga, potvrđene su prednosti ovog oligomera u odnosu na nisko- i visokomolekularne hitozane, koje se ogledaju u sposobnosti prodiranja u jezgro mikročestica, intenzivnijem vezivanju za Ca-alginatnu hidrogel mrežu, ali i mogućnosti pojednostavljenja i skraćivanja postupka izrade alginat-hitozan mikročestica.

Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- Naknadnom inkubacijom alginat-oligohitozan mikročestica u rastvoru Eudragit[®]-a L 100-55, pH vrednosti 5,6, uspešno su izrađene alginat-oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 mikročestice sa naproksenom. Dijametri ovih mikročestica su se nakon sušenja kretali u opsegu između $326,6 \pm 19,1$ i $378,3 \pm 18,9$ μm , a bili su nešto veći u odnosu na dijemetre odgovarajućih alginat-oligohitozan mikročestica, što je posledica

formiranja površinskog polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55.

- Mikroskopskom analizom potvrđeno je da tretiranje Eudragit[®]-om L 100-55 nije značajnije uticalo na morfološke karakteristike mikročestica. Izuzetak su površinski nabori koji su posledica nakupljanja Eudragit[®]-a L 100-55, odnosno formiranja polielektrolitnog kompleksa sa oligohitozanom
- Termalnom i FT-IR spektroskopskom analizom pokazano je da formiranje kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 tokom treće faze izrade mikročestica nije imalo uticaj na kristalno stanje naproksena, niti su uočene bilo kakve interakcije između naproksena i Eudragit[®]-a L 100-55. Ovim tehnikama je potvrđena i nekovalentna priroda interakcije između Eudragit[®]-a L 100-55 i oligohitozana.
- Iako je uvođenjem treće faze, odnosno tretiranjem mikročestica Eudragit[®]-om L-100 55, značajno produžen postupak izrade mikročestica, nije uočen značajniji gubitak naproksena, te su efikasnosti inkapsulacije i dalje bile relativno visoke (> 74 %). Uočen je blagi pad sadržaja naproksena u mikročesticama tretiranim Eudragit[®]-om L 100-55, u odnosu na netretirane, što je najvećim delom posledica vezivanja Eudragit[®]-a, a time i smanjenja relativnog udela naproksena u ukupnoj masi mikročestica.
- Studije bubrenja i ispitivanja brzine rastvaranja naproksena iz mikročestica potvrdile su polaznu pretpostavku, da formiranje polielektrolitnog kompleksa oligohitozan-Eudragit[®] L 100-55 dovodi do stabilizacije mikročestica u kiseloj sredini, pruža zaštitu kompleksu alginat-oligohitozan, te na taj način usporava oslobađanje naproksena iz mikročestica kada pH vrednost medijuma poraste na 6,8, odnosno 7,4.

Opšti zaključak treće faze rada je da oligohitozan ima sposobnost da stupa u istovremenu interakciju sa alginatom i Eudragit[®]-om L 100-55, formirajući polielektrolitne komplekse i to u uslovima koji ne destabilizuju kompleks alginat-oligohitozan. Zahvaljujući ovoj osobini oligohitozana, postoji mogućnost da se reši

problem parcijalne destabilizacije alginat-oligohitozan mikročestica u kiselj sredini, čime se značajno smanjuje brzina oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance kako u kiselj sredini, tako i nakon porasta pH vrednosti okolnog medijuma. Na ovaj način se značajno poboljšava pH zavisni profil oslobađanja, bez značajnijeg uticaja na fizičko-hemijske osobine, veličinu mikročestica i efikasnost inkapsulacije lekovite supstance.

7. LITERATURA

- Acarturk F, Takka S. Calcium alginate microparticles for oral administration: II effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency. *J Microencapsulation*. 1999;16:291-301.
- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004;100:5-28.
- Ahn S, Jung SY, Lee JP, Lee SJ. Imaging efficiency of an X-ray contrast agent-incorporated polymeric microparticle. *Contrast Media Mol I*. 2011;6:437-48.
- Almería B, Deng W, Fahmy TM, Gomez A. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. *J Colloid Interf Sci*. 2010;343:125-33.
- Armstrong A. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*, 2nd ed. Informa Healthcare, London; 2006:83.
- Arshady R. Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques. *J Microencapsulation*. 1989;6:13-28.
- Avanco GB, Bruschi ML. Preparation and characterisation of ethylcellulose microparticles containing propolis. *Rev Cienc Farm Basica Apl*. 2009;29:129-35.
- Bakan JA. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 2nd ed. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL, Eds. Marcel Dekker, New York; 1986:413-29.
- Barakat NS, Almurshedi AS. Design and development of gliclazide-loaded chitosan microparticles for oral sustained drug delivery: in-vitro/in-vivo evaluation. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63:169-78.
- Benchabane S, Subirade M, Vandenberg G. Production of BSA-loaded alginate microcapsules: Influence of spray dryer parameters on the microcapsule characteristics and BSA release. *J Microencapsulation*. 2007;24:565-76.
- Beck EW, Schneider H, Dietzel K, Nuernberg B, Brune K. Gastrointestinal ulceration induced by anti-inflammatory drugs in rats. *Arch Toxicol*. 1990;64:210-17.
- Berkland C, King M, Cox A, Kim K, Pack D. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *J Control Release*. 2002;82:137-47.
- Borges O, Borchard G, Verhoef JC, Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm*. 2005;299:155-66.
- Braccini I, Grasso RP, Perez S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr Res*. 1999;317:119-30.

- Braccini I, Perez S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model. *Biomacromolecules*. 2001;2:1089-96.
- Brazel CS, Peppas NA. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*. 1999;40:3383-98.
- Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles MW, Desbrieres J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 2001;42:3569-80.
- Bungenberg de Jong HG. *Protoplasma*. 1932;15:110-73.
- Burgess, DJ, Singh ON. Spontaneous formation of small sized albumin/acacia coacervate particles. *J Pharm Pharmacol*. 1993;45:586-91.
- Burges D, Hickey A. Microsphere Technology and Applications. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd ed.* Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York; 2007: 2328-38.
- Cárdenas A, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM, Higuera-Ciapara I, Peniche C. Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate. *Macromol Biosci*. 2003;3:535-9.
- Carriazo D, Del Arco M, Martín C, Ramos C, Rives V. Influence of the inorganic matrix nature on the sustained release of naproxen. *Micropor Mesopor Mat*. 2010;130:229-38.
- Casettari L, Villasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progr Coll Pol Sci*. 2012;37:659-85.
- Caykara T, Demircia S, Eroglu MS, Guven O. Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate. *Polymer*. 2005;46: 10750-7.
- Ceballos A, Cirri M, Maestrelli F, Corti G, Mura P. Influence of formulation and process variables on in vitro release of theophylline from directly-compressed Eudragit matrix tablets. *Il Farmaco*. 2005, 60:913–918.
- Cekic N, Savić S, Milić J, Savić M, Jović Ž, Malešević M. Preparation and Characterisation of Phenytoin-Loaded Alginate and Alginate-Chitosan Microparticles. *Drug Deliv*. 2007;14:483-90.
- Cekic N, Milic J, Savic S, Savic M, Jovic Z, Daniels. Influence of the preparation procedure and chitosan type on physicochemical properties and release behavior of alginate-chitosan microparticles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2009;35:1092-102.
- Cerroni B, Chiessi E, Margheritelli S, Oddo L, Paradossi G. Polymer Shelled Microparticles for a Targeted Doxorubicin Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules*. 2011;12:593-601.
- Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterial*. 2001;22:261-8.

- Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MC. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Microbiol.* 2010; 142:185-9.
- Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, Yahia L. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:107-16.
- Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Rivard CH, Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;53:592-99.
- Chen YM, Chung YC, Wang LW, Chen KT, Li SY. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *J Environ Sci Heal A.* 2002;37:1379-90.
- Cioli V, Putzolu S, Rossi V, Barcellona P, Corradino C. The role of direct tissue contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979;50:283-9.
- Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharm Sci Technol To.* 2000;3:198-204.
- Coppi G, Iannuccelli V, Leo E. Chitosan-Alginate Microparticles as a Protein Carrier. *Drug Dev Ind.* 2001;27:393-400.
- Corti F, Cirri M, Maestrelli F, Mennini N, Mura P. Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl-b-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68:303–309.
- Crearevska MS, Dodov MG, Goracinova K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68:565-78.
- Dai YN, Li P, Zhang JP, Wang AQ, Wei Q. Swelling characteristics and drug delivery properties of nifedipine-loaded pH sensitive alginate-chitosan hydrogel beads. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;86:493-500.
- Dainty AL, Goulding KH, Robinson PK, Sinpkins I, Trevan MD. Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnol Bioeng.* 1986;28:210-6.
- De Jaeghere F, Allémann E, Doelker E, Gurny R., Cerny R., Galli B, Steulet AF, Müller I, Schütz H. pH-Dependent dissolving nano-and microparticles for improved peroral delivery of a highly lipophilic compound in dogs. *AAPS J.* 2001;3: 92-9.
- Dey NS, Majumdar S, Rao M. Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. *Trop J Pharm Res.* 2008;7:1067-75.
- Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT.* 1998;1:246-53.

- Donati I, Holtan S, Mørch YA, Borgogna M, Dentini M, Skjak-Braek G. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels. *Biomacromolecules*. 2005;6:1031-40.
- Dong Y, Ruan Y, Wang H, Zhao Y, Bi D. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *J Appl Polym Sci*. 2004;93:1553-8.
- Douglas KL, Tabrizian M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J Biomat Sci-Polym E*. 2005;16:43-56.
- Draget KI, Smidsrod O, SkjakBraek G. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents. Steinbuchel A, Rhee SK, Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, Weinheim; 2005:1.
- Eskilson C. Controlled release by microencapsulation. *Manuf Chem*. 1985;563:33-9.
- Evonik Industries AG. Eudragit® L 100-55. Specification and test methods. Darmstadt. 2011;1-6.
- Fang Y, Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K, Funami T, Williams PA, Li L. Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate. *J Phys Chem B*. 2007;111:2456-62.
- FDA, 1997, US Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD August, 1997.
- Ferreira AP, Almeida AJ. Cross-linked alginate gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. *J Control Release*. 2004;97:431-9.
- Ferrero C, Muñoz-Ruiz A, Jiménez-Castellanos MR. Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. *Int J Pharm*. 2000; 202:21-8.
- Fisher RA. *The Design of Experiments*, Oliver & Boyd, Edinburgh, 1926.
- Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*. 2004;282:1-18.
- Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*. 2005;102:313-32.
- Gacesa P. Bacterial alginate biosynthesis recent progress and future prospects. *Microbiology*. 1998;144:1133-43.
- Garcia-Fuentes M, Alonso MJ, Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J Control Release*. 2012;161:496-504.
- Gåserød O, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Microcapsules of alginate-chitosan-I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*. 1998;19:1815-25.

- Gaumet M, Gurny R, Delie F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36:465-73.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int.* 2007;40:1107-21.
- Gonzales-Rodriguez ML, Holgado MA, Sanchez-Lafuente C, Rabasco AM, Fini A. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int J Pharm.* 2002; 232: 225-34.
- Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Interactions between polysaccharides and divalent metals-Egg box model. *FEBS Lett.* 1973;32:195-8.
- Green BK, Schleicher L. Oil-containing Microscopic Capsules and Method of Making Them. US Patent 2800457, 1957.
- Haug A. Composition and properties of alginates. Thesis. Norwegian Institute of Technology, Trondheim. 1964.
- Hawkins S, Wolf M, Guyard G, Greenberg S, Dayan N. Microcapsules as a delivery system. In: *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer RR, Ed. William Andrew, Norwich. 2005:191-214.
- Healy AM, McDonald BF, Tajber L, Corrigan OI. Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NPMPs) of bendroflumethiazide. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69: 1182-6.
- Heinzen C, Berger A, Marison I. Use of vibration technology for jet break up for encapsulation of cells and liquids in monodisperse microcapsules in *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*. Nedovic V, Willaert R, Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 2004:257-75.
- Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci.* 1963;52:1145-8.
- Huguet ML, Dellacherie E. Calcium Alginate Beads Coated with Chitosan: Effect of the Structure of Encapsulated Materials on Their Release. *Process Biochem.* 1996;31:745-1.
- Hillyard IW, Doczi J, Kiernan PB. Antiacid and antiulcer properties of the polysaccharide chitosan. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;115:1108-12.
- Ilna AV, Varlamov VP. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. *Appl Bioch Micro.* 2004;40:300-3.
- Illum L, Farraj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res.* 1994;11:1186-9.
- Illum L. Chitosan and its use as pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998;15:1326-31.

Iruín A, Fernández-Arévalo M, Álvarez-Fuentes J, Fini A, Holgado MA. Elaboration and “in vitro” characterization of 5-ASA beads. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005;31:231-239.

Iqbal M, Lin W, Jabbal-Gill I, Davis SS, Steward MW, Illum L. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine.* 2003;21:1478-85.

Jaspart S, Piel G, Delattre L, Evrard B. Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opin Drug Del.* 2005;2:75-87.

Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29:322-37.

Jeon YJ, Kim SK. Production of chitooligosaccharides using ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohyd Polym.* 2000;41:133-41.

Jelvehgari M, Zakeri-Milani P, Siahi-Shadbad MR, Loveymi BD, Nokhodchi A, Azari Z, Valizadeh H. Development of pH-sensitive Insulin Nanoparticles using Eudragit L100-55 and Chitosan with Different Molecular Weights. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11:1237-42.

Johnson FA, Craig DQM, Mercer AD. Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:639-43.

Jyothish NV, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul.* 2010;27:187-97.

Jugoslovenska farmakopeja 2000 – Peto izdanje. Beograd: Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja.

Junco S, Casimiro T, Ribeiro N, Nunes Da Ponte M, Cabralmarques H. A comparative study of naproxen – β cyclodextrin complexes prepared by conventional methods and using supercritical carbon dioxide. *J Incl Pheno Macro.* 2002;44:117–21.

Khor E, Lee YL. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003;24:2339-49.

Kim C, Lee E. The controlled release of blue dextran from alginate beads. *Int J Pharm.* 1992;7: 11-9.

Kim SY, Shon DH, Lee KH. Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol Biotechn.* 1998;8:568-74.

Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohyd Polym.* 2005;62:357-68.

King, A. Light-Sensitive Oral Prescription Drugs. *Hosp Pharm.* 2009;44:1112-4.

Kittur FS, HarishPrashanth KV, Sankar KU, Tharanathan RN. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydr Polym.* 2002;49:185-93.

Kofuji K, Qian C-J, Nishimura M, Sugiyama I, Murata Y, Kawashima S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur Polym J.* 2005;41: 2784-91.

Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 1983;15:25-35.

Kramer J, Blume H. Biopharmaceutical aspects of multiparticulates. In: *Multiparticulate Oral Drug Delivery*, Ghebre-Sellasie Y, Ed. Marcel Dekker, New York; 1994:307-32.

Kubota N, Kikuchi Y. Macromolecular complexes of chitosan. In: *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, Dumitriu S, Ed. Marcel Dekker, New York; 1998:595-628.

Kumar MNVR. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci.* 2000;3: 234-58.

Lamprecht A, Schafer U, Lehr CM. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm Res.* 2001;18:788-93.

Lao LL, Peppas NA, Boey FY, Venkatraman SS. Modeling of drug release from bulk degrading polymers. *Int J Pharm.* 2011;418:28-41.

Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules.* 2007;8:2533-41.

Leane M, Nankervis R, Smith A, Illum L. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. *Int J Pharm.* 2004;271:241-9.

Lee H W, Choi JW, Han DP, Park MJ, Lee NW, Yi DH. Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *J Microbiol Biotechnol.* 1996;6:19-25.

Lee KL, Park WH, Ha WS. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J Appl Polym Sci.* 1997;63:425-32.

Lee M, Li W, Siu RK, Whang J, Zhang X, Soo C, Kang Ting K, Wu BM. Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials.* 2009;30:6094-101.

Lewis G, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York; 1999:2.

Liouni M, Drichoutis P, Nerantzis ET. Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate-chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24:281-8.

- Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *Int J Pharm.* 2004;276:59-66.
- Maghsoodi M. Physicomechanical properties of naproxen-loaded microparticles prepared from Eudragit L100. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10:120-8.
- Martinsen A, Skjik-Braek G, Smidsrod O. Alginate as immobilization materials. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng.* 1989;33: 79-89.
- Milić J, Petrović SD. Karakteristike savremenih farmaceutskih oblika. *Hem Ind.* 2003;57:424-36.
- Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams RO. Targeted intestinal delivery of supersaturated itraconazole for improved oral absorption. *Pharm Res.* 2008; 25:1450-9.
- Mohamed F, Van Der Walle CF, Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J Pharm Sci.* 2008;97:71-87.
- Morch YA, Donati I, Strand BL, Skjak-Brak G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. *Biomacromolecules.* 2006;7:1471-80.
- Moustafine RI, Margulis EB, Sibgatullina LF, Kemenova VA, Van den Mooter G. Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit[®] L100 and Eudragit[®] L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70:215-25.
- Murata, Y, Maeda T, Miyamoto E, Kawashima S. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads - effects of chitosan on gel matrix erosion. *Int J Pharm.* 1993;96:139-45.
- Neto CGT, Giacomettib JA, Jobb AE, Ferreirab FC, Fonseca JLC, Pereiraa MR. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydr Polym.* 2005;62:97-103.
- O' Donnell PB, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28:25-42.
- Ouchi T, Banba T Masuda H. Design of Chitosan-5Fu Conjugate Exhibiting Antitumor Activity. *J Macromol Sci-Chem A.* 1991;28:959-75.
- Patel YL, Sher P, Pawar AP. The effect of drug concentration and curing time on processing and properties of calcium alginate beads containing metronidazole by response surface methodology. *AAPS PharmSciTech.* 2006;4:E24-E30.
- Park K, Yeo Y. Microencapsulation Technology. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd ed, Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York, 2007;2315-27.
- Paul W, Sharma CP. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater Artif Organs.* 2004;18:18-23.

Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv.* 1985;60:110-1.

Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm.* 1989;57:169-72.

Petrović J. Karakterizacija hidrofилnih i lipidnih matriks tableta sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance primenom in silico metoda. Doktorska disertacija. Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 2010.

Ph. Eur. 7.0. European Pharmacopoeia Seventh Edition. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, Strasbourg. ISBN: 978-92-871-6700-2.

Polk A, Amsden B, Yao KD, Peng T, Goosen MFA. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J Pharm Sci.* 1994;83:178-85.

Poncelet D, Babak V, Dulieu C, Picot A. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloid Surface A.* 1999;155:171-6.

Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Ann Ny Acad Sci.* 2001;944:74-82.

Prochazkova S, Varum K, Ostgaard K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydr Polym.* 1999;38:115-22.

Prüsse U, Bilancetti L, Bucko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, Lewinska D, Manojlovic V, Massart B, Nastruzzi C, Nedovic V, Poncelet D, Siebenhaar S, Tobler L, Tosi A. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap.* 2008;62:364-74.

Prüsse U, Dalluhn J, Breford J, Vorlop KD. Production of spherical beads by JetCutting. *Chem Eng Technol.* 2000;23:1105-10.

Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, Gao X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol.* 2002;31:111-7.

Quong D, Neufeld RJ. DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan or poly-L-lysine-coated alginate beads. *Biotechnol Bioeng.* 1998;60:124-34.

Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Farmakologija*, 5th ed. Data Status, Beograd; 2005:244-5.

Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J Microencapsul.* 2006;23:245-57.

Ribeiro AJ, Neufeld RJ, Arnaud P, Chaumeil JC. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan - coated alginate microspheres. *Int J Pharm.* 1999;187:115-23.

- Ribeiro AJ, Silva C, Ferreira D, Veiga F. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *Eur J Pharm Sci.* 2005;25:31-40.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31:603-32.
- Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release.* 1987;5:23-36.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed. Pharmaceutical Press, London; 2009:20-1,622-3.
- Pawar S, Edgar K. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 2012;33:3279-305.
- Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydr Polym.* 2008;74:813-21.
- Sankalia MG, Mashru RC, Sankalia JM, Sutariya VB. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;65:215-32.
- Sarmiento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. *Int J Pept Res Ther.* 2006;12:131-8.
- Sartori C, Finch DS, Ralph B, Gilding K. Determination of the cation content of alginate thin films by FT-IR. spectroscopy. *Polymer.* 2007;38:43-51.
- Samain E, Drouillard S, Heyraud A, Driguez H, Geremia RA. Gram-scale synthesis of recombinant chitoooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydr Res.* 1997;302:35-42.
- Sawayanagi Y, Nambu N, Nagai T. Enhancement of dissolution properties of griseofulvin from ground mixtures with chitin and chitosan. *Chem Pharm Bull.* 1982;30:4464-67.
- Seon JK, Seoung GY, Sun IK. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogels composed of alginate and poly(diallyldimethylammonium chloride). *J Appl Polym Sci.* 2003;91:37-59.
- Sevgi F, Yurdasiper A, Kaynarsoy B, Turunç E, Güneri T, Yalçın A. Studies on mefenamic acid microparticles: Formulation, in vitro release, and in situ studies in rats. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10:104-12.
- Shah PP, Mashru RC, Rane YM, Thakkar A. Design and Optimization of Mefloquine Hydrochloride Microparticles for Bitter Taste Masking. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9:377-89.
- Shahidi F, Han XQ. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci.* 1993;33:501-47.

- Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate J*. 1997;14: 535-42.
- Shirui M, Xintao S, Florian U, Michael S, Dianzhou B, Thomas K. The depolymerization of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties. *Int J Pharm*. 2004;281:45-54.
- Siepmann J, Göpferich A, Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;48:229-47.
- Siepmann J, Siepmann F. Microparticles Used as Drug Delivery Systems. *Progr Colloid Polym Sci*. 2006;133:15-21.
- Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, Ferreira M, Veiga F. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *The AAPS Journal*. 2006;7:E903-E9013.
- Simsek-Ege FA, Bond GM, Stringer J. Polyelectrolyte Complex Formation Between Alginate and Chitosan as a Function of pH. *J Appl Polym Sci*. 2003;88:346-51.
- Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53:1047-67.
- Sirica AE, Woodman RJ. Selective aggregation of L 1210 leukemia cells by the polycation chitosan. *J Natl Cancer Inst*. 1971;47:377-88.
- Slomkowski S, Basinska T. Polymer Nano- and Microparticle Based Systems for Medical Diagnostics. *Macromol Sy*. 2010;295:13-22.
- Smrdel P, Bogataj M, Mrhaj A. The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation. *Sci Pharm*. 2008;76:77-89.
- Srinivasa PC, Tharanathan RN. Chitin/chitosan - safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int*. 2007;23:53-72.
- Stokke BT, Drager KI, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gel. *Macromol Symp*. 1997;120:91-101.
- Strand SP, Tommeraas K, Varum KM, Ostgaard K. Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Biomacromolecules*. 2001;2:1310-4.
- Sweetman SC, Martindale: The Complete Drug Reference, 36th ed. Pharmaceutical Press, London; 2009:92-4.
- Takka S, Acarturk F. Calcium alginate microparticles for oraladministration: I effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. *J Microencapsul*. 1999;16:275-90.
- Tang ESK, Chan LW, Heng PWS. Coating of Multiparticulates for Sustained Release. *Amer J Drug Delivery*. 2005;3:17-28.

- Thies C. A Survey of Microencapsulation Processes. In *Microencapsulation*, Benita S, Ed. Marcel Dekker, New York; 1996:1-19
- Thomas C, Gupta V, Ahsan F. Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. *Pharm Res.* 2010;27:905-19.
- Thongngam M, McClements DJ. Characterization of interactions between chitosan and an anionic surfactant. *J Agric Food Chem.* 2004;52:987-91.
- Tien CL, Lacroix M, Ispas-Szaboab P, Mateescu MA. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. *J Controll Rel.* 2003;93:1-13.
- Tran VT, Benoit JP, Venier-Julienne MC. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? *Int J Pharm.* 2011;407:1-11.
- Tonessen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28: 621-30.
- US Pharmacopoeia 30. US Pharmacopeial Convention, Rockville; 2007.
- Vandenberg GW, Noue JDL. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. *J Microencapsul.* 2001;18:433-41.
- Vasiliu S, Popa M, Rinaudo M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *Eur Polym J.* 2005;41:923-32.
- Vennat B, Lardy F, Arvouet-Grand A, Pourrat A. Comparative texturometric analysis of hydrogels based on cellulose derivatives, carragenates, and alginates: evaluation of adhesiveness. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24:27-35.
- Verma RK, Garg S. Current Status of Drug Delivery Technologies and Future Directions. *Pharm Tech.* 2001;25:1-14.
- Vilos C, Velasquez LA. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:1-9.doi:10.1155/2012/672760.
- Vorlop KD, Klein J. New developments in the field of cell immobilization - Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. In: *Enzyme technology*, Lafferty RM, Maier E, Eds. Springer, Berlin;1983:221-35.
- Wong, TW. Chitosan and Its Use in Design of Insulin Delivery System. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2009;3:8-25.
- Wu Y, Hussain M, Fassihi R. Development of a simple analytical methodology for determination of glucosamine release from modified release matrix tablets. *J Pharmaceut Biomed.* 2005;38:263-9.
- Xiaoling Li, Jasti BR. *Design of controlled release drug delivery systems.* McGraw Hill, New York; 2006:xi.

Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Del.* 2009;6:785-92.

Yan XL, Khor E, Lim LY. Chitosan-Alginate Films Prepared with Chitosans of Different Molecular Weights. *J Biomed Mat Res.* 2001; 58:358-65.

Yang CC, Wang WC, Chen HY. Taste-masking oral dosage form and method of preparing the same. US Patent App. 12/457,151, 2009.

Yin H, Du Y, Zhang J. Low molecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities. *Curr Top Med Chem.* 2009;9:1546-59.

Yin H, Zhao X, Du Y. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review. *Carbohydr Polym.* 2010;82:1-8.

8. Prilozi

8.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

8.1.1. Radovi u međunarodnom časopisu

- [1] Čalija B, Cekić N, Savić S, Krajišnik D, Daniels R, Milić J. An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen. *Arch. Pharm. Res.* 34(6):919-929, 2011; doi: 10.1007/s12272-011-0609-y.
- [2] Čalija B, Milić J, Cekić N, Krajišnik D, Daniels R, Savić S. Chitosan oligosaccharide as prospective crosslinking agent for naproxen-loaded Ca-alginate microparticles with improved pH-sensitivity. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 39(1):77-88; doi:10.3109/03639045.2012.658813.

8.1.2. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini

- [1] Čalija B, Cekić N, Savić S, Marković B, Savić J, Milić J. Swelling and drug release properties of naproxen-loaded Ca-alginate microparticles reinforced with chitosan oligosaccharide. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 57 (suppl), Ohrid, Macedonia; 2011: CD-ROM, p. 233-234. (*Usmeno izlaganje*)
- [2] Čalija B, Cekić N, Savić S, Jakšić I, Milić J. Naproxen loaded calcium-alginate microparticles reinforced with chitosan oligosaccharide - preparation and *in vitro* characterization. 2nd Congress of Pharmacist of Bosnia and Herzegovina with International Participation. Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; 2011: Proceedings, p. 237-239.
- [3] Čalija B, Cekić N, Savić S, Pantelić I, Milić J. The influence of oligochitosan concentration and preparation procedure on drug release behaviour of alginate-oligochitosan microparticles. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey; 2012: CD-ROM Proceedings.

8.1.3. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu

- [1] Čalija B, Cekić N, Krajišnik D, Milić J. Chitosan/calcium-alginate microparticles for oral delivery of naproxen: Influence of formulation factors on drug release. 2nd PharmSciFair 2009, Nice, France; Book of Abstracts, p. 161.
- [2] Čalija B, Cekić N, Savić S, Milić J. *In Vitro* Release Behavior of Naproxen in Alginate-Chitosan Microparticles as Oral Drug Delivery Systems. 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2010, Graz, Austria; *Sci Pharm.* 2010; 78: 601. doi:10.3797/scipharm.cespt.8.PDD12.

- [3] Cekić N, Čalija B, Savić S, Milić J. Study of Formulation Factors Influencing Phenytoin Release Rate from Alginate–Chitosan Microparticles using an Experimental Design Approach. Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2010, Graz, Austria; Sci Pharm. 2010; 78: 602. doi: 10.3797/scipharm.cespt.8.PDD13.
- [4] Čalija B, Cekić N, Savić S, Mašić I, Milić J. The influence of chitosan-oligosaccharide as crosslinking agent on pH-sensitive drug release from Ca-alginate microparticles. 3rd PharmSciFair 2011, Prague, Czech Republic; Book of Abstracts, p.138.
- [5] Cekić N, Čalija B, Savić S, Savić M, Milić J. Release profiles of naproxen-loaded, chitosan oligosaccharide treated alginate-microparticles prepared in the two-stage procedure. 3rd PharmSciFair 2011, Prague, Czech Republic; Book of Abstracts, p. 79.
- [6] Čalija B, Cekić N, Savić S, Pantelić I, Milić J. An investigation of oligochitosan binding to Ca-alginate microparticles by ninhydrin assay. Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 2012, Dubrovnik, Croatia; PP99.

8.1.4. Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu

- [1] Čalija B, Milić J, Cekić N, Savić S, Pavlović B, Radulović V. Formulation and characterization of chitosan/calcium alginate microparticles for oral delivery of naproxen. Biofarm 2009, 22.10.2009, Beograd, Srbija; Knjiga sažetaka: p. 2.
- [2] Čalija B, Milić J, Cekić N, Savić S. Fizičko-hemijska karakterizacija hitozan-Ca-alginatnih mikročestica sa naproksenom izrađenih postupkom jonotropnog geliranja i polielektrolitnog kompleksiranja. V kongres farmaceuta Srbije, 2010, Beograd, Srbija; Arh. farm. 2010; 60 (5): 744-745, PP-6.
- [3] Cekić N, Milić J, Čalija B, Savić S, Savić M. Izrada i profili oslobađanja alginatnih mikročestica obloženih hitozanom i alginatnih mikročestica pripremljenih mešanjem sa HPMC. V kongres farmaceuta Srbije, 2010, Beograd, Srbija; Arh. farm. 2010; 60 (5): 736-737, PP-2.
- [4] Čalija B, Cekić N, Savić S, Krajišnik D, Milić J. Termalna i FT-IR spektroskopska analiza strukture i interakcija u alginatnim mikročesticama sa naproksenom umreženih sa oligohitozonom. Biofarm 2011, 27.10.2011, Beograd, Srbija; Knjiga sažetaka: p. 1.

8.1.5. Tehnička i razvojna rešenja – Novi tehnološki postupak

- [1] Cekić N, Savić S, Savić M, Čalija B, Milić J. Tehnološki postupak dobijanja mikrosfera na bazi alginata i hitozana kao nosača za modifikovano oslobađanje

lekovitih supstanci. Recenzenti: prof. dr Marija Primorac i prof. dr Viktor Nedović.

8.2. Biografija autora

Bojan Čalija rođen je 1982. godine u Sarajevu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Trebinju. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2001/2002. godine, a diplomirao 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,32. Tokom studija bio je stipendista opštine Trebinje.

Doktorske akademske studije iz Farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2007/2008. godine. Tokom školske 2008/2009. godine bio je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srpske, a tokom 2009/2010. godine stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske. U 2009. godini dobio je stipendiju Službe nemačke akademske razmene (DAAD) za istraživački boravak na Katedri za Farmaceutsku tehnologiju Tehnološkog Univerziteta Carolo-Wilhelmina u Braunschweig-u u okviru specijalnog programa za Srbiju: „Istraživačko iskustvo u Nemačkoj za studente i diplomce iz Srbije“.

Od oktobra 2007. godine radio je kao saradnik u nastavi do aprila 2008. godine kada je izabran u zvanje asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i od tada učestvuje u izvođenju i organizaciji praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutska tehnologija II i Savremeni farmaceutski oblici.

Od 2008. do kraja 2010. godine učestvuje kao saradnik na projektu tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj i karakterizacija koloidnih nosača za antiinflamatorne lekove“ (TR-19058), a od 2011. godine na projektu tehnološkog razvoja „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ (TR-34031) i projektu osnovnih istraživanja „Razvoj molekula sa antiinflamatornim i kardioprotektivnim dejstvom: strukturne modifikacije, modelovanje, fizičko-hemijska karakterizacija i formulaciona ispitivanja“ (OI-172041) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

8.3. Izjava o autorstvu

Potpisani: Bojan Čalija

broj indeksa: 5/07

Izjavljujem

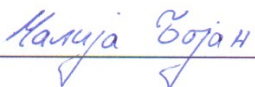
da je doktorska disertacija pod naslovom

Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.04.2013.



8.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Bojan Čalija

Broj indeksa: 5/07

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije

Naslov rada: Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove

Mentor: prof. dr Jela Milić

Potpisani: Bojan Čalija

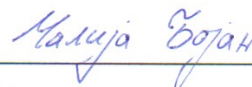
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.04.2013.



8.5. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.04.2013.

