

Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera u flutikazonpropionatom za nazalnu primjenu

Barišić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:873561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

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



Antonia Barišić

**Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi
mikrosfera s flutikazonpropionatom za nazalnu
primjenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biofarmacija s farmakokinetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, pomoći i trudu uloženom u realiziranje ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Lauri Nižić, mag. pharm. na pomoći, savjetima i pratnji tijekom izrade ovog diplomskog rada kao i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Zahvaljujem svima onima koji zauzimaju posebno mjesto u mom srcu.

Najveće hvala mojoj majci Katarini.

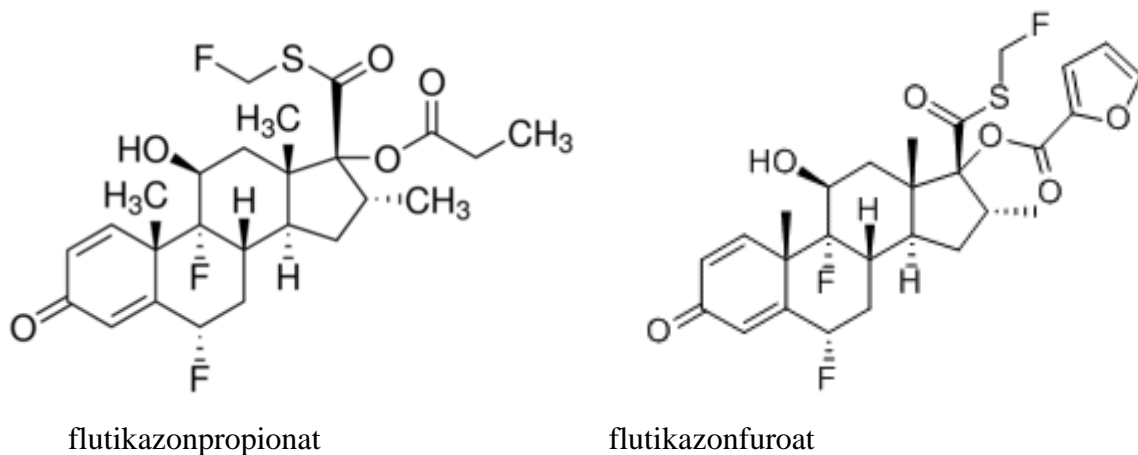
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. DJELOVANJE I PRIMJENA FLUTIKAZONA	1
1.2. PREDNOSTI I OGRANIČENJA NAZALNE PRIMJENE LIJEKOVA	6
1.3. <i>IN SITU</i> GELIRAJUĆI SUSTAVI ZA NAZALNU PRIMJENU	8
1.3.1. Tekući <i>in situ</i> gelirajući sustavi.....	8
1.3.2. Praškasti <i>in situ</i> gelirajući sustavi	9
1.4 SUŠENJE RASPRŠIVANJEM.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	18
3.2. METODE	18
3.2.1. ODREĐIVANJE KRIVULJE VISKOZNOSTI POLIMERNIH OTOPINA	18
3.2.2. PRIPRAVA OTOPINA POLIMERA I LIJEKA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	18
3.2.3. PRIPRAVA MIKROSFERA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM.....	19
3.2.4. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM.....	20
3.2.5. ODREĐIVANJE VELIČINE MIKROSFERA	20
3.2.6. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI UKLAPANJA I SADRŽAJA LIJEKA U MIKROSFERAMA.....	20
3.2.7. ISPITIVANJE BUBRENJA MIKROSFERA	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH OTOPINA	23
4.2. PRIPREMA MIKROSFERA	26
4.3. ISKORIŠTENJE PROCESA.....	27
4.4. VELIČINA ČESTICA	28
4.5. USPJEŠNOST UKLAPANJA I SADRŽAJ LIJEKA U MIKROSFERAMA	29
4.6. SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA	30
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK/ SUMMARY	40

1. UVOD

1.1. DJELOVANJE I PRIMJENA FLUTIKAZONA

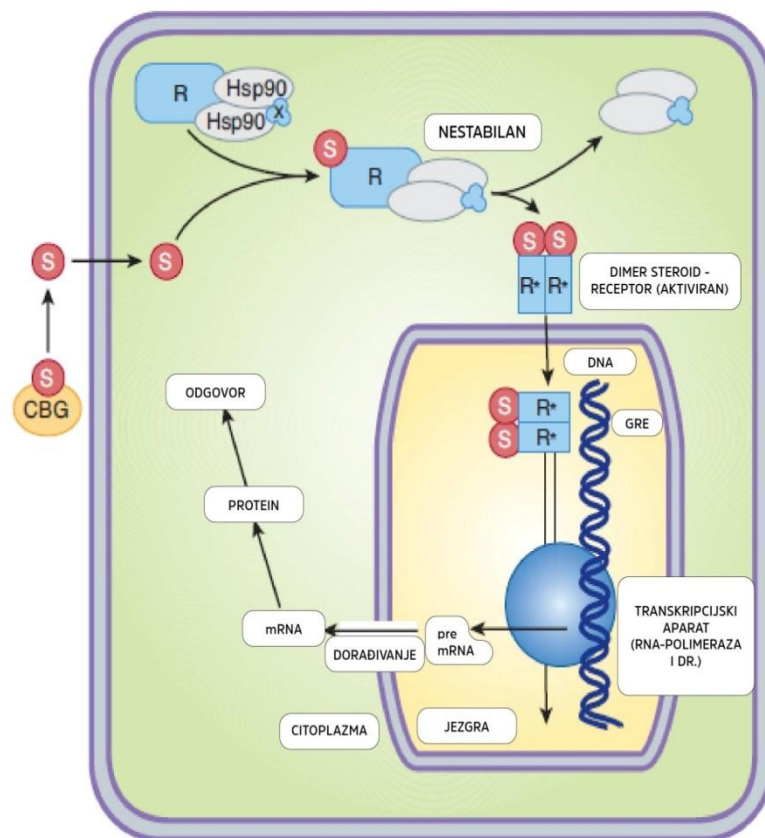
Flutikazon, poznati i potentni glukokortikoid danas se široko primjenjuje u stanjima popraćenim nazalnim simptomima, poput alergijskog i nealergijskog rinitisa, nazalnih polipa, te u astmi i kroničnoj oprstruktivnoj bolesti pluća (KOPB). Spoj uzor iz kojeg nastaju dva esterska oblika flutikazona, flutikazonpropionat i flutikazonfuroat (Slika 1.), je kortizol, čijom su modifikacijom dobiveni lipofilniji i selektivniji navedeni spojevi (Crim i sur., 2001).



Slika 1. *Struktura flutikazonpropionata i flutikazonfuroata (prilagođeno prema Crim i sur., 2001)*

Flutikazon, kao lijek iz skupine glukokortikoida protuupalno djelovanje postiže stereospecifičnim vezanjem na tzv. steroidne receptore u citoplazmi stanice. Što je snažnije vezanje na steroidne receptore, snažnije je i djelovanje glukokortikoida, pa se protuupalna aktivnost pojedinih lijekova iz skupine glukokortikoida može objasniti njihovom sposobnošću vezanja za receptore. Tako, primjerice, flutikazon ima 18 puta snažnije djelovanje od deksametazona (Crim i sur., 2001; Pauwels, 1986). Opširniji mehanizam djelovanja prikazan je na Slici 2. (Katzung, 2011). Molekula steroida je u krvi vezana na CBG-globulin koji veže kortikosteroide, ali u stanicu ulazi kao slobodna molekula. Unutarstanični receptor je vezan na stabilizirajuće proteine, proteine toplinskog šoka (Hsp 90) te ostale strukture označene na Slici 2. kao X. Kao takav, kompleks nije aktivan. Kada kompleks veže molekulu steroida, npr. molekulu flutikazona, Hsp 90 i pridružene molekule se oslobađaju, a kompleks steroid-

receptor se dimerizira i translocira u jezgru. U jezgri se kompleks veže na GRE (element odgovora glukokortikoida) i regulira transkripciju gena preko RNA polimeraze II i pridruženih transkripcijskih faktora. To rezultira prevođenjem mRNA u specifične proteine koji su uključeni u protuupalno djelovanje kortikosteroida. Osim sa GRE, kompleks može ući u interakciju i mijenjati funkciju nekih drugih transkripcijskih faktora, primjerice nuklearnog faktora kappa B u jezgri (Katzung, 2011).



Slika 2. Prikaz interakcije steroida *S* i njegovog receptora *R* te kasnijih događaja u ciljnoj stanici (prilagođeno prema Katzung, 2011)

Lipokortin, protein sintetiziran u neutrofilima kao posljedica djelovanja glukokortikoida, inhibira aktivnost enzima fosfolipaze A2 i tako sprječava oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida, a koja je supstrat za nastajanje prostaglandina, leukotriena i faktora aktivacije trombocita (Pauwels, 1986). Također reducira ekspresiju enzima ciklooksigenaze 2, a s tim i sintezu proupalnih medijatora. Nadalje, glukokortikoidi utječu na koncentraciju, distribuciju i funkciju perifernih leukocita, suprimiraju proupalne citokine i kemokine te ostale medijatore

upale. Za kratko vrijeme smanjuju koncentraciju limfocita, monocita, eozinofila i bazofila te inhibiraju aktivaciju tkivnih makrofaga i antigen prezentirajućih stanica. Analogno tome onemogućena je fagocitoza, izlučivanje TNF- α , IL-1 (Katzung, 2011). Glukokortikoidi mogu ispoljavati svoje djelovanje i bržim putem koji je neovisan o jezgri i transkripciji gena, a uključuje primjerice inhibiciju oslobađanja prostaglandina iz endotela, inhibiciju olobađanja ACTH-a iz određenih tumorskih stanica ili inhibiciju priljeva Ca²⁺ iona interferiranjem s fosforilacijom proteina (Pauwels, 1986).

Danas se kortikosteroidi najvećim dijelom koriste topikalno, pulmonalno i nazalno kako bi se izbjegla sistemska apsorpcija lijeka te neželjene nuspojave poput adrenalne supresije, hipoglikemije, osteoporoze, slabljenja imunskog sustava te sklonosti infekcijama (Shaw, 1994). Prednost flutikazona je njegov ekstenzivan prvi prolaz kroz jetru i brzi metabolizam u inaktivnu 17-karboksilnu kiselinu i njezine derivate.

Glukokortikoidi proizvode velik broj pozitivnih učinaka u stanjima koje karakterizira alergijska upala. Nazalna primjena kortikosteroida navodi se kao prva linija terapije alergijskog rinitisa prema EPOS smjernicama iz 2012. godine (Fokkens i sur., 2012). Alergijski rinitis je upala sluznice nosa koja nastaje nakon izlaganja alergenima. Statistički podaci pokazuju da je oboljelih 10-25% svjetske populacije, a više od 40% su djeca. Alergijski rinitis bilježi porast prevalencije u zadnjih 40 godina. Simptomi koji prate bolest su začepljenost nosa, pojačana sekrecija, kihanje te svrbež nosa. Navedeni simptomi nisu opasni ali smanjuju kvalitetu života te povećavaju rizik razvoja astme. Nerijetka su i prateća oboljenja poput rinosinusitisa-upale sluznice nosa koja zahvaća paranazalne sinuse koja često rezultira gubitkom osjeta mirisa te nosna polipoza koja se očituje peteljkastim izraslinama, tzv. polipima. Nealergijski rinitis zahvaća 2-4% populacije većinom srednje životne dobi (Roje i sur., 2011). Kortikosteroidi smanjuju upalu i hiperreaktivnost nazalne sluznice te stopu nastanka i vraćanja nazalnih polipa (Baumann i sur., 2011). Oblici za nazalnu primjenu osiguravaju precizno doziranje kortikosteroida u nosnu šupljinu. Lokalno se primjenjuje mala doza lijeka, te je mala i mogućnost nuspojava i predoziranja. Ovakav način liječenja je neinvazivan, praktičan i prikladan za samoliječenje. U Tablici 1. prikazani su farmaceutski oblici flutikazona za nazalnu primjenu indicirani u liječenju alergijskog rinitisa i nosne polipoze, odobreni u Republici Hrvatskoj.

Tablica 1. Farmaceutski oblici flutikazona za nazalnu primjenu odobreni u Republici Hrvatskoj (preuzeto sa <http://new.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>)

NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR I DOZA	FARMACEUTSKI OBLIK	TERAPIJSKA INDIKACIJA
Dymista	flutikazonpropionat 50µg azelastinklorid 137µg	sprej za nos, suspencija	ublažavanje simptoma umjerenog do teškog sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa
Flixonase	flutikazonpropionat 400µg	kapi za nos, suspencija	redovita terapija kod bolesnika s nosnim polipima i povezanim simptomima nosne opstrukcije
Flixonase	flutikazonpropionat 50µg	sprej za nos, suspencija	profilaksa i liječenje sezonskog alergijskog rinitisa (uključujući peludnu hunjavicu) i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa
Rinoco	flutikazonpropionat 50µg	sprej za nos, suspencija	profilaksa i liječenje sezonskog alergijskog rinitisa (uključujući peludnu hunjavicu) i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa
Synaze	flutikazonpropionat 50µg azelastinklorid 137µg	sprej za nos, suspencija	ublažavanje simptoma umjerenog do teškog sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa

Kod astme i KOPB-a, flutikazon se primjenjuje u obliku aerosola inhalacijom. U Tablici 2. prikazani su farmaceutski oblici flutikazona za pulmonalnu primjenu indicirani kod različitih stupnjeva astme te KOPB-a, odobreni u Republici Hrvatskoj.

Tablica 2. Farmaceutski oblici flutikazona za pulmonalnu primjenu odobreni u Republici Hrvatskoj (preuzeto sa <http://new.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>)

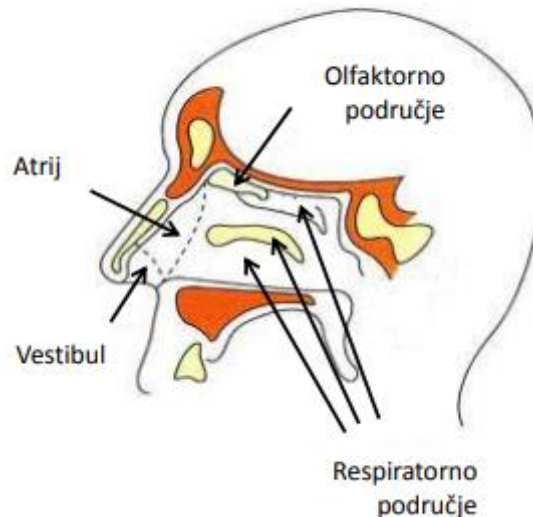
NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR I DOZA	FARMACEUTSKI OBLIK	TERAPIJSKA INDIKACIJA
Arquist	flutikazonpropionat 250µg	stlačeni inhalat, suspencija	liječenje astme u odraslih i adolescenata starijih od 16 godina, liječenje teškog KOPB-a uz istodobnu primjenu beta agonista dugog djelovanja u odraslih
Airflusal	salmeterol 25µg flutikazonpropionat 125µg	stlačeni inhalat, suspencija	redovito liječenje astme kada je potrebna primjena kombiniranog lijeka
AirFluSal Forspiro	salmeterol 50µg flutikazonpropionat 250µg	prašak inhalata, dozirani	liječenje astme za koju je indicirana primjena kombiniranog lijeka, simptomatsko liječenje bolesnika s KOPB- om
Dimenium	salmeterol 50µg flutikazonpropionat 100/200/500 µg	prašak inhalata, dozirani	liječenje astme za koju je indicirana primjena kombiniranog lijeka, simptomatsko liječenje bolesnika s KOPB- om

Flixotide Diskus	flutikazonpropionat	prašak inhalata, višedozni inhalator sa suhim praškom	preventivno liječenje astme, blaga, umjerena i teška astma
Flixotide	flutikazonpropionat 50/125/250 µg	stlačeni inhalat, suspencija	profilaktičko liječenje astme (blage, umjerene, teške)
Fusamix	salmeterol 48µg flutikazonpropionat 238 µg	prašak inhalata, u odmjernom inhalatoru (Easyhaler)	redovito liječenje astme kada je potrebna primjena kombiniranog lijeka
Salmeterol/flutikazon Cipla	salmeterol 25µg flutikazonpropionat 125/250 µg	stlačeni inhalat, suspencija	redovito liječenje astme kada je potrebna primjena kombiniranog lijeka
Seretide Diskus	salmeterol 47µg flutikazonpropionat 92/231/460 µg	Prašak inhalata, dozirani	uobičajeno liječenje astme kada je potrebna primjena kombiniranog lijeka

1.2. PREDNOSTI I OGRANIČENJA NAZALNE PRIMJENE LIJEKOVA

Nazalna primjena danas je vrlo interesantan put primjene lijekova čiji se potencijal nastoji što više iskoristiti razvojem inovativnih terapijskih sustava (Mahdi i sur., 2005). Slika 3. prikazuje građu i anatomske strukture nosne šupljine koje su važne pri nazalnoj primjeni lijekova. Respiratorna sluznica nosne šupljine velike je površine, oko 150 cm², visoko prokrvljena te slabije enzimske aktivnosti u odnosu na probavni sustav (Westin, 2007). Respiratornu sluznicu prekriva epitel s mikrovilima koji štiti donje dišne putove od stranih čestica i mikroorganizama mukocilijarnim mehanizmom čišćenja (Merkus i sur., 1998). Barijera je dobro permeabilna za tvari molekulske mase manje od 1000 Da, koje postižu brzu

apsorpciju i terapijski učinak 30 minuta nakon primjene. Dodatna prednost pri nazalnoj primjeni lijeka s ciljem postizanja njegove sistemske raspoloživosti je izbjegavanje intestinalnog i hepatičkog metabolizma (Ghori i sur., 2005). Nazalno se primjenjuju i peptidni lijekovi čija je razgradnja u nosnoj šupljini znatno manja od intestinalne. Tako se, primjerice, dezmopresin primjenjuje nazalno u terapiji dijabetesa (Chevrel i Dessus, 2009).



Slika 3. Građa nosne šupljine (preuzeto iz Hafner i sur., 2014)

Malim dijelom površine nosne šupljine, otprilike 10 cm², prostire se olfaktorni epitel koji je “produžena ruka” olfaktornog bulbusa mozga, što omogućuje izravnu povezanost nosne šupljine sa središnjim živčanim sustavom (Leinder-Zufall i Ma, 2009). To otvara mogućnost nazalne primjene lijekova koji ostvaruju terapijski učinak u mozgu, pa su tako, primjerice, razvijeni mukoadhezivni *in situ* gelirajući sustavi antimigrenika sumatriptana za nazalnu primjenu s ciljem povećanja bioraspoloživosti lijeka (Galgatte i sur., 2014). U današnje vrijeme istražuju se i razvijaju inovativni terapijski sustavi kao i uređaji/medicinski proizvodi za nazalnu primjenu kako bi se proširila paleta nazalno primjenjivih lijekova. Lijekovi kandidati koji su predmet novih istraživanja su kalcitonin, analozi GnRH, anestetici, antiemetici, sedativi i sl. koji mogu postići transepitelnu apsorpciju iz nosne šupljine u krvotok i ostvariti terapijski učinak (Costantino i sur., 2007).

Veliko ograničenje nazalne primjene lijekova predstavlja mukocilijarni klirens koji u vremenskom intervalu od 30 minuta potpuno ukloni primijenjeni lijek iz nosne šupljine

(Baumann i sur., 2011). Nadalje, ograničen je volumen tekućeg farmaceutskog oblika koji se može primijeniti u nosnu šupljinu. Naime, pri velikom volumenu doziranja lijek može iscuriti izvan nosa ili u grlo pa terapijski učinak lijeka može izostati (Wolfe i sur., 2004). Da bi se lijek mogao oblikovati u tekući nazalni pripravak, mora biti dostatno stabilan te dobro topljiv ili potentan. Pri primjeni formulacije raspršivanjem u nosnu šupljinu, važno je da su raspršene čestice prikladne veličine budući da se odgovarajuća depozicija u nosnoj šupljini postiže pri veličini raspršenih kapljica/čestica od 10- 50 μm (Westin, 2007).

Medicinski proizvod koji obuhvaća farmaceutski oblik i uređaj za njegovu primjenu u nosnu šupljinu treba omogućiti dostavu djelatne tvari na ciljano mjesto te poduljiti vrijeme zadržavanja i oslobađanja djelatne tvari na nosnoj sluznici (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). U slučaju ciljane systemske dostave, moguće strategije za poboljšanje apsorpcije nazalno primijenjenog lijeka uključuju korištenje modulatora ili promotora apsorpcije, mukoadhezivnih polimera, prolijekova te inhibitora enzima (Hafner i sur., 2014).

1.3. *IN SITU* GELIRAJUĆI SUSTAVI ZA NAZALNU PRIMJENU

S ciljem produljenja vremena zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini i prilagođavanja profila oslobađanja, istraživanja u području farmaceutske tehnologije usmjerena su na tekuće i praškaste formulacije temeljene na mukoadhezivnim polimerima koji omogućuju nastanak mukoadhezivnog gela na mjestu primjene (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Gel je oblik koji posjeduje obilježja čvrstog stanja (elastičnost) i tekućeg stanja (viskoznost), a predstavlja kontinuiranu mrežu međusobno povezanih polimernih lanaca dispergiranih u kontinuiranoj tekućoj fazi (Banerjee i Bhattacharya, 2011).

1.3.1. Tekući *in situ* gelirajući sustavi

Geliranje polimernih disperzija u prikladnom otapalu može biti potaknuto fizičkim promjenama poput promjene temperature ili tlaka te kemijskim mehanizmima (promjena pH, aktivacija ionima ili prisutnost enzima). Polimerne molekule u gelu povezane su nekovalentnim vezama poput vodikovih, van der Waalsovih, elektrostatskih ili hidrofobnih veza (Banerjee i Bhattacharya, 2011).

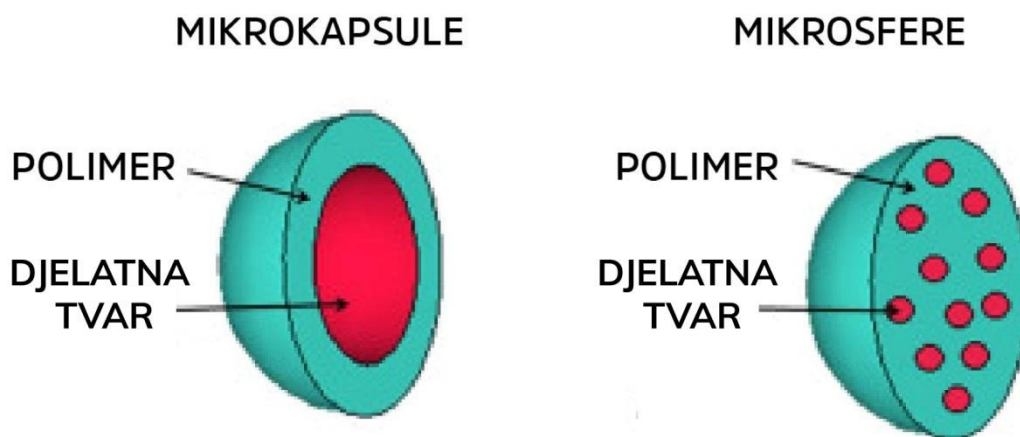
Otopine ili suspenzije koji geliraju na mjestu primjene moraju imati prikladna reološka svojstva prije i nakon geliranja (Mahdi i sur., 2015). U trenutku primjene takvog oblika poželjna su svojstva niske viskoznosti i dobrog tečenja, dok se prelaskom iz sol u gel stanje pri kontaktu s nosnom sluznicom reološka svojstva prilagođavaju duljem zadržavanju u

nosnoj šupljini i/ili optimiranju profila oslobađanja uklopljenog lijeka (Mahdi i sur., 2015). Modificiranjem koncentracije gelirajućeg polimera te samim odabirom polimera moguće je optimirati reološka svojstva sustava prije i nakon geliranja te prilagoditi profil oslobađanja. Stvaranjem mukoadhezivnog sloja gela s uklopljenim lijekom olakšan je kontakt nosne sluznice i lijeka, omogućeno dulje zadržavanje lijeka na mjestu primjene te povećana apsorpcija i terapijski učinak lijeka (Galgatte i sur., 2014).

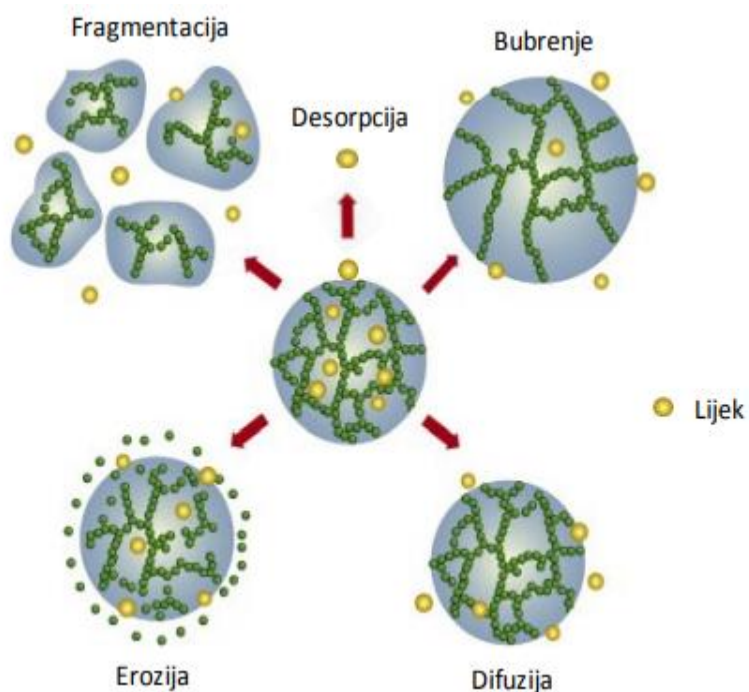
1.3.2. Praškasti *in situ* gelirajući sustavi

Praškasti oblici pokazali su se boljim izborom od tekućih budući da omogućuju dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu depozicije. Usto, prašci su stabilniji od tekućih oblika, a manja je i potreba za dodatkom pomoćnih tvari pri njihovom oblikovanju (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Zahtjevi za praške uključuju određeni raspon veličine čestica (ne manja od 10 μm zbog mogućnosti depozicije u donjim dišnim putovima i ne veća od 50 μm zbog izlaska čestica iz nosne šupljine), prikladnu morfologiju čestica, dobra svojstva tečenja i sigurnost primjene (neiritabilnost, kompatibilnost sa sluznicom) (Behl i sur., 1998; Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Polimerne mikročestice uvelike se razvijaju kao praškasti terapijski sustavi koji mogu poboljšati stabilnost i prilagoditi profil oslobađanja i apsorpcije djelatne tvari terapijskim potrebama (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Mikročestice se uglavnom pripravljaју od prirodnih biorazgradljivih polimera, a razlikuju se mikrosfere –polimerni matriksni sustavi u kojima je lijek otopljen ili dispergiran, te mikrokapsule- spremišni sustavi u kojima je lijek smješten u jezgi mikročestice, obavijenoj polimernom membranom (Slika 4.) (Paulo i Santos, 2017). Mehanizmi oslobađanja lijeka iz mikročestica prikazani su na Slici 5.



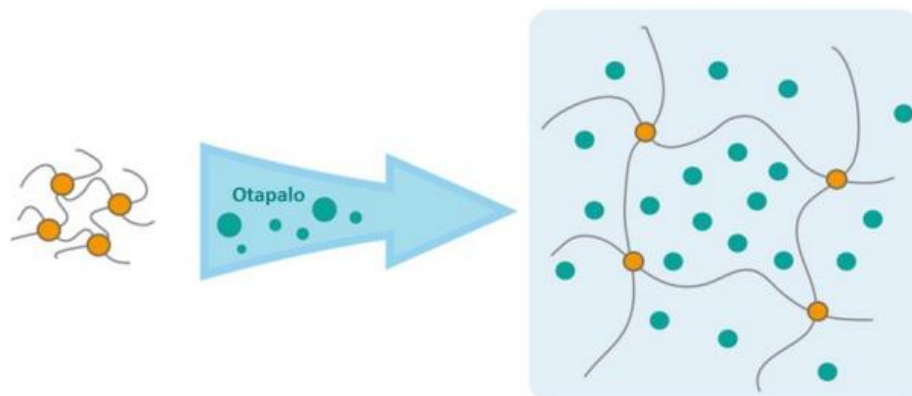
Slika 4. Prikaz polimernih mikrokapsula i mikrosfera (prilagođeno prema Paulo i Santos, 2017)



Slika 5. Mehanizmi oslobađanja lijeka iz mikročestica (preuzeto iz Hafner i sur., 2013)

Mikrosfere su sustavi velikog omjera površine prema volumenu i djeluju kao učinkoviti nosači lijeka. Mogu ostvariti ciljano djelovanje i kontrolirano oslobađanje lijeka. Kad im se

pridodaju mukoadhezivna svojstva, postižu se nove prednosti: ostvaruje se dulje zadržavanje na mjestu primjene, bolja apsorpcija, a posljedično i veća bioraspoloživost lijeka (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Polimeri koji grade mukoadhezivne mikrosfere za nazalnu primjenu biorazgradljivi su i biokompatibilni, te osiguravaju bubrenje mikrosfera u doticaju s nosnim fluidom pri čemu nastaje gel iz kojeg se lijek oslobađa difuzijom (Slika 6.).



Slika 6. Prikaz formiranja strukture gela bubrenjem iz suhog oblika (preuzeto i prilagođeno sa stranice www.aip.nagoya)

Mikrosfere bi se trebale pripravljati na jednostavan i reproducibilan način, uz visok stupanj uklapanja lijeka te visok prinos. Neke od metoda pripreme mukoadhezivnih mikrosfera prikazane su na Slici 7.



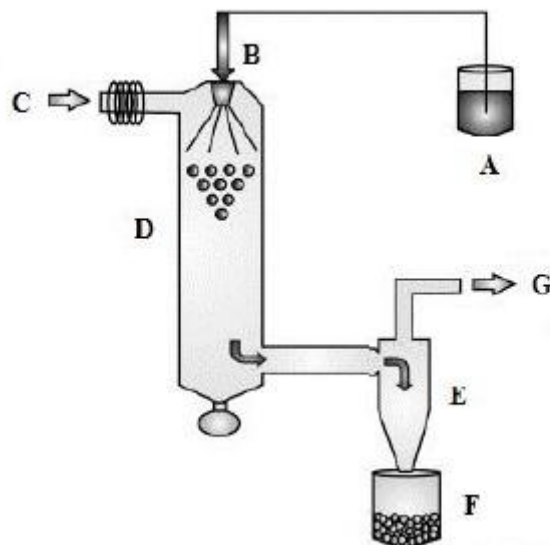
Slika 7. Metode pripreme mikročestica (izrađeno u programu Online mind mapping www.mindmeister.com) (prilagođeno prema Chowdary i Srinivasa Rao, 2004)

1.4 SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*) široko je primjenjivana tehnika pripreve suhih produkata (prašaka) iz tekućih sustava (Paudel i sur., 2013). Osim u farmaceutskoj industriji, koristi se u industriji hrane, detergenata, polimera i sl. U okviru farmaceutske industrije koristi se u proizvodnji pomoćnih tvari, za sušenje termolabilnih materijala, poboljšanje svojstava tečenja farmaceutskih prašaka, kapsuliranje djelatne tvari te pripremu prašaka za inhalaciju (Diez i sur., 2018). Tekući se uzorak (otopina, suspenzija, emulzija) raspršuje u zagrijanom mediju za sušenje pri čemu nakon uklanjanja otapala nastaje suhi čvrsti produkt u obliku praška, a to su uglavnom čestice amorfne strukture i uskog raspona veličina (Vehring, 2008). U najkraćim crtama može se reći da se proces sastoji od tri koraka: raspršivanja tekućeg uzorka, sušenja raspršenih kapljica i odvajanja suhog produkta iz struje medija za sušenje (Dürriegl, 2011).

Uređaj za sušenje raspršivanjem prikazan je na Slici 8. Peristaltička pumpa usisava uzorak i dovodi ga do sapnice. Sapnica raspršuje uzorak u sitne kapljice koje ulaze u komoru za sušenje gdje dolaze u doticaj s medijem za sušenje. Medij za sušenje najčešće je zagrijani zrak ili inertni plin (argon, dušik, ugljikov dioksid). Radom aspiratora koji kontrolira protok medija za sušenje nastaje podtlak. Formirane čestice odvajaju se od struje medija za sušenje u ciklonu te se sakupljaju u posudi za suhi produkt (Bürki i sur., 2010).

Raspršivanjem tekućeg uzorka u sitne kapljice povećava se dodirna površina između otapala i medija za sušenje te osigurava brzo sušenje kapljice u dodiru s vrućim zrakom. Komora za sušenje najveći je dio uređaja i izdužena je, tako da se kapljice mogu dovoljno dugo zadržati u struji zagrijanog medija za sušenje, a vlaga efikasno ukloniti. Prilikom isparavanja otapala dolazi do prijenosa topline s vrućeg zraka na kapljicu, te prijenosa mase otapala s kapljice u medij za sušenje (Masters, 1985). Prijenos topline i mase ovisi o temperaturi, vlažnosti medija za sušenje, relativnoj brzini gibanja kapljica i medija za sušenje te promjeru kapljice. Zbog isparavanja otapala s površine čestice stvara se koncentracijski gradijent koji potiče difuziju otopljenih tvari u unutrašnjost mikročestice. Budući da proces sušenja, odnosno isparavanja, troši toplinu, izlazna temperatura medija za sušenje uvijek je niža od ulazne, a ujedno je i maksimalna temperatura suhog produkta, pa je stoga ova metoda pogodna i za sušenje termolabilnih tvari (Dürriegl, 2011).



Slika 8. Prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (*A – tekući uzorak, B – sapnica, C – medij za sušenje, D – komora za sušenje, E – ciklon, F – posuda za skupljanje produkta, G – ispušni ventil*) (prilagođeno prema Sosnik i Seremeta, 2015)

Metoda sušenja raspršivanjem omogućuje pripremu čestica željene veličine, oblika, poroznosti/gustoće te profila oslobađanja uklopljenog lijeka. Za proizvodnju prašaka željenih ili prikladnih svojstava, potrebno je optimirati procesne i formulacijske parametre koji su navedeni u Tablici 3. (Focaroli i sur., 2018).

Tablica 3. Procesni i formulacijski parametri sušenja raspršivanjem (prilagođeno prema Focaroli i sur., 2018)

PROCESNI PARAMETRI	FORMULACIJSKI PARAMETRI
ulazna temperatura	sastav uzorka
vlažnost medija za sušenje	koncentracija/zasićenost uzorka
protok medija za sušenje	vrsta otapala
brzina protoka uzorka	viskoznost tekućeg uzorka
aspirator	površinska napetost tekućeg uzorka

Dizajn eksperimenta (engl. *Design of Experiments*, DoE) često se koristi s ciljem razjašnjavanja kompleksne veze između eksperimentalnih činitelja i odgovora koji se očituju kroz karakterizaciju produkta (Ziaee i sur., 2018). Karakterizacija dobivenog produkta uključuje određivanje veličine čestica, morfoloških osobina, kompatibilnosti sastavnica praška, poroznosti, gustoće, sadržaja vlage te samog iskorištenja procesa sušenja, odnosno prinosa (Fontana i sur., 2013).

PARAMETAR	ASPIRATOR	VLAŽNOST MEDIJA ZA SUŠENJE	ULAZNA TEMPERATURA	PROTOK KOMPRESIRANOG ZRAKA	BRZINA DOTOKA UZORKA	VISKOZNOST UZORKA	ORGANSKO OTAPALO UMJESTO VODE
OVISNOST	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
IZLAZNA TEMPERATURA	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑
VELIČINA ČESTICA	—	—	—	↓	↑	↑	↓
VLAŽNOST KONAČNOG PRODUKTA	↓	↑	↓	—	↑	↓	↓
% PRINOS	↑	↓	↑	—	↓↑	↑	↑

LEGENDA	↑	VISOK UTJECAJ	↑	POVEĆANJE PARAMETRA
	↑	UMJEREN UTJECAJ	↑	POVEĆANJE VARIJABLE
	↑	NIZAK UTJECAJ	↓	SMANJENJE VARIJABLE
	—	BEZ UTJECAJA		

Slika 9. Utjecaj formulacijskih i procesnih parametara na proces sušenja i svojstva produkta (prilagođeno prema Behera i sur., 2010)

Slika 9. prikazuje utjecaj različitih formulacijskih i procesnih parametara sušenja raspršivanjem na svojstva dobivenog produkta. Primjerice veća razlika između ulazne i izlazne temperature rezultirat će većom vlažnošću produkta. Što je veća koncentracija tekućeg

uzorka bit će veća i veličina dobivenih čestica. Brži dotok uzorka u sapnicu smanjit će izlaznu temperaturu jer će se toplina trošiti na sušenje većeg volumena uzorka u jedinici vremena. Brži protok medija za sušenje ostavlja manje vremena uzorku za sušenje u komori, stoga se očekuje veća vlažnost produkta, ali i veće iskorištenje uslijed razvijanja veće centrifugalne sile i efikasnijeg odvajanja produkta u ciklonu.

Bolje razumijevanje veze procesnih/formulacijskih parametara i svojstava suhog produkta omogućava lakšu prilagodbu parametara za postizanje željenih ishoda (Vicente i sur., 2013). Danas su razvijeni razni matematički modeli koji nude predvidljive pristupe procesu sušenja raspršivanjem čime se štedi vrijeme optimizacije procesa sušenja, smanjuje broj ponavljanja procesa i smanjuju materijalni troškovi (Fontana i sur., 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena kortikosteroida široko je zastupljena u liječenju upalnih oboljenja sluznice nosa poput alergijskog i nealergijskog rinitisa, kroničnog rinosinuitisa i nosne polipoze. Kortikosteroidi smanjuju upalu i hiperreaktivnost nazalne sluznice te stopu nastanka i vraćanja nazalnih polipa (Fokkens i sur., 2012). Farmaceutski oblici i uređaji za nazalnu primjenu osiguravaju precizno doziranje kortikosteroida u nosnu šupljinu. Lokalnom primjenom lijeka (na nosnu sluznicu) terapijski učinak postiže se pri manjoj dozi lijeka čime se smanjuje mogućnost nuspojava i predoziranja. Usto, nazalni put primjene lijeka je neinvazivan, praktičan i prikladan za samoliječenje (Hafner i sur., 2014).

Kao jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika nazalne primjene lijekova prepoznat je mukocilijarni klirens koji u vremenskom intervalu od 30 minuta potpuno ukloni primijenjeni lijek iz nosne šupljine (Baumann i sur., 2011). Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj tekućih i praškastih farmaceutskih oblika temeljenih na mukoadhezivnim polimerima koji omogućuju nastanak mukoadhezivnog gela na mjestu primjene, produljeno zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini i prilagođeni profil oslobađanja (Buttini i sur., 2012; Tioso Fasiolo i sur., 2018; Nižić i sur., 2019). Praškasti oblici karakterizirani su nizom prednosti u odnosu na tekuće oblike budući da omogućuju dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici i veću koncentraciju djelatne tvari na mjestu depozicije. Usto, prašci su stabilniji od tekućih oblika, a manja je i potreba za dodatkom pomoćnih tvari pri njihovom oblikovanju (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Polimerne mikrosfere predstavljaju praškasti terapijski sustav velikog potencijala za poboljšanje terapijske učinkovitosti nazalno primijenjenog lijeka. Djeluju kao učinkoviti nosač uklopljenog lijeka s obzirom na njihov veliki omjer površine prema volumenu, mukoadhezivnost i kontrolirani profil oslobađanja uklopljenog lijeka (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Polimeri koji grade mukoadhezivne mikrosfere za nazalnu primjenu biorazgradljivi su i biokompatibilni, te osiguravaju bubrenje mikrosfera u doticaju s nosnim fluidom pri čemu nastaje gel iz kojeg se lijek oslobađa difuzijom (Hafner i sur., 2013).

Sušenje raspršivanjem predstavlja jednu od najčešće korištenih metoda u izradi polimernih mikrosfera s obzirom na jednostavnost provedbe i uvećanja na industrijsko mjerilo. Metoda sušenja raspršivanjem omogućuje pripravu polimernih mikrosfera željene veličine, oblika, poroznosti/gustoće te profila oslobađanja uklopljenog lijeka (Focaroli i sur., 2018).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost primjene pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom namijenjenih za nazalnu primjenu, te ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na fizičko-kemijska svojstva mikrosfera.

Specifični ciljevi:

- Priprava mikrosfera temeljenih na pektinu i hipromelozi s uklopljenim flutikazonpropionatom metodom sušenja raspršivanjem
- Ispitivanje utjecaja masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu mikrosfera na:
 - Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem
 - veličinu mikrosfera
 - uspješnost uklapanja/sadržaj flutikazonpropionata
 - svojstva bubrenja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći materijali:

- flutikazonpropionat (CarbosynthLtd., UK)
- pektin (PectinAmidCF 005, Herbstreith& Fox, Njemačka)
- hipromeloza (Metolose, Shin-Etsu Chemical Co., Ltd, Japan)
- umjetni nazalni fluid (engl. *Simulated nasal fluid*, SNF).

Za izradu mikrosfera korišten je niskometoksilirani amidirani pektin CF 005 (stupanj esterifikacije 35%; stupanj amidacije 15%; Herbstreith & Fox, Njemačka).

SNF je pripremljen otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) u koncentraciji od 40 mM i $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u koncentraciji od 5,3 mM, u pročišćenoj vodi. Korišten je kao medij pri ispitivanju bubrenja mikrosfera.

3.2. METODE

3.2.1. ODREĐIVANJE KRIVULJE VISKOZNOSTI POLIMERNIH OTOPINA

Određene su krivulje viskoznosti otopina pektina te pektina i hipromeloze u pročišćenoj vodi, te u smjesi pročišćene vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V), pri (ukupnoj) koncentraciji polimera od 0,1% (m/V). Mjerenje je rađeno na reometru MCR 102 (Anton Paar, Austrija) pri sobnoj temperaturi (25°C). Korišteno je mjerno tijelo mjerni stožac, nagiba 1° (CP50-1). Udaljenost od donje ploče bila je 0,102 mm. Mjerena je ovisnost viskoznosti sustava (η , mPa s) o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) u području od 0,1 do 100 s⁻¹.

3.2.2. PRIPRAVA OTOPINA POLIMERA I LIJEKA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Uzorci za sušenje raspršivanjem ukupnog volumena 200 ml pripremljeni su miješanjem vodenih otopina pektina i hipromeloze i etanolne otopine flutikazonpropionata. Omjer vodene faze i etanola bio je 1:1 (V/V). Pektin je otopljen u pročišćenoj vodi pri koncentraciji od 0,4%

(*m/V*) uz 24-satno miješanje na magnetskoj miješalici. Otopina pektina prije upotrebe je filtrirana. Otopina hipromeloze pri koncentraciji od 0,4% (*m/V*) priređena je otapanjem krutine u vodi zagrijanoj na 80- 90°C i miješanjem na magnetskoj miješalici 24 sata. Kako bi se dobila potpuno bistra otopina, smjesa je ostavljena pri 4°C još 24 sata. Flutikazonpropionat otopljen je u maloj količini etanola te je potom podvrgnut soniciranju 3-5 minuta. Nakon toga dodan je cijeli volumen etanola potreban za izradu uzorka. Pripravljena je smjesa polimernih otopina s masenim omjerom pektina i hipromeloze od 1:0, 2:1, 1:1 i 1:2. Smjesa polimernih otopina razrijeđena je vodom prema potrebi i pomiješana s etanolnom otopinom flutikazonpropionata u volumnom omjeru 1:1. Flutikazonpropionat je u uzorcima namijenjenim sušenju raspršivanjem bio u koncentraciji od 0,002% (*m/V*). Ukupna koncentracija polimera u uzorcima iznosila je 0,1% (*m/V*). Mikrosfere bez flutikazonpropionata pripravljene su sušenjem raspršivanjem otopina izrađenih po istom protokolu, ali uz izostavljanje flutikazonpropionata.

3.2.3. PRIPRAVA MIKROSFERA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Tekući uzorak preveden je u praškasti produkt sušenjem raspršivanjem korištenjem uređaja Büchi 190 Mini SprayDryer (Flawil, Švicarska) s bifluidnom sapnicom promjera 0,7 mm te zrakom kao medijem za sušenje. Brzina dotoka tekućeg uzorka u sapnicu bila je 1,33 ml/ min. Protok komprimiranog zraka bio je 700NL/h. Aspirator je radio na 50% kapaciteta. Ulazna temperatura bila je unutar intervala od 135 do 140°C, a izlazna temperatura, odnosno temperatura produkta, iznosila je 85- 87°C. Parametri sušenja raspršivanjem prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. *Parametri pri kojima se odvijao postupak sušenja raspršivanjem*

PARAMETAR	IZNOS
ulazna temperatura	135-140°C
brzina dotoka uzorka	1,33 mL/min
protok medija za sušenje	700 NL/h
kapacitet aspiratora	50%
izlazna temperatura	85-87°C
koncentracija polimera	0,1% (<i>m/V</i>)

3.2.4. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem (I) određeno je prema sljedećoj formuli:

$$I = \frac{\text{masa dobivenog produkta (g)}}{\text{masa krute tvari u raspršivanoj otopini (g)}} \times 100\%$$

Za dobivanje iskorištenja procesa uzeti su masa dobivenog suhog produkta nakon sušenja raspršivanjem i masa krute tvari u raspršivanoj otopini.

3.2.5. ODREĐIVANJE VELIČINE MIKROSFERA

Srednji promjer mikrosfera dobivenih sušenjem raspršivanjem određen je korištenjem mikroskopa Olympus BH-2 spregnutog s kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan). Obrada slike rađena je računalmim programom Optomax V (Cambridge, Velika Britanija). Za svaki uzorak izmjereno je najmanje 3000 čestica. Svaki uzorak mjeran je u triplikatu. Uzorci za analizu pripremljeni su nanošenjem male količine praškastih produkata na predmetno stakalce u tankom sloju.

3.2.6. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI UKLAPANJA I SADRŽAJA LIJEKA U MIKROSFERAMA

Sadržaj lijeka u uzorcima određen je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 236 nm. Za potrebe mjerenja korišten je UV-Vis spektrofotometar (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD). Apsorbancija za svaki uzorak mjerena je u triplikatu. Za računanje koncentracije uzeta je srednja vrijednost. Koncentracija je izračunata prema jednadžbi pravca koja je prethodno dobivena iz baždarnog dijagrama. Uzorci za mjerenje pripremljeni su na način da je izvagano 10 mg praškastog produkta u odmjernu tikvicu od 25 ml koja je potom nadopunjena smjesom vode i etanola u omjeru 9:1 (V/V). Tako pripremljeni uzorci stavljeni su na magnetsku miješalicu 30 minuta, potom sonicirani 3-5 minuta te nakon toga centrifugirani 5 minuta pritemperaturi od 25°C i pri 4400 okretaja po minuti. Apsorbancija supernatanta mjerena je na spektrofotometru.

Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka provedeno je prema sljedećoj formuli:

$$EE (\%) = \frac{\text{stvarni sadržaj lijeka (mg)}}{\text{terorijski sadržaj lijeka (mg)}} \times 100$$

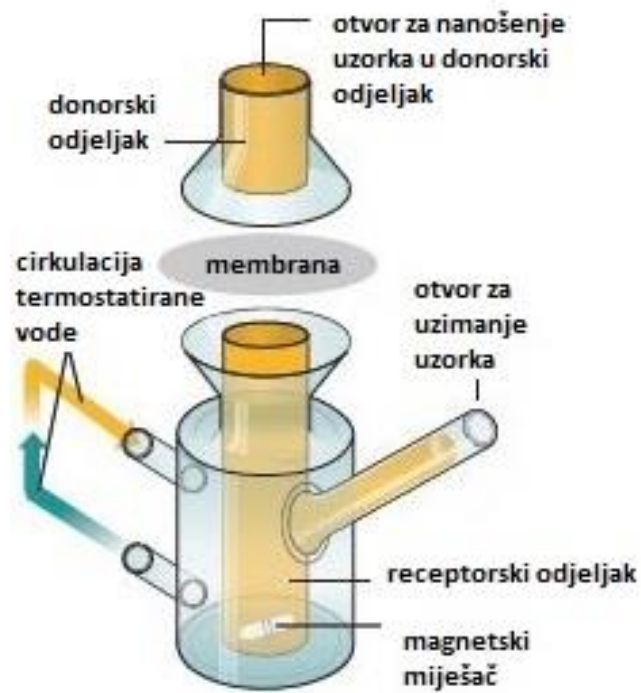
Sadržaj lijeka (engl. *drug loading*, DL) u mikrosferama izračunat je kako slijedi:

$$DL (\%) = \frac{\text{masa lijeka u mikrosferama (mg)}}{\text{ispitivana masa mikrosfera (mg)}} \times 100$$

3.2.7. ISPITIVANJE BUBRENJA MIKROSFERA

Svojstva bubrenja mikrosfera ispitana su volumetrijskom metodom korištenjem Franzove difuzijske ćelije. Franzova difuzijska ćelija sastoji se od donorskog i receptorskog odjeljka, odijeljenih polupropusnom membranom (Sartolon poliamid, 0,45 μm, Sartorius stedim biotech, Njemačka; Slika 10.).

Uzorak suhog praška odvage 10 mg precizno je nanesen na membranu u donorski odjeljak. Receptorski odjeljak napunjen je SNF-om ili pročišćenom vodom. Sustav je termostatiran pri temperaturi od 34°C pomoću vodene kupelji. Bubrenje čestica očituje se se kao sniženje razine medija za određenu vrijednost volumena u postraničnoj cjevčici za uzorkovanje. U vremenskim intervalima od 3 minute nadomiještan je medij do početne razine u ukupnom vremenu od 15 minuta. Bubrenje mikrosfera izraženo je volumenom SNF-a ili pročišćene vode dodane kroz postraničnu cijev po miligramu mikrosfera tijekom 15-minutnog procesa bubrenja.



Slika 10. Franzova difuzijska ćelija (prilagođeno prema www.particlesciences.com)

4. REZULTATI I RASPRAVA

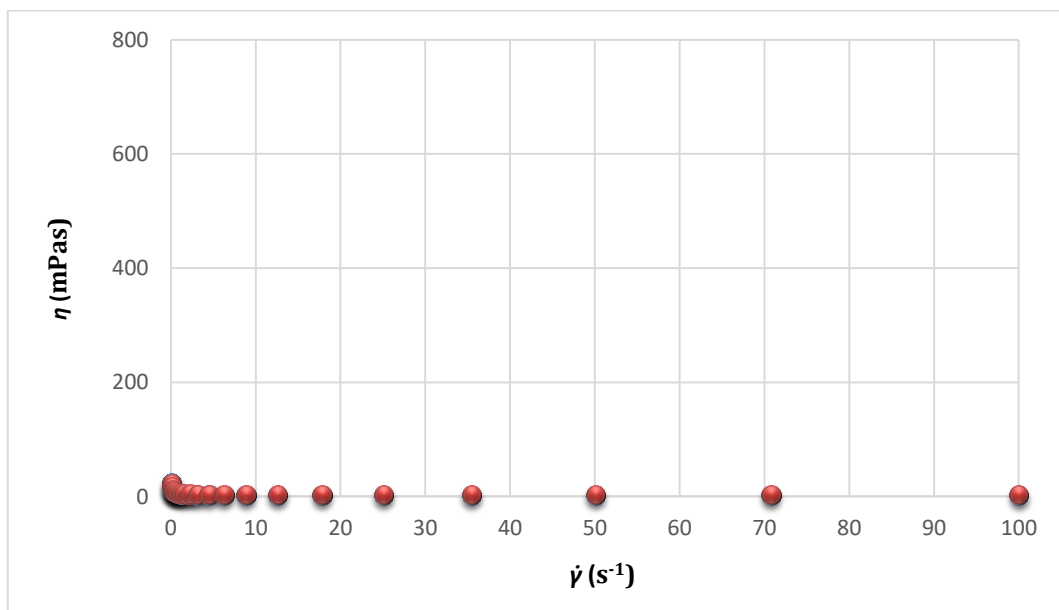
Sušenje raspršivanjem je učinkovita tehnika uklapanja malih molekula lijeka slabe topljivosti u praškaste mikročestične nosače (Poozesh i sur., 2017). Za pripremu polimernih mikrosfera s uklopljenim lijekom, upravo je pogodno sušenje raspršivanjem kao jednostavna i reproducibilna metoda kojom se može postići zadovoljavajući prinos. Proces uključuje raspršivanje tekućeg uzorka i njegovo sušenje te na kraju odvajanje suhog produkta iz struje medija za sušenje (Dürriegl, 2011). Metoda je pogodna za dobivanje mikročestica poželjnih svojstava prikladnih za određeni put primjene i ostvarivanje željenog terapijskog učinka. Na svojstva konačnog produkta uvelike utječu formulacijski i procesni parametri (Tablica 3.; Vicente i sur., 2013). Optimiranjem pojedinih parametara može se postići ciljana veličina i morfologija čestica, te odgovarajući sadržaj vlage u produktu (Focaroli i sur., 2018).

4.1. REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH OTOPINA

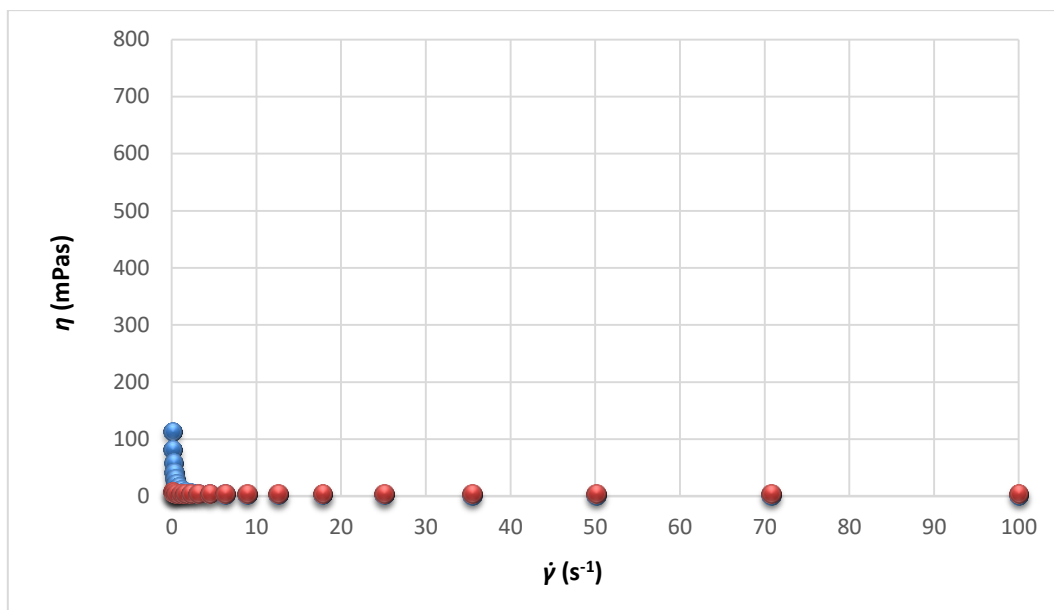
Važnu ulogu pri optimiranju procesa sušenja raspršivanjem predstavljaju svojstva raspršivane otopine. Naime, koncentracija otopljenih tvari u otapalu značajno utječe na proces sušenja te morfološka svojstva i strukturu suhe čestice. Nadalje, koncentracija polimera u otopini i odabir otapala utječu na viskoznost polimerne otopine. Viskoznije otopine sporije dotiču prema sapnici uređaja za sušenje raspršivanjem i raspršuju se u veće kapljice pri istim postavkama procesa sušenja raspršivanjem, odnosno pri istim postavkama peristaltičke pumpe i protoka komprimiranog zraka na sapnici (Cal i Sollohub, 2009; Anandharamakrishnan i Ishwarya, 2015).

Cilj ovog rada uključuje pripremu mikrosfera temeljenih na pektinu i hipromelozi s uklopljenim lipofilnim lijekom flutikazonpropionatom. U svrhu pripreme jedinstvene otopine svih navedenih komponenti potrebno je uvesti nevodeno otapalo u prikladnom omjeru prema vodi. Time se osigurava otapanje lipofilnog lijeka te izbjegava taloženje vodotopljivih polimera. Kao potencijalno odgovarajuća smjesa otapala za izradu otopine polimera i lijeka u ovom radu odabrana je smjesa vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V). Kako bi se promotrio utjecaj etanola u otopinama za sušenje raspršivanjem na njihova reološka svojstva, određene su krivulje viskoznosti polimernih otopina pri ukupnoj koncentraciji polimera od 0,1% (m/V) u pročišćenoj vodi, te u smjesi pročišćene vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V). Slike (11.-14.) prikazuju ovisnost viskoznosti otopina (η , mPa s) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$) u području od 0,1 do

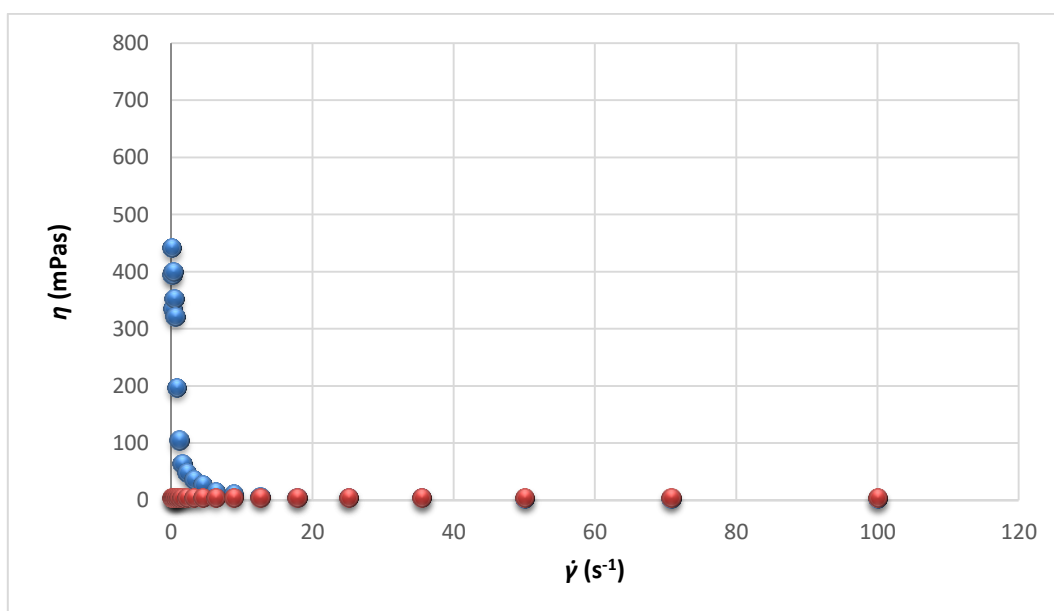
100 s⁻¹. Krivulje viskoznosti otopina pektina (0,1%, m/V) u pročišćenoj vodi i smjesi vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V) pokazuju svojstva idealnih sustava kod kojih se viskoznost ne mijenja s promjenom brzine smicanja. Početna viskoznost vodenih otopina pektina i hipromeloze rasla je s porastom sadržaja hipromeloze (Slike 12.-14.). Otopine pektina i hipromeloze u pročišćenoj vodi ponašaju se kao pseudoplastični sustavi s obzirom da im se viskoznost smanjuje s porastom brzine smicanja. Uočeno ponašanje može se objasniti otpetljavanjem isprepletenih polimernih molekula s porastom brzine smicanja te njihovim orijentiranjem u smjeru tečenja fluida (Zečević, 2018). Otopine pektina i hipromeloze u smjesi vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V) ponašale su se kao idealni sustavi. Viskoznosti svih pripremljenih otopina pri brzini smicanja od 100 s⁻¹ nisu se značajnije razlikovale. S obzirom da su sustavi pri atomizaciji na sapnici u procesu sušenja raspršivanjem izloženi značajno većem smičnom naprežanju (brzina smicanja >10⁵ s⁻¹), ne očekuje se značajni utjecaj sadržaja otapala na viskoznost raspršivanih sustava.



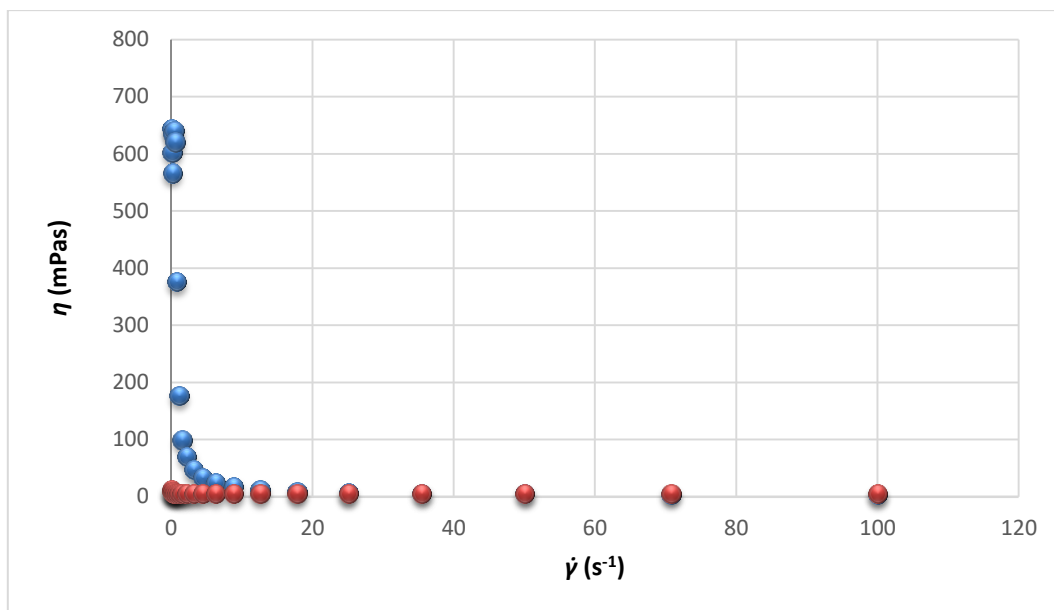
Slika 11. Ovisnost viskoznosti (η , mPa s) otopine pektina (0,1%, m/V) u pročišćenoj vodi (●) i smjesi pročišćene vode i etanola (1:1, V/V; ●) o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$, s⁻¹).



Slika 12. Ovisnost viskoznosti (η , mPa s) otopine pektina i hipromeloze (2:1, m/m; ukupna koncentracija polimera 0,1%, m/V) u pročišćenju vodi (●) i smjesi pročišćene vode i etanola (1:1, V/V; ●) o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$; s^{-1}).



Slika 13. Ovisnost viskoznosti (η , mPa s) otopine pektina i hipromeloze (1:1, m/m; ukupna koncentracija polimera 0,1%, m/V) u pročišćenju vodi (●) i smjesi pročišćene vode i etanola (1:1, V/V; ●) o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$; s^{-1}).



Slika 14. Ovisnost viskoznosti (η , mPa s) otopine pektina i hipromeloze (1:2, m/m; ukupna koncentracija polimera 0,1%, m/V) u pročišćenju vodi (●) i smjesi pročišćene vode i etanola (1:1, V/V; ●) o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$; s⁻¹).

4.2. PRIPREMA MIKROSFERA

U ovom radu mikrosfere su pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina flutikazonpropionata i polimera (pektina i/ili hipromeloze) u smjesi etanola i pročišćene vode u omjeru 1:1 (V/V). Raspršivane otopine razlikovale su se u masenom omjeru otopljenih polimera. Na taj način pripravljena su četiri uzorka mikrosfera s flutikazonpropionatom masenih omjera pektina i hipromeloze redom od 1:0, 2:1, 1:1, 1:2 (Tablica 5.). Na isti način pripravljene su i odgovarajuće prazne mikrosfere izostavljajući flutikazonpropionat iz postupka priprave. Cilj je bio ispitati utjecaj masenog omjera polimera u formulaciji na iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem, veličinu mikrosfera, uspješnost uklapanja/sadržaj lijeka u mikrosferama, te profil bubrenja.

Mikrosfere s flutikazonpropionatom pripravljene su pomoću uređaja Büchi 190 Mini Spray Dryer (Flawil, Švicarska). Postavljeni procesni parametri rezultirali su temperaturom izlaznog zraka 85 do 87°C (Tablica 3.) te osigurali odgovarajuće sušenje raspršenih kapljica odnosno nastajanje suhog produkta.

4.3. ISKORIŠTENJE PROCESA

Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem pripremljenih otopina lijeka i polimera u smjesi etanola i vode pri omjeru 1:1 (V/V) kretalo se u intervalu od $30,1 \pm 3,4\%$ do $40,7 \pm 0,9\%$ (Tablica 5.). Jurišić Dukovski i suradnici (2019) razvili su pektinske mikrosfere za nazalnu primjenu deksametazona sušenjem raspršivanjem pomoću uređaja Mini Spray Dryer Büchi 190 pri sljedećim uvjetima: brzina dotoka uzorka $0,25\text{L/h}$, protok komprimiranog zraka 700NL/h , kapacitet aspiratora 50%, ulazna i izlazna temperatura 135°C i 85°C , a koncentracija pektina $0,5\%$ (m/V). Iskorištenje procesa bilo je prilično veliko 45-70% i ovisilo je o volumenu raspršivanog uzorka (100-800 mL). Manja iskorištenja u ovom radu mogu se pripisati manjoj koncentraciji polimera ($0,1\%$, m/V) u raspršivanim otopinama i manjoj teorijskoj masi produkta. Giunchedi i suradnici (1999) pripravili su pektinske mikrosfere s piroksikamom s iskorištenjem od 41-46%, a Mahajan i suradnici (2012) pripremili su pektinske mikrosfere uz niže vrijednosti iskorištenja. Općenito iskorištenja postupka rijetko su veća od 50-60% (Walters i sur., 2014). To je prvenstveno posljedica zaostajanja čestica na aparaturi tijekom sušenja, najvećim dijelom na ciklonu gdje su prisutne jake centrifugalne sile, te neučinkovitog skupljanja praškastog produkta koji ostane zalijepljen na stijenkama posude nakon postupka sušenja (Pavanetto i sur., 1992). Osim korištenja učinkovitijih ciklona, povećanje iskorištenja moguće je postići optimiranjem procesnih parametara. Amaro i suradnici (2011) primijetili su da je veći prinos procesa postignut smanjenim protokom komprimiranog zraka, te ostao nepromijenjen s obzirom na ulaznu i izlaznu temperaturu. Također je uočeno da koncentracija uzorka ima veći utjecaj na iskorištenje procesa od protoka komprimiranog zraka (Prinn i sur., 2002; Maltesen i sur., 2008). Veća koncentracija uzorka rezultira većim prinosom. Povišenjem ulazne temperature smanjuje se vlažnost medija za sušenje, manje otapala zaostaje u česticama te je i njihovo zaostajanje na opremi manje (Ziaee i sur., 2018; Maury i sur., 2005).

Tablica 5. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem i srednji promjer pripremljenih mikrosfera

Uzorak	Pektin/hipromeloza (m/m)	Iskorištenje procesa (%)	Srednji promjer (μm)
FP	1:0	35,6 \pm 3,1 (37,7 \pm 2,7)	1,7 \pm 0,2 (2,3 \pm 0,1)
FPH1	2:1	38,7 \pm 1,6 (39,2 \pm 0,9)	1,8 \pm 0,2 (1,6 \pm 0,1)
FPH2	1:1	34,0 \pm 2,5 (40,7 \pm 0,9)	1,6 \pm 0,1 (1,7 \pm 0,2)
FPH3	1:2	36,1 \pm 3,9 (30,1 \pm 3,4)	2,6 \pm 0,4 (3,0 \pm 0,0)

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n=3)

Vrijednosti u zagradama odnose se na odgovarajuće prazne mikrosfere.

4.4. VELIČINA ČESTICA

Veličina čestica važno je svojstvo terapijskih sustava za nazalnu primjenu budući da izravno utječe na profil depozicije i terapijski učinak lijeka u nosnoj šupljini (Patel i sur., 2015). Zahtjev s obzirom na navedeni parametar, a s ciljem osiguranja depozicije u nosnoj šupljini podrazumijeva da je glavnina čestica veća od $> 10 \mu\text{m}$. Istodobno, za mukoadhezivne čestice za nazalnu primjenu preferira se što veća ukupna površina kako bi se ostvario bolji kontakt s nosnom sluznicom (Hagesaether i sur., 2008). Mala veličina čestica i velika površina osiguravaju i prikladni profil oslobađanja lijeka.

U ovom radu veličina mikrosfera određena je nakon nanošenja i raspoređivanja male količine praškastog produkta na predmetno stakalce, mikroskopskom analizom pomoću mikroskopa spregnutog s kamerom. Obrada slike dobivena je računalnim programom. Za svaki uzorak mjereno je najmanje 3000 čestica. Svi uzorci mjereni su u triplikatu. Srednji promjeri mikrosfera s flutikazonpropionatom kretali su se u intervalu od 1,6 \pm 0,1 μm do 2,6 \pm 0,4 μm . Veličina pripremljenih mikrosfera odgovarala je veličini pektinskih mikrosfera za

nazalnu primjenu ($2,17 \mu\text{m}$, Jurišić Dukovski i sur., 2019) određenoj istim uređajem i pri gotovo istim uvjetima.

Veličina čestica produkta sušenja raspršivanjem funkcija je brojnih procesnih i formulacijskih parametara koje je potrebno optimirati s ciljem pripreme produkta željenih svojstava. Esposito i suradnici (2005) ustanovili su međuovisnost brzine dotoka uzorka i veličine osušenih čestica. Vrsta/učinkovitost atomizatora također uvelike utječe na veličinu čestica suhog produkta (Patel i sur., 2015). Kod smanjenog protoka komprimiranog zraka, smanjena je atomizacijska energija raspoloživa za raspršivanje čestica što rezultira generiranjem većih kapljica i posljedično većih čestica suhog produkta (Stahl i sur., 2002). Thybo i suradnici (2008) primijetili su da povećani protok komprimiranog zraka i smanjena brzina dotoka uzorka rezultiraju smanjenjem veličine čestica suhog produkta. Velik broj radova ukazuje da se sa smanjenjem protoka komprimiranog zraka i povećanjem koncentracije raspršivanog uzorka generiraju čestice većeg promjera (Stahl i sur., 2002; Al-Asheh i sur., 2003; Tajber i sur., 2009).

Iako su mikrosfere pripravljene u ovom radu manje od ciljnog promjera, takve čestice spontano aglomeriraju zbog velikog omjera površine prema volumenu te mogu osigurati adekvatnu depoziciju nosnoj šupljini (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

4.5. USPJEŠNOST UKLAPANJA I SADRŽAJ LIJEKA U MIKROSFERAMA

Uspješnost ukapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama prikazani su u Tablici 6. Metoda sušenja raspršivanjem pokazala se prikladnom za uklapanje flutikazonpropionata u mikrosfere pripravljene iz pektina i hipromeloze. Naime, postignute su visoke uspješnosti uklapanja lijeka ($90,3-102,8\%$. Tablica 6.). Sadržaj lijeka u mikrosferama iznosio je $1,8-2,1\%$. Jurišić Dukovski i suradnici (2019) metodom sušenja raspršivanjem pripravili su pektinske mikrosfere s uklopljenim deksametazonom. Sadržaj deksametazona u pektinskim mikrosferama iznosio je $3,8 \pm 0,9\%$ što je dovoljno za nazalnu primjenu deksametazona u terapijskoj dozi u obliku suhog praška. S obzirom da je flutikazonpropionat potentniji od deksametazona (Padrid i Church, 2008) i da se primjenjuje u manjoj dozi, sadržaj flutikazonpropionata u mikrosferama odgovara njegovoj potencijalnoj primjeni. Giunchedi i suradnici (1999) razvili su pektinske mikrosfere s piroksikamom također dobivene sušenjem raspršivanjem te je sadržaj uklopljenog lijeka bio blizu teorijske vrijednosti ($97-100\%$). Mahajan i suradnici (2012) priredili su pektinske mikrosfere s ondasetronom za nazalnu primjenu s dobivenim sadržajem lijeka od 23 do 29%. Uspješnost uklapanja za isti proces

iznosio je iznad 80% te su prepostavili da je viši što je veći sadržaj polimera budući da ga je više dostupno za kapsuliranje lijeka.

Tablica 6. Postotak sadržaja i uklapanja flutikazonpropionata u mikrosfere

Uzorak	Pektin/hipromeloza (m/m)	EE (%)	DL (%)
FP	1:0	98,0±6,0	2,0±0,2
FPH1	2:1	102,8±6,2	2,1±0,2
FPH2	1:1	90,3±8,3	1,8±0,2
FPH3	1:2	100,3±1,7	2,0±0,0

Prikazane su srednje vrijednosti ±SD (n=3)

4.6.SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA

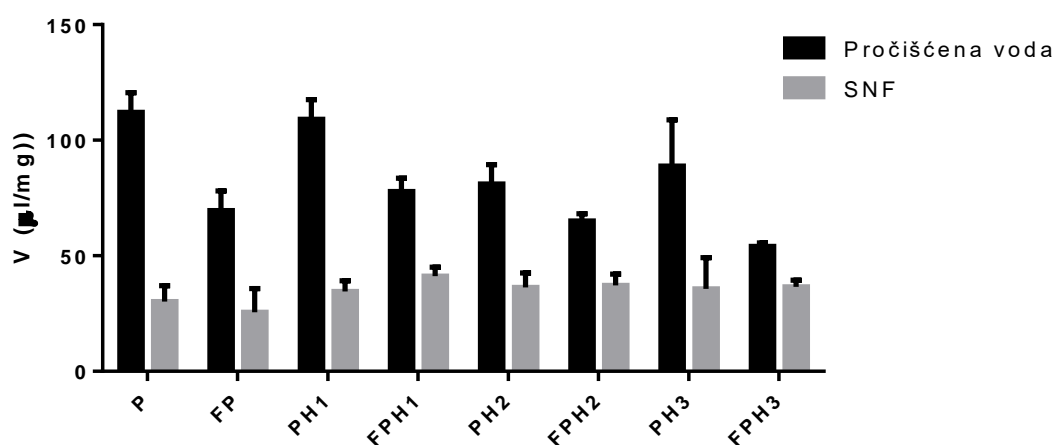
Ključna karakteristika prašaka za nazalnu primjenu je kontrolirano bubrenje i formiranje hidrogela budući da svojstvo bubrenja definira oslobađanje lijeka iz mukoadhezivnog gela (Jurišić Dukovski i sur., 2019; Carbinatto i sur., 2013). Bubrenje se može opisati kao hidracija polimera, odnosno kapacitet apsorpcije vode (Filipović Grčić i Hafner, 2008). Hidrogelovi predstavljaju trodimenzionalnu mrežu hidrofilnih polimera koji se odlikuju sposobnošću vezanja velike količine vode, primjerice poput pektina i hipromeloze, pa tako i velikom fleksibilnošću, sličnoj onoj prirodnoj u tkivima (Carbinatto i sur., 2013; Banerjee i Bhattacharya, 2011). Za postizanje kontrolirane brzine difuzije, tj. oslobađanja djelatne tvari iz polimernog matriksa, kao i za dulje vrijeme zadržavanja gela na mjestu primjene s ciljem veće apsorpcije lijeka, potrebno je umjereno bubrenje mikrosfera. Prejako umreženje polimera rezultirat će smanjenim bubrenjem, odnosno slabijom apsorpcijom vode pa će za razliku od tekućeg gela, stvoriti rigidnu strukturu što bi za posljedicu imalo ne samo slabiju dostavu lijeka na mjesto djelovanja nego i potencijalno štetno djelovanje na nosnu sluznicu (Jurišić Dukovski i sur., 2019; Galgatte i sur., 2013). Kako bi se predvidjelo mukoadhezivno ponašanje mikrosfera *in vivo*, potrebno je procijeniti svojstva bubrenja *in vitro*, primjerice pomoću Franzove difuzijske ćelije gdje je bubrenje izraženo kao volumen apsorbirane vode ili

umjetnog nosnog fluida ili prirast mase izbubrenih mikrosfera (Filipović Grčić i Hafner, 2008).

U ovom radu mikrosfere su pripravljene korištenjem pektina visokog stupnja esterifikacije, a niskog stupnja amidacije. Naime, takav pektin pokazuje selektivnu interakciju s mucinom zbog visoke sposobnosti uspostavljanja vodikovih veza te smanjene osjetljivosti na Ca^{2+} ione koji ograničavaju mobilnost polimernih lanaca i bubrenje mikrosfera (Hagesaether i sur., 2007).

Ispitivanje bubrenja pripremljenih mikrosfera s melatoninom i odgovarajućih praznih mikrosfera mjereno je pomoću Franzove difuzijske ćelije. Tijekom 15-minutnog procesa bubrenja mikrosfera određena je apsorbirana količina vode ili SNF-a što je izraženo volumenom dodanog medija po miligramu mikrosfera. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 15.

Mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Razlog slabijem bubrenju mikrosfera u SNF-u je umrežavanje polimera dvovalentnim kationom Ca^{2+} . Obrnuta proporcionalnost umreženosti polimera i stupnja bubrenja već je opisana u literaturi (Pereswetoff-Morath, 1998). Mahajan i suradnici (2012) ispitali su kapacitet bubrenja pektinskih mikrosfera za nazalnu primjenu u fosfatnom puferu pH 6,6 i uočili da je kapacitet bubrenja mikrosfera rastao s porastom sadržaja pektina u uzorku.



Slika 15. Bubrenje mikrosfera u pročišćenju vodi i SNF-u. Burenje je izraženo volumenom fluida apsorbiranom po miligramu mikrosfera u 15-minutnom bubrenju. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n=3$).

Pri bubrenju mikrosfera u SNF-u nije uočen značajan utjecaj polimernog sastava mikrosfera na volumen apsorbiranog fluida. Istodobno, uočen je negativni utjecaj uklopljenog lijeka na opseg bubrenja mikrosfera. Navedeno zapažanje može se djelomično objasniti manjim sadržajem polimera u mikrosferama s uklopljenim lijekom u odnosu na sadržaj polimera u praznim mikrosferama, no glavnim uzrokom smanjenog bubrenja mikrosfera s flutikazonpropionatom smatra se povećanje hidrofobnosti matriksa mikrosfera uslijed uklapanja lipofilnog lijeka. Slična zapažanja objavljena su već u literaturi (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

Bubrenje mikrosfera čimbenik je koji značajno utječe na profil oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa te predstavlja polaznu točku u daljnjoj karakterizaciji mikrosfera s flutikazonpropionatom i procjeni njihovog terapijskog potencijala.

5. ZAKLJUČCI

- Reološkom karakterizacijom utvrđeno je da su se otopine pektina te pektina i hipromeloze (pri ukupnoj koncentraciji polimera od 0,1%, m/V) u smjesi vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V) ponašale kao idealni sustavi. Navedena smjesa otapala pokazala se prikladnom za izradu sustava sušenih raspršivanjem.
- Mikrosfere s flutikazonpropionatom masenog omjera pektina i hipromeloze od 1:0, 2:1, 1:1 i 1:2 uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem smjese otopina flutikazonpropionata (pri koncentraciji 0,002%, m/V) i polimera (pri ukupnoj koncentraciji od 0,1%, m/V).
- Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se između $30,1 \pm 3,4\%$ i $40,7 \pm 0,9\%$.
- Srednji promjeri mikrosfera s flutikazonpropionatom kretali su se u intervalu od $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ do $2,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Najveći srednji promjer zabilježen je kod mikrosfera s najvećim sadržajem hipromeloze.
- Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka rezultirajući sadržajem lijeka blizu teorijske vrijednosti ($2,0\%$, m/m).
- U procesu burenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom.
- Pri bubrenju mikrosfera u SNF-u nije uočen značajan utjecaj polimernog sastava mikrosfera na volumen apsorbiranog fluida, dok je uklapanje lijeka negativno utjecalo na opseg bubrenja.
- Daljnja procjena terapijskog potencijala razvijenih mikrosfera uključivat će ispitivanje profila oslobađanja flutikazonpropionata *in vitro*.

6. LITERATURA

Al-Asheh S, Jumah R, Banat F, Hammad S. Variables on the production of tomato powder. *Food Bioprod Process*, 2003, 81, 81-88.

Amaro MI, Tajben L, Corrigan OI, Healy AM. Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMPs) intended for inhalation. *Int J Pharm*, 2011, 421, 99-109.

Anandharamakrishnan C, Ishwarya, PS. Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, str. 1-32.

Banerjee S, Bhattacharya S. Food gels: gelling process and new applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52, 334-346.

Baumann D, Bachert C, Högger P. Development of a novel model for comparative evaluation of intranasal pharmacokinetics and effects of anti-allergic nasal sprays. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80, 156-163.

Behera AL, Sahoo SK, Patil SV. Enhancement of solubility: a pharmaceutical overview. *Der Pharmacia Lettre*, 2010, 2, 310-318.

Behl CR, Pimplaskar HK, Sileno AP, deMeireles J, Romero VD. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 89-116.

Behl CR, Pimplaskar HK, Sileno AP, Xia WJ, Gries WJ, deMeireles JC, Romero VD. Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 117-113.

Bürki K, Jeon I, Arpagaus C, Betz G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *Int J Pharm*, 2011, 408, 248-256.

Buttini F, Colombo P, Rossi A, Sonvico F, Colombo G. Particles and powders: Tools of innovation for non-invasive drug administration. *J Control Release*, 2012, 2, 693-702.

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

Carbinatto FM, Castro AD, Evangelista RC, Cury BSF. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian J Pharm*, 2014, 9, 27-34.

Chevrel G, Dessus V. 300 médicaments injectable, Elsevier Masson, 2009, 112-113.

Chowdary KPR, Srinivasa Rao Y. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27, 1717-1724.

Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*, 2007,337, 1–24.

Crim C, Pierre LN, Daley-Yates PT. A review of the pharmacology and pharmacokinetics of inhaled fluticasone propionate and mometasone furoate. *Clin Ther*, 2001, 23, 1339-1354.

Diez E, Meyer K, Bück A, Tsotsas E, Heinrich S. Influence of process conditions on the product properties in continuous fluidized bed spray granulation process. *Chem Eng Res Des*, 2018, 139, 104-115.

Dürriegl M. Preparation of solid dispersions for controlled drug release via spray drying, doktorski rad, 2011.

Espefält Westin U. Olfactory Transfer of Analgesic Drugs After Nasal Administration. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 55, 64.

Filipović- Grčić J, Hafner A. Nasal powder drug delivery. U: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Gad, SH, urednik, New Jersey, John Wiley and Sons, 2008, str. 651-681.

Focaroli S, Mah PT, Hastedt JE, Gitlin I, Oscarson S, Fahy JV, Healy AM. A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *Int J Pharm*, 2019, 562, 228-240.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, i sur. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl*, 2012, 23, 1-298.

Fontana MC, Durli TL, Pohlmann AR, Guterres SS, Carlos R, Beck R. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: One-step preparation and in vitro lung deposition. *Powder Technol*, 2014, 258, 49–59.

Galgatte UP, Kumbhar AB, Chaudhari PD. Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Inform Healthcare*, 2014, 21, 62-73.

Ghori MU, Mahdi MH, Smith AM, Conway BR. Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. *Am J Pharmacol Sci*, 2015, 5, 110-119.

Giunchedi P, Conte U, Chetoni P, Saettone MF. Pectin microspheres as ophtalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 1, 1-7.

Hafner A, Karković Marković A, Ferić N, Filipović-Grčić J. Oslobađanje lijekova iz koloidnih terapijskih sustava in vitro. *Farm glas*, 2013, 69, 603-614.

Hafner A, Škrinjar D, Filipović- Grčić J. Mogućnosti primjene lijekova. *Farm glas*, 2014, 70, 303-322.

Hagesaether E, Bye R, Sande AS. *Ex vivo* mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads. *Int J Pharm*, 2008, 347, 9-15.

Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J, Hafner A. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Dry Technol*, 2019, 37.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology. New York, The McGraw-Hill, 2009, str. 683-686.

Leinders-Zufall T, Ma M. Encyclopedia of Neuroscience. Academic Press, 2009.

Le VNP, Robins E, Flament MP Agglomerate behaviour of fluticasone propionate within dry powder inhaler formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80, 596-603.

Maltesen MJ, Bjerregaard S, Hovgaard L, Havelund S, van de Weert M. Quality by design- Spray drying of insulin intended for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70, 823-838.

Mahajan HS, Tatiya BV, Nerkar PP. Ondasetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: in vitro and in vivo studies. *Powder Technol*, 2012, 221, 168-176.

Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *Int J Pharm*, 2015, 488, 12-19.

Masters K. Spray drying handbook. New York, Halsted Press, 1985.

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

Merkus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Marttin E. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 1998, 29, 13-38.

Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Safundžić Kučuk M, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: development and optimization of nasal deposition. *Int J Pharm*, 2019, 563, 445-456.

Padrid P, Church DB, Maddison JE. Drugs used in the management of respiratory diseases. U: Small Animal Clinical Pharmacology. Maddison J, Page S, Church D, urednici, Saunders Ltd., 2008, str. 458-468.

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

Patel BB, Patel JK, Chakraborty S, Shukla D. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharm J*, 2015, 23, 352-365.

Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations. *Int J Pharm*, 2013, 453, 253-284.

Paulo F, Santos L. Design of experiments for microencapsulation applications: a review. *Mater Sci Eng C*, 2017, 77, 1327-1340.

Pauwels R. Mode of action of corticosteroids in asthma and rhinitis. *Clin Allergy*, 1986, 16, 281-288.

Pereswetoff-Morath L. Microspheres as nasal drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29, 185-194.

Poozesh S, Setiawan N, Arce F, Sundarajan P, Della Rocca J, Rumondor A, Wei D, Wenslow R, Xi H, Zhang S, Stellabott J, Su Y, Moser J, Jules Marsac P. Understanding the process-product-performance interplay of spray dried drug-polymer systems through complete structural and chemical characterization of single spray. *Powder Technol*, 2017, 320, 685-695.

Prinn KB, Costantino HR, Tracy M. Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale. *AAPS Pharm SciTech*, 2002, 3, 1-8.

Rama Chowdary KP, Srinivasa Rao Y. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Biol Pharm Bull*, 2004,27, 1717-1724.

Roje Z, Selimović M, Omero L. Allergic Rhinitis. *Medicus*, 2011, 2, 235-241.

Sažetak opisa svojstava lijekova, <http://www.halmed.hr>

Shaw JR. Pharmacology of fluticasone propionate. *Resp med*, 1994, 88, 5-8.

Stahl K, Claesson M, Lilliehorn P, Linden H, Backstrom K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *Int J Pharm*, 2002, 223, 227-237.

Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites-2. Statistical factorial design and in vitro deposition properties. *Int J Pharm*, 2009, 367, 86-96.

Thybo P, Hovgaard L, Lindelov JS, Scaling up the spray drying process from pilot to production scale using an atomized droplet size criterion. *Pharm Res*, 2008, 25, 1610-1620.

Tiozzo Fasiolo L, Manniello MD, Tratta E, Buttini F, Rossi A, Sonvico F, Bortolotti F, Russo P, Colombo G. Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 113, 2-17.

Vehring R, Foss WR, Lechuga-Ballesteros D. Particle formation in spray drying. *Aerosol Science*, 2007, 38, 728-746.

Vicente J, Pinto J, Menezes J, Gaspar F. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Tech*, 2013, 247, 1-7.

Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu KI, Tsumoto K, Ohtake S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *J Pharm Sci*, 2014, 103, 2673-2695.

Wolfe TR, Bernstone T. Intranasal drug delivery: An alternative to intravenous administration in selected emergency cases. *J Emerg Nurs*, 2004, 30, 141-147.

Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 127, 300-318.

Zečević L. Razvoj *in situ* gelirajućeg pektinskog sustava kao platforme za nazalnu prijetu lijekova, diplomski rad, 2018.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Nazalna primjena kortikosteroida široko je zastupljena u liječenju upalnih oboljenja sluznice nosa. Farmaceutski oblici i uređaji za nazalnu primjenu osiguravaju precizno doziranje kortikosteroida u nosnu šupljinu. Lokalnom primjenom lijeka smanjuje se terapijska doza te mogućnost razvoja nuspojava i predoziranja. Uz navedene prednosti prepoznati su i ograničavajući čimbenici nazalne primjene lijekova poput mukocilijarnog klirensa koji u vremenskom intervalu od 30 minuta potpuno ukloni primijenjeni lijek iz nosne šupljine. Stoga su suvremena istraživanja dijelom usmjerena na razvoj praškastih farmaceutskih oblika poput mikrosfera temeljenih na mukoadhezivnim polimerima koji bubre i omogućuju nastanak mukoadhezivnog gela na mjestu primjene, produljeno zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini i prilagođeni profil oslobađanja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost primjene pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom metodom sušenja raspršivanjem, te ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na fizičko-kemijska svojstva mikrosfera važna za nazalnu primjenu.

Pri razvoju mikrosfera sušenjem otopine lijeka i polimera različite topljivosti ključan je odabir prikladne smjese otapala. Reološkom karakterizacijom utvrđeno je da su se otopine pektina te pektina i hipromeloze u smjesi vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V) pri ukupnoj koncentraciji polimera od 0,1% (m/V) ponašale kao idealni sustavi. Navedena smjesa otapala pokazala se prikladnom za izradu sustava sušenih raspršivanjem. Mikrosfere s flutikazonpropionatom masenog omjera pektina i hipromeloze od 1:0, 2:1, 1:1 i 1:2 uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina flutikazonpropionata (pri koncentraciji 0,002%, m/V) i polimera (pri ukupnoj koncentraciji od 0,1%, m/V). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se između $30,1 \pm 3,4\%$ i $40,7 \pm 0,9\%$. Srednji promjeri mikrosfera s flutikazonpropionatom kretali su se u intervalu od $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ do $2,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Najveći srednji promjer zabilježen je kod mikrosfera s najvećim sadržajem hipromeloze. Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka rezultirajući sadržajem lijeka blizu teorijske vrijednosti (2,0%, m/m). U procesu bubrenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Pri bubrenju mikrosfera u SNF-u nije uočen značajan utjecaj polimernog sastava mikrosfera na volumen apsorbiranog fluida, dok je uklapanje lijeka negativno utjecalo na opseg bubrenja. Daljnja procjena terapijskog potencijala razvijenih mikrosfera uključivat će ispitivanje profila oslobađanja flutikazonpropionata *in vitro*.

Nasal administration of corticosteroids is widely represented in the treatment of inflammatory diseases of nasal mucosa. Nasal pharmaceutical formulations and delivery devices enable precise dosing of corticosteroids into the nasal cavity. Local drug administration ensures reduction of therapeutic dose and risk for side-effects and overdosing. In addition to described advantages, some limiting factors related to nasal drug delivery have been recognized as well, such as mucociliary clearance that in time interval of 30 minutes completely removes the applied drug from the nasal cavity. Therefore, current studies are in part focused on the development of powder drug delivery systems such as microspheres based on mucoadhesive and swellable polymers that enable formation of mucoadhesive gel on the application site, prolonged retention within the nasal cavity and appropriate drug release profile.

The aim of this study was to investigate the applicability of pectin and hypromellose in the preparation of fluticasone propionate loaded microspheres by spray-drying method and to evaluate the influence of pectin to hypromellose weight ratio in the polymeric matrix on physic-chemical properties of microspheres that are important for nasal delivery.

The selection of the appropriate mixture of solvents is crucial in the development of microspheres prepared by spray-drying of solution of drug and polymer(s) differing in solubility. Rheological characterization revealed that solutions of pectin as well as pectin and hypromellose at total polymer concentration of 0.1% (w/v) in water/ethanol mixture (1:1, v/v) showed ideal fluid behavior. The developed solvent mixture was shown to be suitable for the preparation of the spray-drying feeds. Fluticasone propionate loaded microspheres with pectin to hypromellose weight ratio of 1:0, 2:1, 1:1 and 1:2 were successfully prepared by spray drying of solutions of fluticasone propionate (at concentration of 0.002%, w/v) and polymer(s) (at total concentration of 0.1%, w/v). Process yield ranged between $30.1\pm 3.4\%$ and $40.7\pm 0.9\%$. Mean diameters of fluticasone propionate loaded microspheres were in the range from $1.6\pm 0.1\ \mu\text{m}$ to $2.6\pm 0.4\ \mu\text{m}$. The highest mean diameter was observed for the microspheres prepared with the highest content of hypromellose. All microspheres were characterized by high entrapment efficiency resulting in drug loading close to theoretical value (2.0%, w/w). In the swelling process microspheres absorbed significantly lower volume of SNF in comparison to purified water. Polymeric composition of the microspheres showed no significant influence on the volume of absorbed SNF while drug entrapment significantly reduced swelling extent of the microspheres. Further assessment of therapeutic potential of developed microspheres will include *in vitro* evaluation of fluticasone propionate release profile.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Primjenjivost pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom za nazalnu primjenu

Antonia Barišić

SAŽETAK

Nazalna primjena kortikosteroida široko je zastupljena u liječenju upalnih oboljenja sluznice nosa. Farmaceutski oblici i uređaji za nazalnu primjenu osiguravaju precizno doziranje kortikosteroida u nosnu šupljinu. Lokalnom primjenom lijeka smanjuje se terapijska doza te mogućnost razvoja nuspojava i predoziranja. Uz navedene prednosti prepoznati su i ograničavajući čimbenici nazalne primjene lijekova poput mukocilijarnog klirensa koji u vremenskom intervalu od 30 minuta potpuno ukloni primijenjeni lijek iz nosne šupljine. Stoga su suvremena istraživanja dijelom usmjerena na razvoj praškastih farmaceutskih oblika poput mikrosfera temeljenih na mukoadhezivnim polimerima koji bubre i omogućuju nastanak mukoadhezivnog gela na mjestu primjene, produljeno zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini i prilagođeni profil oslobađanja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost primjene pektina i hipromeloze u pripravi mikrosfera s flutikazonpropionatom metodom sušenja raspršivanjem, te ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na fizičko-kemijska svojstva mikrosfera važna za nazalnu primjenu.

Pri razvoju mikrosfera sušenjem otopine lijeka i polimera različite topljivosti ključan je odabir prikladne smjese otapala. Reološkom karakterizacijom utvrđeno je da su se otopine pektina te pektina i hipromeloze u smjesi vode i etanola u omjeru 1:1 (V/V) pri ukupnoj koncentraciji polimera od 0,1% (m/V) ponašale kao idealni sustavi. Navedena smjesa otapala pokazala se prikladnom za izradu sustava sušenih raspršivanjem. Mikrosfere s flutikazonpropionatom masenog omjera pektina i hipromeloze od 1:0, 2:1, 1:1 i 1:2 uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina flutikazonpropionata (pri koncentraciji 0,002%, m/V) i polimera (pri ukupnoj koncentraciji od 0,1%, m/V). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se između 30,1±3,4% i 40,7±0,9%. Srednji promjeri mikrosfera s flutikazonpropionatom kretali su se u intervalu od 1,6±0,1 µm do 2,6±0,4 µm. Najveći srednji promjer zabilježen je kod mikrosfera s najvećim sadržajem hipromeloze. Postignuta je vrlo visoka uspješnost uklapanja lijeka rezultirajući sadržajem lijeka blizu teorijske vrijednosti (2,0%, m/m). U procesu bubrenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Pri bubrenju mikrosfera u SNF-u nije uočen značajan utjecaj polimernog sastava mikrosfera na volumen apsorbiranog fluida, dok je uklapanje lijeka negativno utjecalo na opseg bubrenja. Daljnja procjena terapijskog potencijala razvijenih mikrosfera uključivat će ispitivanje profila oslobađanja flutikazonpropionata *in vitro*.

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

Rad sadrži: 41 stranicu, 15 grafičkih prikaza, 6 tablica i 63 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pektin; Hipromeloza; Flutikazonpropionat; Mikrosfere; Sušenje raspršivanjem; Nazalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Mario Jug, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of pharmaceutical technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

APPLICABILITY OF PECTIN AND HYPROMELLOSE IN THE PREPARATION OF MICROSPHERES FOR FLUTICASONE PROPIONATE NASAL DELIVERY

Antonia Barišić

SUMMARY

Nasal administration of corticosteroids is widely represented in the treatment of inflammatory diseases of nasal mucosa. Nasal pharmaceutical formulations and delivery devices enable precise dosing of corticosteroids into the nasal cavity. Local drug administration ensures reduction of therapeutic dose and risk for side-effects and overdosing. In addition to described advantages, some limiting factors related to nasal drug delivery have been recognized as well, such as mucocilliary clearance that in time interval of 30 minutes completely removes the applied drug from the nasal cavity. Therefore, current studies are in part focused on the development of powder drug delivery systems such as microspheres based on mucoadhesive and swellable polymers that enable formation of mucoadhesive gel on the application site, prolonged retention within the nasal cavity and appropriate drug release profile.

The aim of this study was to investigate the applicability of pectin and hypromellose in the preparation of fluticasone propionate loaded microspheres by spray-drying method and to evaluate the influence of pectin to hypromellose weight ratio in the polymeric matrix on physico-chemical properties of microspheres, important for nasal delivery.

The selection of the appropriate mixture of solvents is crucial in the development of microspheres prepared by spray-drying of solution of drug and polymer(s) differing in solubility. Rheological characterization revealed that solutions of pectin as well as pectin and hypromellose at total polymer concentration of 0.1% (w/v) in water/ethanol mixture (1:1, v/v) showed ideal fluid behavior. The developed solvent mixture was shown to be suitable for the preparation of the spray-drying feeds. Fluticasone propionate loaded microspheres with pectin to hypromellose weight ratio of 1:0, 2:1, 1:1 and 1:2 were successfully prepared by spray drying of solutions of fluticasone propionate (at concentration of 0.002%, w/v) and polymer(s) (at total concentration of 0.1%, w/v). Process yield ranged between 30.1±3.4% and 40.7±0.9%. Mean diameters of fluticasone propionate loaded microspheres were in the range from 1.6±0.1 µm to 2.6±0.4 µm. The highest mean diameter was observed for the microspheres prepared with the highest content of hypromellose. All microspheres were characterized by high entrapment efficiency resulting in drug loading close to theoretical value (2.0%, w/w). In the swelling process microspheres absorbed significantly lower volume of SNF in comparison to purified water. Polymeric composition of the microspheres showed no significant influence on the volume of absorbed SNF while drug entrapment significantly reduced swelling extent of the microspheres. Further assessment of therapeutic potential of developed microspheres will include *in vitro* evaluation of fluticasone propionate release profile.

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

Thesis includes: 41 pages, 15 figures, 6 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pectin; Hypromellose; Fluticasone propionate; Microspheres; Spray drying; Nasal delivery

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mario Jug, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019