

# In vitro karakterizacija polimernih mikrosfera za nazalnu primjenu deksametazona

---

**Ružić, Julia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:428926>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Julia Ružić**

***In vitro* karakterizacija polimernih mikrosfera za  
nazalnu primjenu deksametazona**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, te trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Srdačno zahvaljujem i asistentici Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. na prenesenom znanju, savjetima i pomoći pruženoj u izvođenju eksperimentalnog dijela te zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. NAZALNA PRIMJENA KORTIKOSTEROIDA.....	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja kortikosteroida .....	2
1.1.2. Sigurnost nazalne primjene kortikosteroida .....	4
1.1.3. Farmaceutski prašci za nazalnu primjenu kortikosteroida .....	5
1.2. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM KAO METODA PRIPRAVE NAZALNIH PRAŠAKA.....	6
1.3. SADRŽAJ VLAGE U SUHOM PRODUKTU .....	8
1.3.1. Metode određivanja sadržaja vlage .....	8
1.3.2. Utjecaj sadržaja vlage na stabilnost.....	10
1.3.3. Utjecaj procesnih i formulacijskih parametara pri sušenju raspršivanjem na sadržaj vlage u suhom produktu.....	11
1.4. OSLOBAĐANJE LIJEKA IZ FARMACEUTSKOG OBLIKA.....	12
1.4.1. Klasifikacija farmaceutskih oblika prema profilu oslobađanja .....	12
1.4.2. Metode ispitivanja oslobađanja lijeka iz praškastih sustava .....	13
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	17
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	18
3.1. MATERIJALI .....	18
3.2. METODE .....	18
3.2.1. Priprava otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem.....	18
3.2.2. Priprava mikrosfera sušenjem raspršivanjem .....	19
3.2.3. Ispitivanje bubrenja mikrosfera.....	19
3.2.4. Ispitivanje oslobađanja deksametazona <i>in vitro</i> .....	21
3.2.5. Određivanje sadržaja deksametazona .....	21
3.2.6. Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	24
4.1. ISKORIŠTENJE PROCESA PRIPRAVE MIKROSFERA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM ..	24
4.2. SADRŽAJ LIJEKA U MIKROSFERAMA .....	25
4.3. BUBRENJE MIKROSFERA .....	26
4.4. OSLOBAĐANJE LIJEKA <i>IN VITRO</i> .....	29
4.5. SADRŽAJ VLAGE U MIKROSFERAMA .....	30
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	32
<b>6. LITERATURA</b> .....	33
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	39
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

## 1. UVOD

### 1.1. NAZALNA PRIMJENA KORTIKOSTEROIDA

Nazalna primjena predstavlja neinvazivni i učinkovit način lokalne i sistemske dostave lijeka te je predmet brojnih suvremenih istraživanja. Posebno se istražuju mogućnosti primjene cjepiva putem nazalne sluznice te dostave nazalno primijenjenog lijeka izravno u središnji živčani sustav. Trenutno najrašireniji oblik nazalne primjene uključuje lokalnu dostavu lijekova s ciljem liječenja bolesti sluznice nosa. Najčešći primjeri takvih lijekova su dekongestivi, antihistaminici i kortikosteroidi. Lokalna primjena navedenih lijekova osigurava terapijski učinak pri relativno maloj dozi te umanjuje mogućnost razvoja nuspojava u odnosu na sistemska primjenu (Bitter i sur., 2011).

Nazalni kortikosteroidi indicirani su u liječenju alergijskog i nealergijskog rinitisa te akutnog rinosinuitisa, prevenciji akutnog rekurentnog rinosinuitisa i kroničnog rinosinuitisa sa ili bez polipa te postoperativnom liječenju kroničnog rinosinuitisa sa ili bez polipa (Tablica 1.). Postoperativno liječenje nazalnim kortikosteroidima smanjuje potrebu za oralnom primjenom istih i smanjuje ponovni rast nosnih polipa (Cox, 2020; Mullol i sur., 2009).

**Tablica 1.** Kortikosteroidi za nazalnu primjenu odobreni u Republici Hrvatskoj i EU (preuzeto sa [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

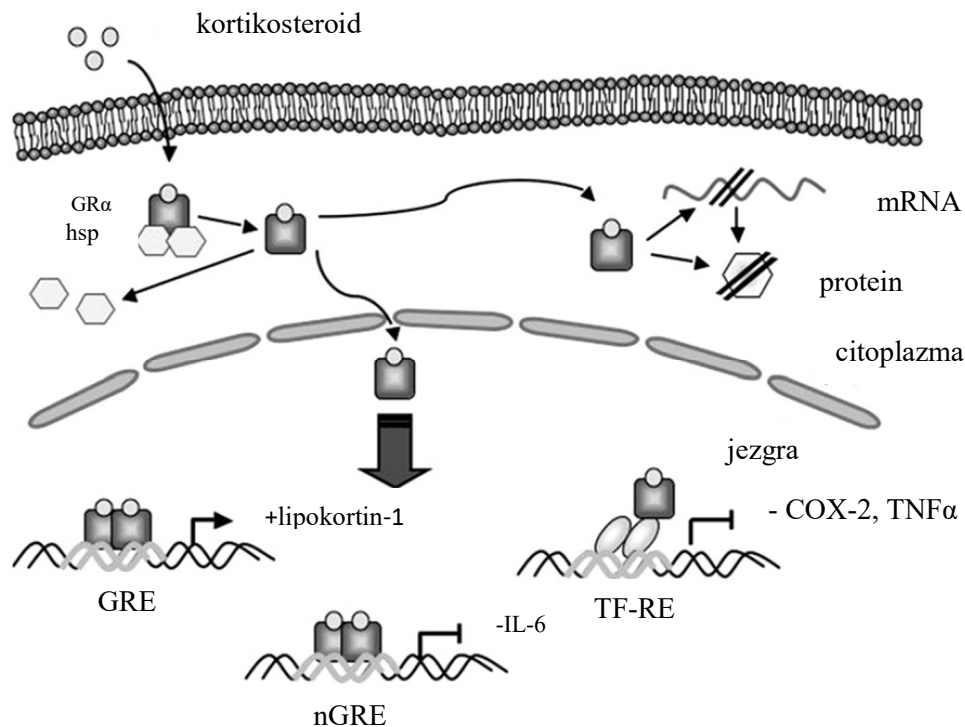
NAZIV LIJEKA	DJELATNA TVAR / DOZA	FARMACEUTSKI OBLIK	TERAPIJSKE INDIKACIJE
<b>Tafen nasal</b>	budezonid / 50 µg	sprej za nos, suspenzija	sprječavanje i liječenje sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa, nealergijskog rinitisa te nosnih polipa
<b>Rinoco</b>	flutikazonpropionat / 50 µg	sprej za nos, suspenzija	profilaksa i liječenje sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa

<b>Dymista</b>	azelastin hidroklorid / 137 µg	sprej za nos, suspencija	ublažavanje simptoma umjerenog do teškog sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa
<b>Synaze</b>	flutikazonpropionat / 50 µg		
<b>Flixonase</b>	flutikazonpropionat / 50 µg	kapi za nos, suspencija  sprej za nos, suspencija	profilaksa i liječenje sezonskog i cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa
<b>Momanose</b>	mometazonfuroat / 50 µg	sprej za nos, suspencija	liječenje simptoma sezonskog alergijskog rinitisa
<b>Bloctimo</b>	mometazonfuroat / 50 µg	sprej za nos, suspencija	liječenje simptoma sezonskog ili cjelogodišnjeg alergijskog rinitisa u osoba starijih od 3 god.
<b>Mometazonfuroat</b>			liječenje nosnih polipa u osoba starijih od 18 god.
<b>Cipla</b>			
<b>Nasonex</b>			
<b>Avamys</b>	flutikazon furoat / 27,5 µg	sprej za nos, suspencija	liječenje simptoma alergijskog rinitisa kod osoba starijih od 6 godina

### 1.1.1. Mehanizam djelovanja kortikosteroida

Mehanizam djelovanja kortikosteroida može se opisati kao smanjenje transkripcije gena za proupalne medijatore i povećanje transkripcije gena za protuupalne medijatore (Slika 1.). Nadalje, kortikosteroidi smanjuju infiltraciju različitih proupalnih stanica, uključujući T limfocite, eozinofile, bazofile, mastocite i dendritičke stanice, u dišne putove te smanjuju izlučivanje sluzi iz submukoznih žljezdanih stanica (Mullol i sur., 2009; Zitt i sur., 2007). U

ljudi su dosad identificirane dvije izoforme glukokortikoidnog receptora (GR), a to su GR $\alpha$  i GR $\beta$ . GR $\alpha$  je dominantan i on je taj koji reagira na vezanje kortikosteroida. Nalazi se u većini tkiva i stanica čovjeka u različitim količinama. U svom inaktivnom stanju, GR se nalazi u citosolu kao kompleks s dva HSP (engl. *heat-shock protein*) 90 proteina šaperona. Kortikosteroidni ligand (hormon ili lijek) prolazi staničnu membranu pasivnom difuzijom i njegovim vezanjem za GR dolazi do fosforilacije, promjene konformacije i odvajanja GR-a iz proteinskog kompleksa. Homodimer GR-ligand odlazi u jezgru gdje se veže za DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) na promotorske regije gena koje reagiraju na kortikosteroide, tj. GRE (engl. *glucocorticoid response elements*). Homodimer može djelovati i direktnom inhibicijom transkripcijskih faktora kao što su aktivator proteina 1 (engl. *activator protein 1*, AP-1) i nuklearni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) koji svojim djelovanjem povećavaju transkripciju proupalnih proteina kao što su ciklooksigenaza-2 (COX-2) i tumorski faktor nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Mullol i sur., 2009; Pujols i sur., 2001). Takav način inhibicije genske transkripcije bez vezanja dimera za DNA naziva se neizravna transrepresija i to je ujedno najvažniji put dobivanja protuupalnih učinaka. Osim genomskih mehanizama, kortikosteroidi imaju i negenomske učinke koji su vidljivi nakon samo nekoliko sekundi ili minuta. Brzi učinci se događaju preko GR-a smještenog u staničnoj membrani, a rjeđe u citoplazmi. Usto, negenomske učinci mogu se postići i bez posredovanja receptora. Tako glukokortikoid aktivira sekundarne glasnike, uključujući kalcijeve ione, inozitol trifosfat (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) te cAMP (ciklički adenzin monofosfat) i cGMP (ciklički gvanozin monofosfat). Povećana aktivacija sekundarnih glasnika potiče rad kinaza ovisnih o njima što dovodi do promjene staničnih procesa. Uz to, negenomske učinke očituje se u regulaciji membranskih ionskih kanala i T staničnih receptora (TCR) te u promjeni signalizacije G proteinom (Grzanka i sur., 2010).



**Slika 1.** Mehanizam djelovanja kortikosteroida; kratice: GR (glukokortikoidni receptor), hsp (protein toplinskog šoka, engl. *heat shock protein*), GRE (elementi koji odgovaraju na glukokortikoide, engl. *glucocorticoid response elements*), nGRE (elementi na koje glukokortikoidi djeluju negativno, engl. *negative glucocorticoid response elements*), TF-RE (elementi koji odgovaraju na aktivaciju transkripcijskih faktora, engl. *transcription factor responsive elements*), IL (interleukin), COX (ciklooksigenaza), TNF (faktor nekroze tumora, engl. *tumor necrosis factor*) (preuzeto i prilagođeno prema Mullol, 2009)

### 1.1.2. Sigurnost nazalne primjene kortikosteroida

Kortikosteroidi koji se danas uglavnom koriste (Tablica 1.) izrazito su lipofilni/teško topljivi u vodi, pa je samim time i sistemska apsorpcija vrlo mala (Campbell, 2018). S povećanjem lipofilnosti povećava se količina lijeka koja ostaje na mjestu primjene, kao i afinitet kortikosteroida prema receptoru te postotak lijeka vezanog za proteine plazme što pridonosi manjem dijelu slobodnog lijeka koji može djelovati sistemski. Dok je za novije kortikosteroide (mometazon i flutikazon) sistemska bioraspoloživost manja od 1%, za stariju generaciju (budezonid i triamcinolon) može doseći i do 50%, što ujedno povećava i rizik od sistemskih nuspojava kortikosteroida (Mullol i sur., 2009; Zitt i sur., 2007). Unatoč tome što velika količina lijeka ostaje na mjestu primjene, uvijek jedan dio mukocilijarnim čišćenjem dođe do



probavnog sustava gdje se apsorbira u sistemsku cirkulaciju i inaktivira prvim prolazom kroz jetru (Allen, 2000). Nakon dugotrajne nazalne primjene kortikosteroida nije zamijećeno lokalno oštećenje nosne sluznice, osim u iznimnim slučajevima u kojima je nastupila perforacija septuma. Perforacija septuma i devaskularizacija također mogu biti posljedica operacije septuma, ozljede ili konzumacije kokaina (Bensch, 2016). Nadalje, uobičajeni režim doziranja lijeka je jednom dnevno, a u toj dozi nije dokazan klinički značajan poremećaj osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, kao ni usporavanje rasta djece. Budući da se u djece konstantno mijenjaju faktori koji utječu na rast, teško je procijeniti koliki točno utjecaj na rast ima primjena kortikosteroida (Zitt i sur., 2007; Allen, 2000; Cave i sur., 1999). Nizom studija istraživan je učinak nazalnih kortikosteroida na bolesti oka, kao što su glaukom i katarakta te ni u jednoj povišen rizik od tih bolesti nije doveden u vezu s nazalnom uporabom lijeka (Valenzuela i sur., 2018; Bensch, 2016; Garbe i sur., 1997; Opatowsky i sur., 1995).

### **1.1.3. Farmaceutski prašci za nazalnu primjenu kortikosteroida**

Otopine i suspenzije najčešći su farmaceutski oblici za nazalnu primjenu, a njihov glavni nedostatak je kratko zadržavanje na nosnoj sluznici uslijed curenja i mukocilijarnog klirensa (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). U usporedbi s konvencionalnim otopinama i suspenzijama, tekući *in situ* gelirajući sustavi osiguravaju dulje vrijeme zadržavanja na mjestu primjene, zahvaljujući nastajanju hidrogela u kontaktu s nosnom sluznicom, a uslijed povećanja temperature, promjene pH ili ionskog umrežavanja (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Polimerni praškasti sustavi predstavljaju još jedan farmaceutski oblik sa sposobnošću geliranja na mjestu primjene, jer bubre u kontaktu s nosnim fluidom stvarajući hidrogel. Usto, praškasti sustavi odlikuju se većom stabilnošću i manjom potrebom za korištenjem konzervansa u odnosu na tekuće oblike za nazalnu primjenu. U svrhu pripreme mukoadhezivnih prašaka koriste se različiti mukoadhezivni polimeri poput: natrijevog alginata, hipromeloze, kitozana, hidroksipropilceluloze i pektina (Chaturvedi i sur., 2011; Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Unatoč prednostima praškastih sustava, oni i dalje nisu široko primjenjivani. U Europi je jedini registrirani kortikosteroid u obliku praška Rhinocort<sup>®</sup> Turbuhaler<sup>®</sup> (budezonid, AstraZeneca, London, UK), indiciran za liječenje rinitisa i nazalnih polipa. U tom pripravku prisutan je samo mikronizirani budezonid bez dodatnih pomoćnih tvari. U Japanu su registrirani praškasti pripravci Teijin Rhinocort<sup>®</sup> (beklometazon dipropionat, Teijin, Tokio, Japan) i

Erizas<sup>®</sup> (deksametazon cipeccilat, Nippon Shnyaku, Kyoto, Japan; Tiozzo Fasiolo i sur., 2018) za nazalnu primjenu kortikosteroida.

Suvremena istraživanja u području nazalne primjene lijekova dijelom su usmjerena na razvoj praškastih terapijskih sustava kortikosteroida (Jurišić Dukovski i sur., 2019; Pozzoli i sur., 2017; Kim i sur., 2014). Pozzoli i suradnici (2017) su procesom sušenja raspršivanjem pripravili čvrstu disperziju budezonida i polimera Soluplus<sup>®</sup> (polivinil kaprolaktam – polivinil acetat – polietilen glikol kopolimer), s ciljem poboljšanja topljivosti lijeka. Istom djelatnom tvari bavili su se i Kim i suradnici (2014) koji su budezonid uklopili u mikročestice hidrokispropil- $\beta$ -ciklodekstrina pripravljene liofilizacijom. Navedene mikročestice također su poboljšale topljivost budezonida. Jurišić Dukovski i suradnici (2019) pripravili su metodom sušenja raspršivanjem pektinske mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom, kao i konvencionalne pektinske mikrosfere s deksametazonom. Mikrosfere s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama s deksametazonom rezultirale su duljim zadržavanjem na mjestu primjene u odnosu na konvencionalne mikrosfere osiguravajući dulje djelovanje lijeka, a time i manji broj doziranja te bolje prihvaćanje od strane pacijenata.

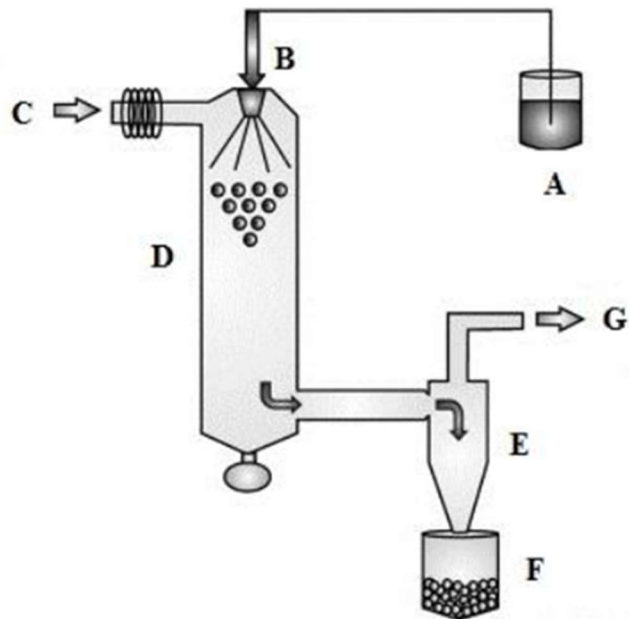
## **1.2. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM KAO METODA PRIPRAVE NAZALNIH PRAŠAKA**

Sušenje raspršivanjem je široko korištena metoda pripreme praška iz tekućeg uzorka. U početku se najviše koristila za pripravu mlijeka u prahu, dok se danas sve više koristi i u farmaceutskoj, kemijskoj, medicinskoj, biotehnološkoj industriji te u industriji polimera (Santos i sur., 2017).

Praškasti produkt pripravljen sušenjem raspršivanjem boljeg je profila stabilnosti u odnosu na tekuće oblike, a istodobno je i jednostavniji za rukovanje i skladištenje (Li i sur., 2010). Usto, prilagodbom parametara sušenja raspršivanjem, moguće je pripremiti praškasti produkt željene veličine čestica (Paudel i sur., 2013). O samom procesu sušenja, osim morfologije čestica, ovisi i vlažnost produkta, poroznost te ponašanje u tekućem mediju (Diez i sur., 2018). Nadalje, sušenje raspršivanjem metoda je kojom se mogu poboljšati svojstva tečenja i disperzibilnost prašaka, te prilagoditi aerodinamička svojstva bitna pri nazalnoj i pulmonalnoj primjeni prašaka (Vehring i sur., 2007).

Proces sušenja raspršivanjem može se podijeliti u četiri faze, a to su: atomizacija tekućine, kontakt raspršenih kapljica s plinom za sušenje, isparavanje otapala i odvajanje osušenog praškastog produkta od plina (Paudel i sur., 2013). Atomizacijom se tekućina raspršuje u sitne kapljice čime se povećava ukupna površina koja je u kontaktu s medijem za sušenje pa se postiže brži prijenos topline od medija za sušenje do kapljica tekućine. To sve rezultira brzim isparavanjem otapala i generiranjem suhih čestica željenih svojstava. Te čestice uslijed isparavanja otapala nikada ne postižu temperaturu jednaku ulaznoj temperaturi medija za sušenje (Cal i Sollohub, 2010), i upravo je to razlog zašto se i termolabilne tvari mogu sušiti navedenom metodom (Paudel i sur., 2013).

Shema uređaja za sušenje raspršivanjem prikazana je na Slici 2. Proces započinje dovođenjem uzorka (otopine/suspenzije/emulzije) do sapnice peristaltičkom pumpom. Sapnica može biti multifluidna, hidraulična, pneumatska i ultrazvučna, dok se za farmaceutске pripravke najčešće koristi bifluidna. Sapnica raspršuje uzorak pri ulasku u komoru za sušenje gdje raspršene kapljice dolaze u kontakt s medijem za sušenje. Medij za sušenje uglavnom je vrući zrak, a može biti i dušik, argon i ugljikov dioksid. Budući da različiti plinovi daju različite produkte atomizacije, svojstva plina (npr. gustoća i specifični toplinski kapacitet) bitna su za taj proces. Atomizirane čestice mogu se razlikovati u veličini, brzini i morfologiji, zbog čega je bitno izabrati odgovarajući plin s obzirom na željena svojstva produkta. Vrijeme zadržavanja kapljica/čestica u komori za sušenje može varirati ovisno o uvjetima sušenja, a uglavnom se radi o milisekundama. U komori za sušenje odvija se prijenos energije i mase na površini kapljice te se na kraju, pomoću ciklona, suhe čestice odvajaju od medija za sušenje i odlaze u posudu za skupljanje produkta (Singh i Van den Mooter, 2015).



**Slika 2.** Prikaz uređaja za sušenje raspršivanjem (A – uzorak, B – sapnica, C – medij za sušenje (plin), D – komora za sušenje, E – ciklon, F – posuda za skupljanje produkta, G – ispušni ventil) (prilagođeno prema Sosnik i Seremeta, 2015)

### 1.3. SADRŽAJ VLAGE U SUHOM PRODUKTU

#### 1.3.1. Metode određivanja sadržaja vlage

Voda prisutna u farmaceutskom obliku pridonosi fizičkoj i kemijskoj nestabilnosti lijeka, razvoju mikroorganizama i skraćanju roka trajanja proizvoda. Iz tih razloga razvijen je niz metoda kojima se može izmjeriti vlažnost produkta, odnosno količina vode u obliku (Armstrong i sur., 2013).

- Gubitak sušenjem prikazuje se kao postotak, a dobiva se dijeljenjem mase produkta nakon i prije sušenja. Sušenje se provodi u sušioniku, pećnici ili vakuumu pri povišenoj temperaturi kroz određeno vrijeme ili do konstantne mase uzorka. Postupak je primjeren za oblike koji sadrže tvari koje se neće razgraditi ili rastaliti pri temperaturi sušenja. Nedostatak ove metode je činjenica da gubitak mase ne označava samo masu vode već i ostalih lako hlapljivih tvari (Armstrong i sur., 2013).
- Termogravimetrijska analiza (TGA) je metoda u kojoj se mjeri masa produkta u ovisnosti o temperaturi i vremenu dok se uzorak nalazi u kontroliranim atmosferskim i temperaturnim uvjetima. Masa uzorka se s vremenom može povećavati ili smanjivati. Tom metodom mogu se odrediti sadržaj vlage u uzorku, gubitak otapala i plastifikatora, oksidacija, dekarboksilacija, piroliza, razgradnja uzorka i udio pepela ([www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)).

- Karl-Fischerova titracija (KFT) najraširenija je i najviše korištena metoda određivanja vode u produktu. Temelji se na modificiranoj Bunsenovoj reakciji koja se koristi za određivanje sumporovog dioksida u vodenim otopinama. Karl-Fischerova reakcija specifična je kvantitativna reakcija vode s anhidričnim otopinama sumporovog dioksida i joda u prisutnosti pufera koji stupa u reakciju sa vodikovim ionima. Prisutnost piridina kao pufera osigurava neutralizaciju oslobođenih protona te provođenje reakcije do kraja. Jednadžba Karl Fischerove reakcije glasi:



Navedena jednadžba zahtijeva omjer vode i joda 2:1.

U praksi se najčešće koriste volumetrijska i kulometrijska metoda. Volumetrijska metoda je prikladna za određivanje većeg udjela vode, od 0,001 do 100%. Za razliku od volumetrijske, kulometrijska metoda može odrediti od 0,0001 do 5% vode u uzorku. Dok se volumetrijskom metodom mogu analizirati tekući, čvrsti i polučvrsti uzorci, kulometrijska metoda prikladna je za analizu samo tekućih i plinovitih uzoraka. Nadalje, za volumetrijsku metodu potrebno je od 15 do 0,02 g uzorka, dok je za kulometrijsku potrebno od 10 do 0,05 g. Također, kulometrijska metoda je preciznija budući da se ne dodaje titrant, dok se kod volumetrijske metode treba redovito provjeravati količina dodanog titranta. Postoje različite metode detekcije završne točke titracije. Jedna od njih uključuje promjenu boje u žutu do smeđu uslijed suviška joda u otopini. Budući da je teško precizno odrediti promjenu boje, češće se koriste elektrokemijske, biamperometrijske i bivoltometrijske metode. U njima se koriste dvije polarizirane platinaste elektrode na kojima se istovremeno odvijaju reakcije oksidacije jodida i redukcije joda (Armstrong i sur., 2013). Nedostaci KFT metode uključuju korištenje toksičnih otopina te dugo trajanje postupka (Zhou i sur., 1998).

- Plinska kromatografija prikladna je za određivanje vode u lijekovima koji su dostupni u ograničenoj količini. Dok se za KFT treba upotrijebiti 0,5 – 15 g uzorka, za plinsku kromatografiju je dovoljno puno manje uzorka (1 µl). Prvotno je za određivanje vode plinskom kromatografijom korištena kolona temeljena na molekulskom situ, a za izravnu detekciju korišten je detektor toplinske vodljivosti, s obzirom da se u prisustvu vode mijenja toplinska vodljivost struje plina. Osim izravne detekcije, također se koristi i neizravna detekcija pomoću plamenoionizacijskog detektora. Određivanje vode plinskom kromatografijom konstantno je unapređivano, primjerice, osiguranjem prolaska analita kroz kalcij karbid, korištenjem metanola kao unutarnjeg standarda i poliaromatskih kuglica kao kolone, upotrebom poroznih polimera, kao i kolona ispunjenih Teflonskim prahom impregniranim 5% Carbowaxom 20-M te kapilarnom plinskom kromatografijom sa

helijskim ionizacijskim detektorom. Cilj je bio dobiti što točnije rezultate uz što manju potrošnju uzorka. Svaki od navedenih načina unapređenja ima svoje prednosti, ali i nedostatke, poput previsoke granice detekcije, potrebe za velikom količinom uzorka, slabe razlučivosti i tome slično. Stacionarna faza koja se pokazala najpreciznijom i najtočnijom je bazirana na ionskoj tekućini. Takve stacionarne faze imaju visoku termalnu stabilnost i stabilnost prema vodi i kisiku te su promjenjive polarnosti. Nadalje, pri korištenju takve stacionarne faze, granica detekcije ( $\sim 2,0$  ng) znatno je niža u odnosu na granicu detekcije pri kulometrijskoj KFT ( $10 \mu\text{g}$ ) (Armstrong i sur., 2013).

- Bliska infracrvena spektroskopija (engl. *near-infrared spectroscopy*, NIRS) je brza, nedestruktivna i neinvazivna metoda određivanja sadržaja vode u uzorku, ali se za kvantitativnu analizu ne može koristiti kao jedina metoda, već je potrebno provesti još jednu od spomenutih metoda kao referentnu u svrhu kalibracije. NIRS ima nisku osjetljivost zbog čega je granica detekcije  $0,1\%$  (*m/m*). Od najvećeg su značaja pikovi pri valnim duljinama 760, 970, 1190, 1450 i 1940 nm, gdje O-H veze pokazuju svoje maksimume (Armstrong i sur., 2013; Reich, 2005).

### 1.3.2. Utjecaj sadržaja vlage na stabilnost

Vlaga u farmaceutskom obliku može rezultirati nezadovoljavajućom stabilnošću i kvalitetom farmaceutskog proizvoda. Vlažnost se može povećati tijekom skladištenja farmaceutskog proizvoda ili nakon određenih proizvodnih postupaka, kao npr. vlažne granulacije, liofilizacije ili sušenja raspršivanjem. Takva vlažnost naziva se ostatnom vlagom. Vlaga u farmaceutskom obliku može ubrzati razgradnju djelatne i pomoćnih tvari, djelujući kao reaktant ili povećanjem mobilnosti molekula plastifikacijom ili sniženjem temperature staklišta. Temperatura staklišta ( $T_g$ ) je temperatura ispod koje je pokretljivost molekula manja pri čemu su fizikalna svojstva tvari slična staklu, a iznad koje su svojstva tvari, zbog veće pokretljivosti molekula, slična gumi (Ebnesajjad, 2016). Prisutnost vlage također dovodi do promjene polarnosti sustava, što može, ovisno o sastavu, ubrzati ili pak usporiti brzinu razgradnje sastavnica farmaceutskog oblika. Budući da amorfní oblik djelatne tvari osigurava veću topljivost, brzinu otapanja i bioraspoloživost u odnosu na kristalni oblik djelatne tvari (Ohtake i Shalaev, 2013), pripravlja se čvrste disperzije djelatne tvari i hidrofilnih polimera, s ciljem sprječavanja kristalizacije djelatne tvari. Polimeri u sastavu čvrstih disperzija povećavaju udio vode u sustavu, što posljedično ipak može dovesti do povećanja mobilnosti molekula i

kristalizacije (Rumondor i Taylor, 2010). Na prisutnost vlage najosjetljiviji su proteini i peptidi, jer voda snižava aktivacijsku energiju reakcije deprotonacije. Iz tog razloga oni se proizvode u obliku praška, najčešće postupkom liofilizacije (Ohtake i sur., 2018).

### **1.3.3. Utjecaj procesnih i formulacijskih parametara pri sušenju raspršivanjem na sadržaj vlage u suhom produktu**

Sadržaj vlage u praškastom produktu procesa sušenja raspršivanjem ovisi o više procesnih i formulacijskih parametara. Kapacitet rada aspiratora određuje protok plina za sušenje kroz komoru za sušenje, a samim time i vrijeme zadržavanja kapljice u komori za sušenje te vlažnost produkta. Sadržaj vlage u produktu mijenja se ovisno o tome je li strujanje plina za sušenje turbulentno ili laminarno (Singh i Van den Mooter, 2015). Prema istraživanju kojeg su proveli Focaroli i suradnici najveći utjecaj na količinu ostatne vlage imaju dotok uzorka i ulazna temperatura plina za sušenje. Povišenje ulazne temperature ili smanjenje dotoka uzorka rezultirali su smanjenjem ostatne vlage, dok je povećanje brzine dotoka rezultiralo povećanjem ostatne vlage (Focaroli i sur., 2019). U istraživanju kojeg su proveli Rattes i Oliveira (2007), najveći utjecaj na sadržaj vlage u produktu sušenja raspršivanjem imala je upravo ulazna temperatura plina za sušenje (Rattes i Oliveira, 2007). Naime, što je ulazna temperatura plina za sušenje veća, isparavanje otapala je učinkovitije, a postotak ostatne vlage u suhom produktu manji (Focaroli i sur., 2019). Posljedično, praškasti produkt dobiven pri većoj ulaznoj temperaturi plina za sušenje bio je karakteriziran većom temperaturom staklišta, dok je praškasti produkt dobiven pri manjoj ulaznoj temperaturi plina za sušenje bio karakteriziran manjom temperaturom staklišta, sukladno većoj količini ostatne vlage (Singh i Van den Mooter, 2015). Usto, povećanje suhoće produkta povezano je i s povećanjem njegove higroskopnosti (Tonon i sur., 2011). Ulazna temperatura plina za sušenje treba biti dovoljno visoka da bi se kapljice osušile prije nego što dođu u kontakt sa stjenkama komore za sušenje, ali također ne smije biti viša od temperature termalne razgradnje sastavnica raspršivanog tekućeg sustava. Ukoliko vrijednost izlazne temperature plina za sušenje premaši vrijednost temperature staklišta pri određenom sastavu otapala, moguće je očekivati manje iskorištenje zbog prijanjanja produkta na stjenke komore (Singh i Van den Mooter, 2015).

Sadržaj vlage u suhom produktu uvelike ovisi i o sastavu raspršivanog tekućeg sustava, uključujući ukupni sadržaj otopljene suhe tvari i sadržaj higroskopnih tvari poput polimera sa svojstvom vezanja/zadržavanja vode (Nižić i sur., 2018). Primjerice, ugljikohidrati vežu vodu

stvaranjem vodikovih veza između vodikovog atoma iz molekule vode i hidroksilnih skupina ugljikohidrata. Opisana sposobnost različitih ugljikohidrata ovisna je upravo o broju raspoloživih hidroksilnih skupina (Tonon i sur., 2011).

## **1.4. OSLOBAĐANJE LIJEKA IZ FARMACEUTSKOG OBLIKA**

### **1.4.1. Klasifikacija farmaceutskih oblika prema profilu oslobađanja**

Farmaceutski oblici se prema profilu oslobađanja lijeka dijele na (Europska agencija za lijekove, 2014):

- oblike trenutnog oslobađanja – oslobađanje lijeka započinje odmah nakon primjene, pri čemu se  $\geq 85\%$  lijeka oslobodi unutar  $\leq 30$  minuta (oblici vrlo brzog oslobađanja) ili se  $75\%$  lijeka oslobodi unutar 45 minuta (oblici brzog oslobađanja)
- oblike odgođenog učinka – oblici kod kojih je oslobađanje lijeka slično kao kod oblika trenutnog oslobađanja, ali se događa s odgodom u odnosu na vrijeme uzimanja lijeka. Takvi oblici prikladni su za lijekove osjetljive na želučanu kiselinu, lijekove koji izazivaju neželjene učinke na sluznicu želuca ili lijekove namijenjene djelovanju u određenom dijelu probavnog sustava, npr. kod različitih bolesti crijeva.
- oblike produljenog oslobađanja - oslobađanje lijeka započinje odmah nakon primjene, ali je sporije nego kod oblika trenutnog oslobađanja i omogućuje najmanje dvostruko smanjenje učestalosti doziranja u odnosu na oblik trenutnog oslobađanja. Takav oblik može se koristiti u svrhu smanjenja fluktuacije koncentracije lijeka u plazmi, što pridonosi kontinuiranom učinku i smanjenju nuspojava. Također, budući da se oblik produljenog oslobađanja rjeđe dozira, veća je suradljivost pacijenata, a samim time i učinkovitost terapije.
- oblike višefazičnog oslobađanja koji se dijele na pripravke:
  - a) bifazičnog oslobađanja – dio doze oslobađa se odmah nakon primjene lijeka što osigurava brzo dostizanje terapijske koncentracije lijeka, a drugi dio doze produljeno se oslobađa čime se postiže učinkovita koncentracija lijeka kroz dulji vremenski period bez ponovnog uzimanja lijeka
  - b) pulsirajućeg oslobađanja – oslobađanje lijeka slijedi ponavljajući obrazac u određenim vremenskim intervalima



- višejedinične spremišne sustave – sadrže više istih ili različitih podjedinica te je takvom kombinacijom moguće osigurati kontrolirano oslobađanje uz oslobađanje inicijalne doze i doze održavanja
- spremišne sustave s jednim odjeljkom – osmotske pumpe koje osiguravaju kontrolirano oslobađanje lijeka temeljem osmoze, odnosno gibanja vode kroz polupropusnu membranu
- intramuskularne ili supkutane depo formulacije – otopine, emulzije ili suspenzije koje osiguravaju produljeno oslobađanje nakon injektiranja u mišić ili potkožno tkivo. Za supkutanu primjenu koriste se i implantati načinjeni od polimera koji kontroliraju brzinu oslobađanja lijeka.
- transdermalne terapijske sustave – koriste se za sistemsku primjenu lijeka lijepljenjem flastera na intaktnu kožu pri čemu se lijek oslobađa kontroliranom brzinom. Dva su tipa transdermalnih flastera:
  - a) matriksni tip – polimerni matriks kontrolira oslobađanje lijeka, a flaster može biti jednoslojni ili dvoslojni ovisno o tome je li lijek u adhezivnom sloju ili u matriksu iznad adhezivnog sloja
  - b) spremišni tip – sadrži polupropusnu membranu koja kontrolira oslobađanje lijeka

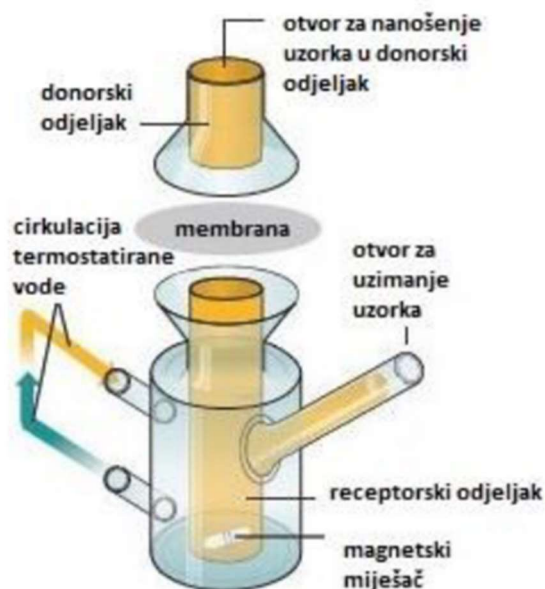
U suvremenoj farmakoterapiji, sve više se istražuju i primjenjuju oblici modificiranog oslobađanja lijeka, odnosno oblici kod kojih je brzina i/ili mjesto oslobađanja različito od onih kod oblika trenutnog oslobađanja. Takvi oblici prikladni su u situacijama kada je potrebna titracija doze, za osiguravanje produljenog terapijskog učinka te za rizične skupine pacijenata kao što su djeca, osobe starije životne dobi i pacijenti s insuficijencijom jetre ili bubrega (Europska agencija za lijekove, 2014).

#### **1.4.2. Metode ispitivanja oslobađanja lijeka iz praškastih sustava**

Suvremena istraživanja terapijskih sustava za nazalnu primjenu velikim dijelom usmjerena su na razvoj prašaka, mikro i nanočestica, te (*in situ*) gelova s uklopljenim lijekom. Među ostalim postupcima *in vitro* karakterizacije tijekom razvoja takvih sustava, važno mjesto zauzima ispitivanje profila oslobađanja lijeka. U tu svrhu danas se koristi niz metoda prilagođenih farmaceutskom obliku, a u svakoj od njih se uvjeti (temperatura, pH i sastav pufera) pokušavaju što više približiti *in vivo* uvjetima u nosnoj sluznici (Jug i sur., 2018).

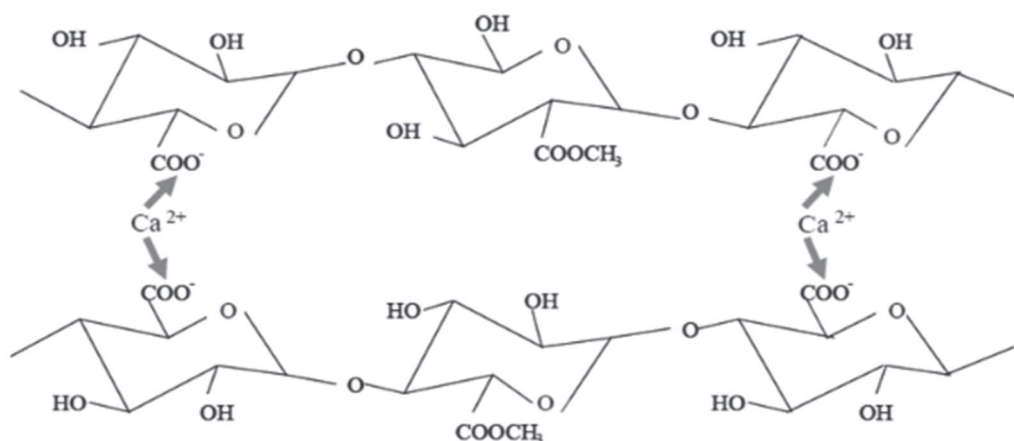
Metode ispitivanja oslobađanja lijeka iz praškastih sustava obuhvaćaju: metodu s Franzovom difuzijskom ćelijom, metodu s rotirajućom košaricom, metodu s protočnom ćelijom, metodu s imerzijskom ćelijom i metodu uzorkovanja i odjeljivanja (Jug i sur., 2018).

- Metoda s Franzovom difuzijskom ćelijom (Slika 3.) najprikladnija je za ispitivanje oslobađanja lijeka iz praškastih sustava. Naime, uzorak praškastog sustava stavlja se u donorski odjeljak Franzove difuzijske ćelije na polupropusnu membranu smještenu između donorskog i receptorskog odjeljka napunjenog receptorskim medijem za ispitivanje oslobađanja lijeka, najčešće umjetnim nosnim fluidom. Takav način ispitivanja omogućava polako prodiranje tekućine u praškasti sustav što realno prikazuje situaciju koja se događa nakon primjene lijeka na nosnu sluznicu.



**Slika 3.** Franzova difuzijska ćelija (prilagođeno prema [www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com))

U slučajevima u kojima je praškasti sustav pripremljen iz polimera čiji se lanci umrežavaju u prisustvu dvovalentnih kationa (Slika 4.) rezultirajući umjerenim bubrenjem, neophodno je koristiti biorelevantni receptorski medij s odgovarajućim sadržajem kalcijevih iona, kako bi se vjernom simulacijom uvjeta *in vivo* postiglo umrežavanje polimernih lanaca i procijenio utjecaj na profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Lijek prelazi u receptorski odjeljak nakon njegova oslobađanja iz farmaceutskog oblika te difunduje kroz polupropusnu membranu. Stoga je važno ispitati otpor membrane difuziji lijeka i odabrati onu koja najmanje utječe na prijenos oslobođenog lijeka iz donorskog u receptorski odjeljak (Jug i sur., 2018).



**Slika 4.** Prikaz umrežavanja prektina u prisustvu dvovalentnih kalcijevih iona (preuzeto iz Castile i sur., 2012)

- Metoda s košaricom je jednostavna, robustna metoda u kojoj se koristi velika količina medija za otapanje, 200-400 ml, a rotacija košarice je 50 rpm te je poželjno da se događa pri uvjetima osigurane topljivosti (engl. *sink conditions*) (Jug i sur., 2018; Agencija za hranu i lijekove, 1997). pH medija se postavlja tako da odgovara fiziološkim uvjetima, primjerice za simuliranje želučanog soka pH se postavlja na 1,2, dok za intestinalni fluid pH iznosi 6,8. pH nosne sluznice kreće se od 5,5 – 6,5. Receptorski medij termostatira se pri  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  za oralno primjenjivane lijekove, dok se za lijekove koji se primjenjuju nazalno termostatira pri  $34^{\circ}\text{C}$  (England i sur., 2001; Agencija za hranu i lijekove, 1997). Uzorkovanje se provodi u određenim vremenskim intervalima koji ovise o očekivanoj brzini oslobađanja lijeka. Primjerice, u slučaju brzog oslobađanja lijeka vrijeme između uzorkovanja je od 5-10 minuta, dok se lijekovi koji se sporo oslobađaju uzorkuju svakih 15 minuta (Agencija za hranu i lijekove, 1997).

- Metoda s protočnom ćelijom (engl. *flow-through dissolution method*) sastoji se od rezervoara koji sadrži medij, pumpe koja dovodi medij iz rezervoara do okomito pozicionirane ćelije te vodene kupelji. Protok medija kroz ćeliju mora biti kontinuiran i ujednačen budući da je brzina otapanja proporcionalna protoku medija kroz ćeliju. Uvjeti osigurane topljivosti mogu se dugo održavati zbog čega je ova metoda prikladna za teško topljive lijekove. Postoje dva tipa navedene metode, a to su otvoreni i zatvoreni tip. U otvorenom tipu stalno se do ćelije dovodi novo otapalo, što pogoduje održavanju uvjeta osigurane topljivosti zbog čega je ta metoda prikladna za teško topljive lijekove. U zatvorenom tipu, medij koji je izašao iz ćelije ponovno se vraća u rezervoar gdje se miješa

i zagrijava te se na kraju izračuna kumulativna koncentracija analita (Singh i Aboul-Enein, 2006).

- Imerzijska ćelija u osnovi je difuzijska ćelija koja se koristi u kombinaciji s lopaticom ravnog dna. Ispitivani uzorak stavlja se u imerzijsku ćeliju i odjeljuje od okoline polupropusnom membranom. Difuzijska ćelija stavlja se u cilindar napunjen receptorskim medijem, s uzorkom/membranom prema gore. Iznad uzorka rotira se lopatica s ravnim dnom, osiguravajući neophodno miješanje receptorskog medija. Mijenjanjem položaja ploče za podešavanje volumena unutar ćelije kontrolira se volumen uzorka kojim se imerzijska ćelija puni. Imerzijska ćelija prikladna je za ispitivanje oslobađanja jer zahtijeva manje pomoćnih instrumenata u odnosu na druge difuzijske ćelije te je samim time jeftinija i lakše se postavlja. Nadalje, može se koristiti veliki raspon volumena receptorskog medija što je prikladno za postavljanje uvjeta osigurane topljivosti (Lusina Kregar i sur., 2015).

- Metoda uzorkovanja i odjeljivanja prikladna je u slučajevima kada oslobađanje lijeka traje puno dulje od procesa odjeljivanja čestica. Praškasti sustav stavlja se izravno u termostirani receptorski medij, a uzorkovanje medija provodi se u određenim vremenskim intervalima. Uzeti uzorak receptorskog medija filtrira se ili centrifugira, a zatim se sadržaj lijeka analizira određenom metodom. Volumen receptorskog medija mora biti dovoljan da bi ispunio uvjete osigurane topljivosti. Iako je ovo najjednostavnija metoda za ispitivanje oslobađanja lijeka, glavni nedostatak je gubitak dijela čestica koje sadrže lijek uzorkovanjem receptorskog medija, što rezultira nepotpunim profilom oslobađanja lijeka. Nadalje, može nastupiti i agregacija čestica čime se smanjuje brzina oslobađanja lijeka (Jug i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kortikosteroidi se široko primjenjuju u liječenju upalnih bolesti nosa i paranazalnih sinusa, kao što su alergijski i ne-alergijski rinitis te akutni i kronični rinosinusitis sa ili bez nosnih polipa pri čemu oslabljuju imunosti odgovor organizma (Karatzanis i sur., 2017).

Suspenzija je najčešći farmaceutski oblik kortikosteroida za nazalnu primjenu. Kao tekući oblik, podložna je curenju iz nosne šupljine i mukocilijarnom klirensu (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Praškasti sustavi predstavljaju farmaceutske oblike koji mogu osigurati dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici te veću stabilnost uz manju potrebu za korištenjem konzervansa u odnosu na tekuće oblike za nazalnu primjenu (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Nazalni prašci mogu sadržavati isključivo djelatnu tvar, ili mogu biti oblikovani uz dodatak pomoćnih tvari (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018) među kojima važno mjesto zauzimaju mukoadhezivni polimeri koji ostvaruju kontakt s nosnom sluznicom putem vodikovih veza te elektrostatskih, hidrofobnih ili van der Waalsovih interakcija (Filipović-Grčić i Hafner, 2008). Polimeri koji se najčešće koriste u oblikovanju prašaka za nazalnu primjenu su derivati celuloze (hipromeloza, metil celuloza, karboksimetil celuloza), karbopoli, kitozan, škrob i pektin (Chaturvedi i sur., 2011; Liu i sur., 2007).

Sušenje raspršivanjem je brza, relativno jeftina i reproducibilna metoda kojom se iz tekućeg materijala mogu pripremiti suhi prašci (Sosnik i Seremeta, 2015). Prilagodбом procesnih i formulacijskih parametara moguće je pripremiti mikrosfere željene veličine, oblika i sadržaja uklopljenog lijeka (Nižić, 2017). Polimerne mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem prikladne su za nazalnu primjenu lijeka s obzirom na veliki omjer površine prema volumenu te svojstvo bubrenja zahvaljujući kojem formiraju hidrogel pri kontaktu s nosnom sluznicom (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti polimerne mikrosfere (građene od pektina i hipromeloze) za nazalnu primjenu deksametazona (korištena je sol estera deksametazona topljiva u vodi) metodom sušenja raspršivanjem, te ispitati utjecaj koncentracije deksametazona, koncentracije hipromeloze i brzine dotoka otopine u procesu sušenja raspršivanjem na:

- iskorištenje procesa
- sadržaj lijeka u mikrosferama
- svojstva bubrenja mikrosfera
- *in vitro* oslobađanje lijeka iz mikrosfera
- sadržaj vlage u mikrosferama

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

U provođenju eksperimenata korišteni su sljedeći materijali:

- natrijev deksametazon fosfat (dalje u tekstu deksametazon; Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- hidrosipropilmetil celuloza (Metolose, Shin-Etsu Chemical Co.,Ltd, Japan)
- amidirani pektin (Pectin Amid CF 005, Herbstreith & Fox, Njemačka)
- umjetni nazalni fluid (SNF, engl. *simulated nasal fluid*)

SNF je pripremljen otapanjem NaCl (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji 150 mM, KCl (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji 40 mM i CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) pri koncentraciji 5,3 mM u pročišćenoj vodi.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Priprava otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem

Pektin je otopljen u pročišćenoj vodi pri koncentraciji od 1,4% (*m/V*) miješanjem na magnetskoj miješalici kroz 24 sata nakon čega je otopina filtrirana. Otopina hipromeloze pri koncentraciji 1,2% (*m/V*) pripremljena je dispergiranjem hipromeloze u pročišćenoj vodi zagrijanoj pri 80-90 °C, uz miješanje na magnetskoj miješalici. Homogena disperzija dalje je miješana na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi kroz 24 sata. Dobivena otopina ostavljena je još 24 sata u hladnjaku.

Otopine deksametazona i polimera (pektina i hipromeloze) namijenjene sušenju raspršivanjem pripravljene su pri različitim koncentracijama otopljenih tvari, kako je prikazano u Tablici 2. U čaši su izvagane potrebne količine deksametazona (korištena je natrijeva sol estera deksametazona), vodenih otopina pektina i hipromeloze te je dodana pročišćena voda do ukupne mase od 250 g. Tako pripravljena smjesa kratko je stavljena na magnetski mješač da bi se dobila homogena otopina.

**Tablica 2** Sastav otopina polimera i deksametazona pripremljenih za sušenje raspršivanjem

UZORAK	KONC. HIPROMELOZE (%, <i>m/V</i> )	KONC. PEKTINA (%, <i>m/V</i> )	KONC. DEKSAMETAZONA (%, <i>m/V</i> )	MASENI OMJER HIPROME- LOZE I PEKTINA	MASENI OMJER DEKSAMETA- ZONA I PEKTINA
<b>1 i 5</b>	0,2	0,2	0,2	1:1	1:1
<b>2 i 6</b>	0,2	0,2	0,02	1:1	0,1:1
<b>3 i 7</b>	1	0,2	0,02	5:1	0,1:1
<b>4 i 8</b>	1	0,2	0,2	5:1	1:1

### 3.2.2. Priprava mikrosfera sušenjem raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem pripremljenih otopina deksametazona i polimera provedeno je korištenjem uređaja Büchi 190 Mini Spray Dryer (Flawil, Švicarska). Promjer korištene sapnice iznosio je 0,7 mm. Sušenje raspršivanjem provedeno je pri konstantnoj ulaznoj temperaturi od 120 °C i protoku atomizirajućeg zraka od 600-700 NL/h. Postavka aspiratora (protok medija za sušenje) iznosila je 10, što odgovara 50 % kapaciteta aspiratora. Dotok uzorka osiguran radom peristaltičke pumpe iznosio je 2,5 ili 4,5 g/min. Parametri procesa sušenja raspršivanjem prikazani su u Tablici 3.

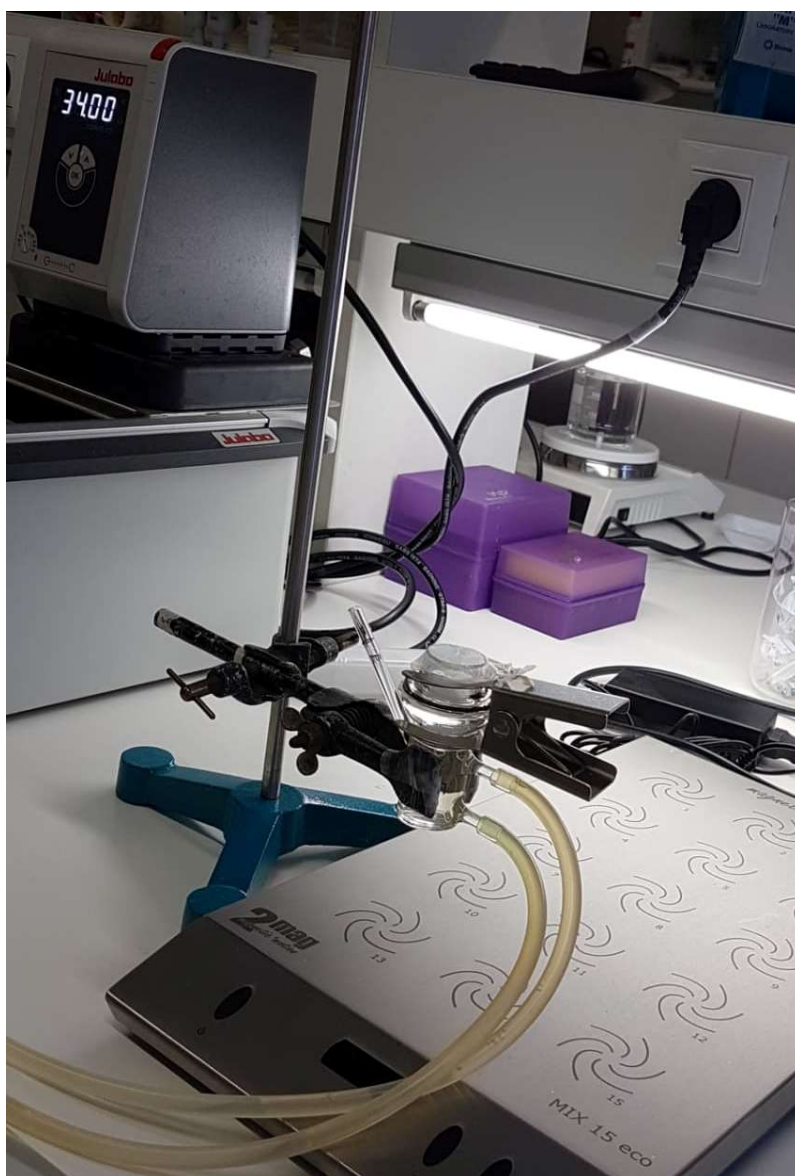
**Tablica 3.** Parametri procesa sušenja raspršivanjem

PARAMETAR	VRIJEDNOST
<b>Dotok uzorka</b>	2,5 ili 4,5 g/min
<b>Postavka aspiratora</b>	50%
<b>Ulazna temperatura</b>	120°C
<b>Izlazna temperatura</b>	75 – 78°C
<b>Protok komprimiranog zraka</b>	600 – 700 NL/h

### 3.2.3. Ispitivanje bubrenja mikrosfera

Bubrenje mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem ispitano je volumetrijskom metodom korištenjem Franzove difuzijske ćelije, a potpuna aparatura prikazana je na Slici 5.

Između receptorskog i donorskog odjeljka Franzove difuzijske ćelije, postavljena je polupropusna membrana (Sartolon poliamid, 0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius stedim biotech, Njemačka). Na polupropusnu membranu ravnomjerno je nanoseno 10 mg uzorka mikrosfera. Receptorski odjeljak ispunjen je pročišćenom vodom ili SNF-om. Sustav je termostetiran pri 34 °C pomoću vodene kupelji. Bubrenjem mikrosfera snižavala se razina tekućine u postraničnoj cjevčici za uzorkovanje, koja je kroz 15 minuta, svake tri minute, nadopunjavana pročišćenom vodom ili SNF-om do početne razine. Bubrenje mikrosfera izraženo je volumenom pročišćene vode ili SNF-a dodanih kroz postraničnu cijev po miligramu mikrosfera tijekom 15-minutnog procesa bubrenja.



**Slika 5.** Aparatura za određivanje bubrenja mikrosfera pomoću Franzove difuzijske ćelije



### 3.2.4. Ispitivanje oslobađanja deksametazona *in vitro*

Oslobađanje deksametazona iz mikrosfera te otapanje krutine deksametazona ispitano je korištenjem Franzove difuzijske ćelije. Kao receptorski medij korišten je SNF termostatiran pomoću vodene kupelji pri temperaturi od 34°C. Količina od 10 mg uzorka nanosena je na polupropusnu membranu (Sartolon poliamid, 0,45 µm, Sartorius stedim biotech, Njemačka) smještenu između donorskog i receptorskog odjeljka Franzove difuzijske ćelije. Receptorski medij je kroz čitavo ispitivanje miješan magnetskim mješačem (450 okr./min). Donorski odjeljak bio je prekriven parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje medija. Oslobađanje/otapanje lijeka praćeno je kroz tri sata pri čemu su, u određenim intervalima, uzimani uzorci receptorskog medija (0,5 ml) kroz postraničnu cjevčicu u koju je nakon toga dodano 0,5 ml svježeg SNF-a. Prvi alikvot uzet je u nultoj minuti, a sljedeći nakon 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 i 180 minuta. Po završetku ispitivanja, izbubrene mikrosfere ili zaostali deksametazon iz donorskog odjeljka kvantitativno su preneseni s polupropusne membrane u epruvetu, s ciljem određivanja sadržaja neoslobođenog odnosno neotopljenog deksametazona. U svim uzorcima sadržaj deksametazona određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, metodom opisanom u odjeljku 3.2.5.

### 3.2.5. Određivanje sadržaja deksametazona

Za određivanje sadržaja lijeka u mikrosferama pripremljenim sušenjem raspršivanjem, mikrosfere (20 mg) su dispergirane u pročišćenoj vodi u odmjerne tikvici od 50 ml. Pripremljena disperzija ostavljena je na magnetskoj miješalici kroz 24 sata kako bi se osiguralo potpuno oslobađanje/otapanje uklopljenog lijeka, nakon čega su uzorci otopine profiltrirani korištenjem membranskog filtera promjera pora 0,2 µm (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka).

Uzorci receptorskog medija uzeti pri ispitivanju oslobađanja lijeka *in vitro* profiltrirani su prije određivanja sadržaja lijeka korištenjem istog tipa membranskog filtera (promjer pora 0,2 µm).

Na kraju ispitivanja oslobađanja/otapanja *in vitro*, izbubrene mikrosfere ili zaostala krutina deksametazona kvantitativno su isprani s polupropusne membrane pročišćenom vodom. Disperzija mikrosfera ili otopina deksametazona u 10,0 ml vode miješana je na magnetskoj

miješalici 24 sata te je prije analize profiltrirana kroz membranski filter promjera pora 0,2 µm (Chromafil® Xtra PES-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka).

Kvantitativno određivanje deksametazona u filtriranim uzorcima provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) metodom validiranom u prethodnom istraživanju (Dolanjski, 2020). Korišteni kromatografski sustav sastojao se od kontrolera SCL-10Avp, pumpe 10Advp, degazera DGU-14A, pećnice CTO-10Avp te UV-VIS detektora SDP-10Avp. Za analizu je korištena kolona Kinetex C18, promjera pora 2,6 µm, 100 × 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD), koja je za vrijeme provođenja analize termostatorirana pri 55 °C.

Sadržaj deksametazona određen je izokratnim eluiranjem. Volumen injektiranja iznosio je 20 µl, a brzina protoka iznosila je 0,7 ml/min. Valna duljina pri kojoj je detektiran deksametazon iznosila je 241 nm. Apsorbancija svakog uzorka mjerena je u triplikatu nakon čega je za izračunavanje koncentracije korištena srednja vrijednost. Koncentracija lijeka je izračunata preko prethodno određenog baždarnog pravca  $y=82484x + 41456$  ( $R^2 = 0,9981$ ; Dolanjski, 2020).

Uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere (engl. *entrapment efficiency*, EE (%)) izračunata je prema sljedećoj formuli:

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

Sadržaj lijeka (engl. *drug loading*, DL (%)) izračunat je pomoću formule:

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

### 3.2.6. Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama

Sadržaj vlage (engl. *moisture content*, MC) u uzorcima mikrosfera određen je termogravimetrijskom analizom pri čemu je korišten uređaj TGA (TA Instruments, New Castle, DE, SAD). Termogravimetrijska analiza je metoda u kojoj se, pri konstantnoj brzini

zagrijavanja, prate kemijske i fizikalne promjene koje su u funkciji vremena i temperature. TGA analizom može se odrediti gubitak vode, termalna stabilnost uzorka, sadržaj organskih i anorganskih tvari, plastifikatora, razgradnja uzorka, kao i određivanje sadržaja pepela (Shojaei i Azhari, 2018, [www.netzsch-thermal-analysis.com](http://www.netzsch-thermal-analysis.com)). Kao plin korišten je dušik, kako bi se izbjegla oksidacija uzorka pri višim temperaturama.

Izvagana je određena masa praškastog uzorka nakon čega je zagrijana do 150°C u atmosferi dušika protoka 25 ml/min. Brzina zagrijavanja uzorka iznosila je 10°C/min. Sadržaj vlage izračunat je prema formuli:

$$\text{MC (\%)} = \frac{\text{početna masa praška (mg)} - \text{končna masa praška (mg)}}{\text{početna masa praška (mg)}} \times 100$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ISKORIŠTENJE PROCESA PRIPRAVE MIKROSFERA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Mikrosfere su pripravljene metodom sušenja raspršivanjem opisanom u odjeljku 3.2.2. Iskorištenja procesa sušenja (Tablica 4.) bila su u rasponu od 25,2 – 58,5%, što odgovara literaturnim podacima za korištenu metodu (Cabral-Marques i Almeida, 2009). Usporedbom iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem otopina istog sastava, ali različitog dotoka (2,5 ili 4,5 g/min), veća iskorištenja postignuta su pri manjem dotoku sušene otopine (2,5 g/min).

**Tablica 4.** Iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem

UZORAK	KONC. HIPROMELOZE (%, <i>m/V</i> )	KONC. DEKSAMETAZONA (%, <i>m/V</i> )	DOTOK UZORKA (g/min)	ISKORIŠTENJE PROCESA (%)
1	0,2	0,20	2,5	56,7
2	0,2	0,02	2,5	58,5
3	1,0	0,02	2,5	38,8
4	1,0	0,20	2,5	55,0
5	0,2	0,20	4,5	48,2
6	0,2	0,02	4,5	50,7
7	1,0	0,02	4,5	30,9
8	1,0	0,20	4,5	25,2

Cabral-Marques i Almeida (2009) pripravili su kompleks beklometazon dipropionata i  $\gamma$ -ciklodekstrina metodom sušenja raspršivanjem uz iskorištenja u rasponu od 36,2% do 52,8%. Najveće iskorištenje povezuje se s najsporijim dotokom uzorka (5 ml/min), dok je najniže zabilježeno kod najbržeg dotoka (11 ml/min). Priprava alginatnih mikročestica sušenjem raspršivanjem variranjem kapaciteta aspiratora (25, 50 i 75%), dotoka uzorka (2,12 – 5,64 g/min) i izlazne temperature karakterizirana je relativno visokim iskorištenjem (40,2% - 59,6%) (Nižić i sur., 2018). Zaključeno je da su na iskorištenje procesa najviše utjecali kapacitet rada aspiratora i dotok raspršivanog uzorka pri čemu je kod najvećeg kapaciteta rada aspiratora (75%) i kod najmanjeg dotoka uzorka (2,12 g/min) zabilježeno najveće iskorištenje.

Uzimajući u obzir navedene podatke, može se zaključiti da su parametri korišteni u ovom radu odgovarajući za pripravu mikrosfera s deksametazonom metodom sušenja raspršivanjem.

#### 4.2. SADRŽAJ LIJEKA U MIKROSFERAMA

Uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama prikazani su u Tablici 5. Uspješnost uklapanja lijeka iznosila je od  $91,3 \pm 3,3\%$  do  $104,5 \pm 4,9\%$ . Svi uzorci imali su približno jednaku uspješnost uklapanja lijeka iz čega se može zaključiti da sastav i dotok raspršivane otopine nisu značajnije utjecali na promatrano svojstvo.

**Tablica 5.** Uspješnost uklapanja (EE) i sadržaj (DL) deksametazona u mikrosferama

UZORAK	KONC. HIPROMELOZE (%, <i>m/V</i> )	KONC. DEKSAMETAZONA (%, <i>m/V</i> )	DOTOK UZORKA (g/min)	DL (%)	EE (%)
1	0,2	0,20	2,5	$32,9 \pm 0,2$	$98,6 \pm 0,5$
2	0,2	0,02	2,5	$5,0 \pm 0,2$	$104,5 \pm 4,9$
3	1,0	0,02	2,5	$1,5 \pm 0,0$	$91,8 \pm 0,4$
4	1,0	0,20	2,5	$13,8 \pm 0,3$	$96,5 \pm 2,4$
5	0,2	0,20	4,5	$32,4 \pm 0,5$	$97,2 \pm 1,6$
6	0,2	0,02	4,5	$4,4 \pm 0,2$	$91,3 \pm 3,2$
7	1,0	0,02	4,5	$1,6 \pm 0,1$	$100,4 \pm 6,4$
8	1,0	0,20	4,5	$13,2 \pm 0,1$	$92,5 \pm 0,4$

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=2)

Sadržaj lijeka u mikrosferama bio je u rasponu od  $1,5 \pm 0,0\%$  do  $32,9 \pm 0,2\%$  i u uskoj je korelaciji sa sastavom raspršivane otopine. Tako su najveći sadržaj lijeka imale mikrosfere pripravljene iz otopina niže koncentracije hipromeloze (0,2%, *m/V*) i veće koncentracije deksametazona (0,2%, *m/V*), dok su najmanji sadržaj lijeka imale mikrosfere pripravljene raspršivanjem otopina više koncentracije hipromeloze (1%, *m/V*) i niže koncentracije lijeka (0,02%, *m/V*) lijeka.

Flutikazon i mometazon, dva najčešće korištena nazalna kortikosteroida, uglavnom se primjenjuju jednom dnevno u svaku nosnicu, a ovisno o tome radi li se o profilaksi i liječenju ili samo o održavanju uspostavljenog stanja, odjednom se mogu aplicirati jedan ili dva potiska. Jedan potisak spreja koji sadrži navedene kortikosteroide sadrži 50  $\mu$ g lijeka, što znači da se primjenjuju u dozi od 100, odnosno 200  $\mu$ g (www.halmed.hr). Budući da je deksametazon manje potentan od flutikazona i mometazona, njegova dnevna doza iznosi 800  $\mu$ g (Martino i

sur., 2015). Najveća količina praška koja se odjednom može primijeniti u nosnicu je 25 mg (Davis, 1999). Masa mikrosfera s visokim sadržajem deksametazona koja bi se trebala koristiti u terapijske svrhe premala je da bi se mogla reproducibilno primjenjivati, ali pruža mogućnost miješanja s inertnim nosačima u svrhu optimiranja depozicije u nosnoj šupljini (Nižić i sur., 2020; Trows i Scherliess, 2016). Povećanje sadržaja polimera, a smanjenje sadržaja lijeka u mikrosferama rezultira prikladnom količinom praška za nazalnu primjenu, bez potrebe za miješanjem s inertnim nosačem.

### **4.3. BUBRENJE MIKROSFERA**

Bubrenje i stvaranje hidrogela glavna su svojstva polimernih mikrosfera za nazalnu primjenu (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Mikrosfere bubre u kontaktu s nosnom sluznicom uslijed interakcije polimera i sluzi koju izlučuju submukozne žlijezde (Chaturvedi i sur., 2011). Navedeno svojstvo utječe i na oslobađanje lijeka iz mikrosfera, s obzirom da lijek, da bi se oslobodio, mora difundirati kroz izbubreni sloj gela (Martinac i sur., 2005). Bubrenje mikrosfera vezano je i uz svojstvo mukoadhezivnosti mikrosfera. Naime, tijekom procesa bubrenja hidratacija uzrokuje pucanje vodikovih veza između lanaca polimera, a kada interakcija polimera i vode postane jača od interakcije polimer-polimer, slobodni lanci polimera vežu se za epitel. Količina apsorbiranog vodenog medija značajno utječe na stupanj mukoadhezivnosti mikrosfera. Ukoliko je stupanj hidratacije prenizak neće se osloboditi dovoljno postraničnih lanaca polimera, dok prevelika količina apsorbirane vode može dovesti do razrjeđenja otopine polimera što može rezultirati manjim brojem slobodnih funkcionalnih skupina dostupnih za vezanje sa sluznicom te bržom aktivacijom mukocilijarnog sustava i eliminacijom uporabljenog lijeka (Chaturvedi i sur., 2011). Budući da je bubrenje mikrosfera najvećim dijelom određeno sadržajem polimera, različiti omjeri lijeka i polimera kao i različiti omjeri dvaju ili više polimera u formulaciji, rezultiraju različitim bubrenjem. Hipromeloza je zbog svoje sigurnosti i biokompatibilnosti često korišten stabilizirajući polimer u farmaceutskoj industriji pri izradi disperzija sušenjem raspršivanjem (Paudel i sur., 2013; Filipović-Grčić i sur., 2003). Može se koristiti sama ili u kombinaciji s drugim polimerima (Paudel i sur., 2013). U ovom radu, uz hipromelozu korišten je i polimer pektin koji se koristi kao gelirajuće i stabilizirajuće sredstvo te sredstvo za prilagođavanje viskoznosti, a također pokazuje svojstva bubrenja (Sansone i sur., 2011).

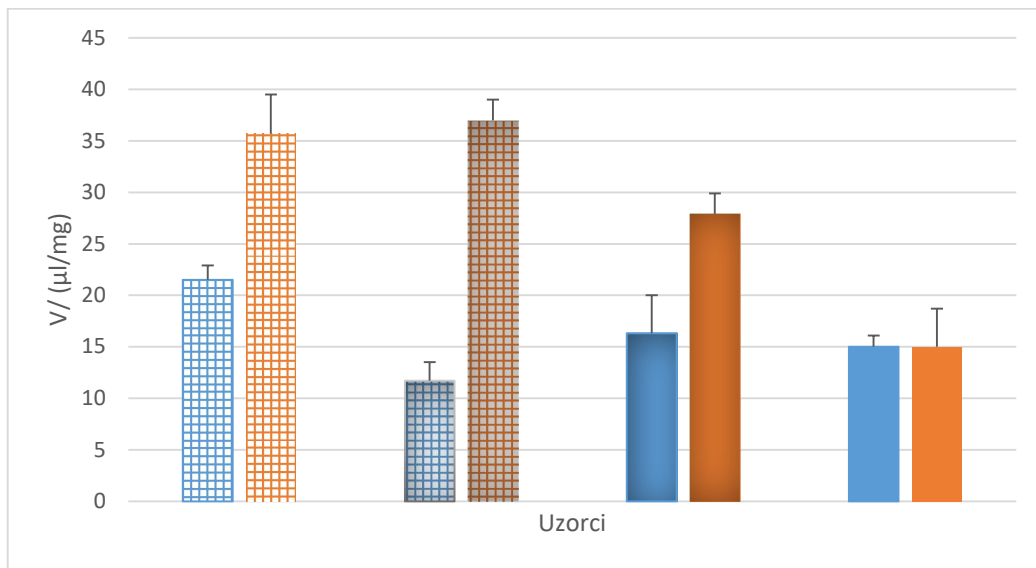
Svojstvo bubrenja mikrosfera ispitano je korištenjem Franzove difuzijske ćelije pri čemu su pročišćena voda i SNF korišteni kao receptorski mediji. Bubrenje mikrosfera izraženo je apsorbiranim volumenom medija (pročišćene vode ili SNF-a) po miligramu mikrosfera kroz 15-minutni proces bubrenja.

Rezultati ispitivanja bubrenja mikrosfera prikazani su na Slici 8. Volumen apsorbirane vode bio je u rasponu od  $18,3 \pm 0,4 \mu\text{l/mg}$  do  $39,2 \pm 3,4 \mu\text{l/mg}$ , dok je volumen apsorbiranog SNF-a bio od  $9,7 \pm 1,4 \mu\text{l/mg}$  do  $21,5 \pm 1,4 \mu\text{l/mg}$ , ovisno o sastavu i brzini dotoka sušene otopine. Mjerenja u kojima je receptorski odjeljak bio napunjen SNF-om rezultirala su vidno manjim volumenom apsorbiranog medija od mjerenja u kojima je receptorski odjeljak bio napunjen vodom. Razlog tome je umrežavanje neesterificiranih karboksilnih skupina pektina dvovalentnim ionima kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) prisutnim u SNF-u (Gawkowska i sur., 2018) što je rezultiralo umjerenim bubrenjem i manjom apsorpcijom SNF-a u odnosu na pročišćenu vodu. Mikrosfere koje su pripravljene pri dotoku sušene otopine od 2,5 g/min karakterizirane su većom sposobnošću bubrenja u odnosu na mikrosfere pripravljene pri dotoku sušene otopine 4,5 g/min. Iako mikrosfere u ovom radu nisu karakterizirane s obzirom na veličinu čestica, može se pretpostaviti da su mikrosfere pripravljene pri sporijem dotoku otopine manjeg promjera i veće ukupne površine od mikrosfera pripremljenih pri bržem dotoku otopine (Katsarov i sur., 2017). Mikrosfere s većom apsorptivnom površinom mogu apsorbirati veći volumen medija (Chegini i Ghobadian, 2005).

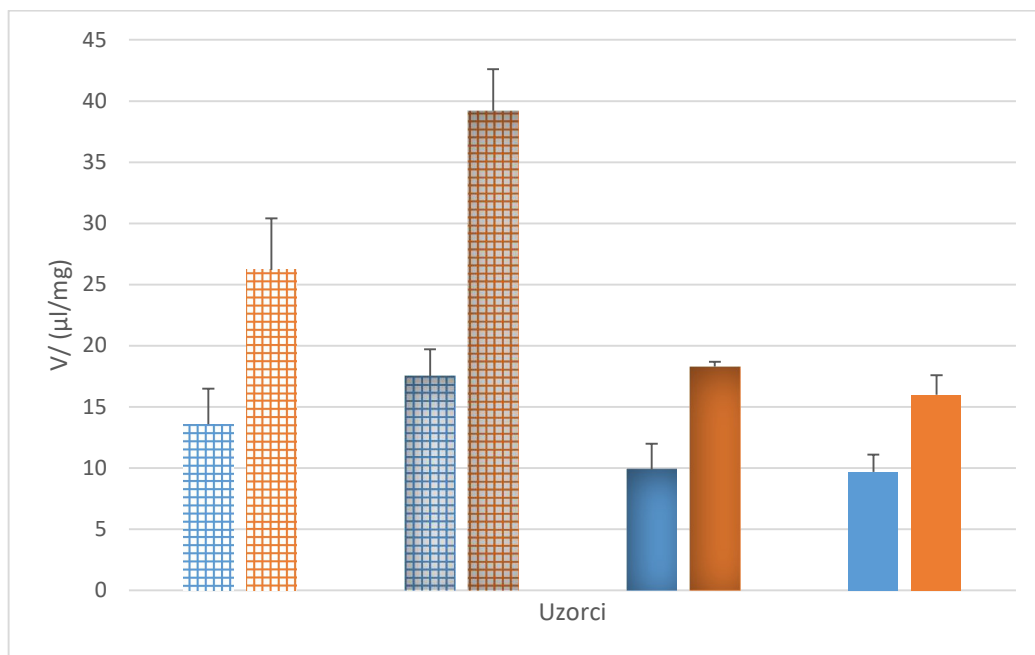
Najbolja svojstva bubrenja imaju mikrosfere pripravljene pri masenom omjeru hipromeloze i pektina 1:1 i deksametazona prema pektinu od 0,1:1, neovisno o brzini dotoka uzorka. Od dva ispitivana masena omjera hipromeloze prema pektinu (1:1 i 5:1) veći je rezultirao smanjenjem kapaciteta bubrenja mikrosfera. Takav negativan utjecaj povećanja sadržaja hipromeloze na svojstva bubrenja već je zabilježen u literaturi (Nižić i sur., 2020; Calvo i sur., 2018). Nadalje, uklopljeni lijek nema svojstva bubrenja, tako da manji maseni omjer lijeka i polimera od dva ispitivana (0,1:1 i 1:1) pridonosi povećanom bubrenju.

Bubrenje mikrosfera u SNF-u ovisilo je i o sastavu i o dotoku sušene otopine te nije moguće sa sigurnošću zaključiti o izdvojenom utjecaju pojedinog parametra na bubrenje mikrosfera. Očekivano je, prema literaturi (Nižić i sur., 2020; Jurišić Dukovski i sur., 2019), bolje svojstvo bubrenja mikrosfera s većim masenim omjerom hipromeloze i pektina (5:1) jer kalcijevi ioni prisutni u SNF-u umrežavaju samo pektin, dok hipromeloza koja pri spomenutom omjeru preteže u sastavu mikrosfera, nesmetano bubri u prisustvu kalcijevih iona (Nižić i sur., 2020).

A)



B)



**Slika 8.** Bubrenje mikrosfera u pročišćenoj vodi (■) i SNF-u (■) pripravljenih sušenjem raspršivanjem pri dotoku sušene otopine od 2,5 g/min (A) i 4,5 g/min (B). Otopine polimera i lijeka sadržavale su 0,2% (*m/V*; kvadratići) ili 1% (*m/V*; ispunjeno) hipromeloze, a koncentracija natrijevog dexametazon fosfata iznosila je 0,02% (*m/V*; osjenčano) ili 0,2% (*m/V*; neosjenčano). Bubrenje je izraženo volumenom vode ili SNF-a apsorbiranom po miligramu mikrosfera u vremenu od 15 minuta. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).



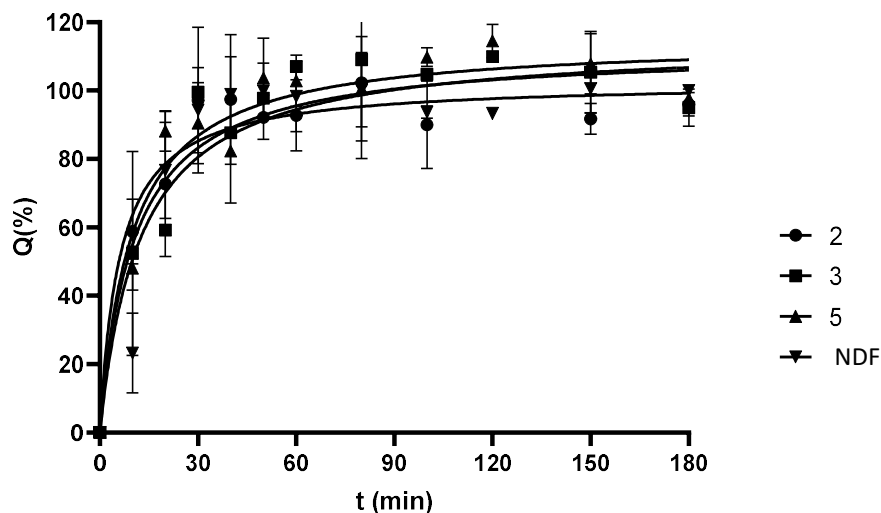
#### 4.4. OSLOBADANJE LIJEKA *IN VITRO*

*In vitro* oslobađanje deksametazona i otapanje krutine deksametazona ispitani su korištenjem Franzove difuzijske ćelije pri čemu je SNF korišten kao receptorski medij. Ta metoda prikladna je za ispitivanje oslobađanja lijeka iz praškastih sustava za nazalnu primjenu jer omogućava sporu hidrataciju uzorka i stvaranje hidrogela što vrlo dobro oponaša uvjete u nosnoj sluznici (Nižić i sur., 2020).

Profili *in vitro* oslobađanja deksametazona iz odabranih polimernih mikrosfera (uzorci 2, 3 i 5) i profil otapanja krutine deksametazona (NDF) prikazani su na Slici 9.

Za odabrane mikrosfere zabilježeno je oslobađanje 48,1% do 58,8% sadržaja uklopljenog lijeka već nakon 10 minuta, a više od 92,7% uklopljenog lijeka oslobođeno je nakon 60 minuta. Takav profil oslobađanja odgovara nazalnoj primjeni lijeka. Naime, prema literaturnim podacima, očekivano vrijeme zadržavanja polimernih mikrosfera na nazalnoj sluznici iznosi do 2 sata (Soane i sur., 2001). Profili oslobađanja lijeka iz mikrosfera nisu se značajnije razlikovali od profila difuzije deksametazona otopljenog u vodi iz donorskog u receptorski odjeljak kroz polupropusnu membranu. Iz toga se može zaključiti da pripravljene mikrosfere nisu usporavale oslobađanje lijeka zahvaljujući dobrim svojstvima bubrenja i topljivosti uklopljenog derivata deksametazona u vodenom mediju.

Jurišić Dukovski i suradnici (2019) ispitivali su oslobađanje deksametazona iz pektinskih mikrosfera pri čemu je uspoređena brzina oslobađanja lijeka iz mikrosfera pripremljenih s uklopljenim lipidno-alginatnim nanočesticama (DNM) i konvencionalnih pektinskih mikrosfera (DM). Prisustvo pektina u mikrosferama rezultiralo je geliranjem, dok su DNM mikrosfere osigurale produljeno oslobađanje u odnosu na DM mikrosfere. Naglo oslobađanje deksametazona primijećeno je kod DM mikrosfera (Jurišić Dukovski i sur., 2019), a isto takvo naglo oslobađanje pokazale su i mikrosfere u ovom radu.



**Slika 9.** Profil *in vitro* oslobađanja deksametazona iz odabranih mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem (uzorci 2, 3 i 5). Koncentracija pektina u svim sušenim otopinama iznosila je 0,2% (*m/V*). Koncentracija hipromeloze iznosila je 0,2% (*m/V*; uzorci 2 i 5) ili 1% (*m/V*, uzorak 3). Koncentracija deksametazona iznosila je 0,02% (*m/V*; uzorci 2 i 3) ili 0,2% (*m/V*, uzorak 5). Uvršten je i profil otapanja krutine deksametazona (NDF). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Oznaka  $Q$  (%) odnosi se na količinu oslobođenog/otopljenog lijeka u vremenu  $t$ .

#### 4.5. SADRŽAJ VLAGE U MIKROSFERAMA

Vlaga u praškastim sustavima ima veliki utjecaj na njihovu stabilnost te bi stoga njezin udio trebao biti niži od 10% (Shan i sur., 2016). U ovom radu sadržaj vlage u mikrosferama iznosio je manje od 10%, točnije, bio je u rasponu od  $3,2 \pm 0,8\%$  do  $9,1 \pm 0,2\%$  (Tablica 6.), što su zadovoljavajuće vrijednosti s obzirom na to da su mikrosfere građene od higroskopskih polimera.

U istraživanju koje je provela Nižić sa suradnicima (2020) sušenjem raspršivanjem pripremljene su mikrosfere pektina i hipromeloze te samo pektina s uklopljenim melatoninom. Za pripravu mikrosfera korišten je Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi, Flawil, Switzerland) sa standardnom sapnicom promjera 0,7 mm. Parametri sušenja bili su sljedeći: ulazna temperatura bila je 145 °C, aspirator je radio na 90% kapaciteta, a protok komprimiranog zraka iznosio je 650-700 NI/h. Sadržaj vlage ispitan je termogravimetrijskom analizom u atmosferi

dušika, a raspon temperature iznosio je od 25 do 500 °C. Sadržaj vlage je u konačnici iznosio  $2,0 \pm 0,3\%$  do  $5,2 \pm 0,2\%$ . Veći postotak vlage zamijećen je kod pektinskih mikrosfera u usporedbi sa mikrosferama pripremljenim iz pektina i hipromeloze, što dovodi do zaključka da prisutnost hipromeloze smanjuje vlažnost produkta. Isti rezultat pokazalo je i ovo istraživanje obzirom da su uzorci s većim masenim omjerom hipromeloze i pektina (5:1) imali manji sadržaj vlage od uzoraka s masenim omjerom 1:1, neovisno o koncentraciji lijeka u sušenoj otopini.

**Tablica 6.** Sadržaj vlage u mikrosferama ovisno o sastavu i dotoku otopine u procesu sušenja raspršivanjem

UZORAK	KONC. HIPROMELOZE (%, <i>m/V</i> )	KONC. DEKSAMETAZONA (%, <i>m/V</i> )	DOTOK UZORKA (g/min)	SADRŽAJ VLAGE (%)
1	0,2	0,20	2,5	$9,2 \pm 0,2$
2	0,2	0,02	2,5	$6,2 \pm 0,4$
3	1,0	0,02	2,5	$3,6 \pm 0,5$
4	1,0	0,20	2,5	$6,6 \pm 0,0$
5	0,2	0,20	4,5	$6,9 \pm 0,6$
6	0,2	0,02	4,5	$5,7 \pm 1,4$
7	1,0	0,02	4,5	$4,1 \pm 0,4$
8	1,0	0,20	4,5	$3,2 \pm 0,8$

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=2)

U istraživanju provedenom od strane Focaroli i suradnika (2019) pripremljeni su praškasti sustavi od trehaloze i leucina pri različitim masenim omjerima, a sušenje raspršivanjem provedeno je na uređaju Büchi Mini Spray Dryer B-290 sa bifluidnom sapnicom promjera 0,7 mm. Sadržaj vlage također je izmjeren termogravimetrijskom analizom i iznosio je između 1,5 i 6,1%, što su također zadovoljavajuće vrijednosti za praškasti sustav. Najveći utjecaj na ostatnu vlagu imali su dotok uzorka i ulazna temperatura plina za sušenje te su uzorci pripremljeni pri višoj ulaznoj temperaturi i manjem dotoku uzorka bili karakterizirani najmanjim postotkom vlage (Focaroli i sur., 2019).

Procesni parametri sušenja raspršivanjem u ovom istraživanju nisu imali puno utjecaja na sadržaj vlage u konačnom produktu te se iz ovog eksperimenta ne može odrediti njihov značaj. Svi uzorci su pripremljeni pri istoj ulaznoj temperaturi plina za sušenje, a kako je utjecaj navedene temperature na sadržaj vlage najveći u odnosu na druge procesne parametre (Rattes i Oliveira, 2007), takav ishod je i očekivan.

## 5. ZAKLJUČCI

- Mikrosfere masenog omjera hipromeloze i pektina od 1:1 i 5:1 i sadržaja deksametazona od 1,5 do 32,9 % uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem pri postavljenim procesnim parametrima (ulazna temperatura 120°C, dotok uzorka 2,5 ili 4,5 g/min, promjer sapnice 0,7 mm, protok komprimiranog zraka 600-700 Nl/h, rad aspiratora na 50% kapaciteta).
- Uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere iznosila je od  $91,3 \pm 3,2\%$  do  $104,5 \pm 4,9\%$ . Nije zabilježen značajniji utjecaj sastava i dotoka raspršivane otopine na promatrano svojstvo mikrosfera.
- Mikrosfere su manje opsežno bubrile u umjetnom nazalnom fluidu (SNF) nego u pročišćenoj vodi, a uslijed umrežavanja pektina ionima kalcija prisutnim u SNF-u.
- Profili oslobađanja lijeka iz mikrosfera slični su profilu otapanja krutine deksametazona. Za odabrane mikrosfere zabilježeno je oslobađanje 48,1 do 58,8% sadržaja uklopljenog lijeka već nakon 10 minuta, a više od 92,7% uklopljenog lijeka oslobođeno je nakon 60 minuta. Takav profil oslobađanja odgovara nazalnoj primjeni mikrosfera, s obzirom na očekivano vrijeme njihovog zadržavanja na nosnoj sluznici.
- Sadržaj vlage u mikrosferama bio je u rasponu od  $3,2 \pm 0,8\%$  do  $9,1 \pm 0,2\%$ , što je prihvatljivo za higroskopne praške. Nije uočena ovisnost sadržaja vlage u mikrosferama o dotoku sušene otopine, što potvrđuje prikladnost postavljenih parametara sušenja za izradu ispitivanih mikrosfera.

## 6. LITERATURA

Allen DB. Systemic effects of intranasal steroids: An endocrinologist's perspective. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106, 179-190.

Bensch GW. Safety of intranasal corticosteroids. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2016, 117, 601-605.

Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal Drug Delivery in Humans. *Curr Probl Dermatol*, 2011, 40, 20-35.

Cabral-Marques H, Almeida R. Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes, *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73, 121-129.

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

Calvo NL, Svetaz LA, Alvarez VA, Quiroga AD, Lamas MC, Leonardi D. Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alter-native dosage form for the treatment of vaginal candidiasis, *Int J Pharm*, 2019, 556, 181-191.

Campbell RG. Risks and management of long-term corticosteroid use in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2018, 26, 1-7.

Castile J, Cheng YH, Simmons B, Perelman M, Smith A, Watts P. Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys®, an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip, *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39, 816-824.

Cave A, Arlett P, Lee E. Inhaled and nasal corticosteroids: Factors affecting the risks of systemic adverse effects. *Pharmacol Ther*, 1999, 83, 153-179.

Chaturvedi M, Kumar M, Pathak K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system, *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2, 215-222.

Chegini GR i Ghobadian B. Effect of Spray-Drying Conditions on Physical Properties of Orange Juice Powder. *Dry Technol*, 2005, 23, 657-668.

Cox L. Approach to Patients with Allergic Rhinitis-Testing and Treatment. *Med Clin N Am*, 2020, 104, 77-94.

Davis SS. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract, *Pharm Sci Technol Today*, 1999, 2, 450-456.

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

Djupesland PG. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective – a review, *Drug Deliv and Transl Res*, 2013, 3, 42-62.

Dolanjski P. Izrada mikrosfera s natrijevim deksametazon fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine pri sušenju raspršivanjem, diplomski rad, 2020

Ebnesajjad S. Introduction to Plastics U: Chemical Resistance of Thermoplastics. Baur E, Ruhrberg K, Woishnis W, urednici, Norwich, Elsevier, 2016, str. 16.

England RJA, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2001, 24, 67-68.

European Medicines Agency (EMA). Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms. Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014.

<https://www.ema.europa.eu/en> , datum pristupa: 15.02.2020.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. <https://www.fda.gov/media/70936/download>, datum pristupa: 06.09 2020.

Filipović-Grčić J, Hafner A. Nasal Powder Drug Delivery. U: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Gad SC, urednik, New Jersey, John Wiley and Sons, 2008, str. 651-681.

Filipović-Grčić J, Perissutti B, Moneghini M, Voinovich D, Martinac A, Jalšenjak I. Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation, *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55, 921-931.

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.

Garbe E, LeLorier J, Boivin JF, Suissa S. Inhaled and nasal glucocorticoids and the risks of ocular hypertension or open-angle glaucoma. *JAMA*, 1997, 277, 722-727.

Gawkowska D, Cybulska J, Zdunek A. Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review, *Polymers*, 2018, 10, 762.

Grzanka A, Misiołek M, Golusiński W, Jarzab J. Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268, 247-253.

Jug M, Hafner A, Lovrić J, Kregar ML, Pepić I, Vanić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. An overview of *in vitro* dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147, 350-366.

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.

Karatzanis A, Chatzidakis A, Milioni A, Vlaminck S, Kawauchi H, Velegrakis S, Prokopakis E. Contemporary Use of Corticosteroids in Rhinology, *Curr Allergy Asthma Rep*, 2017, 17, 11.

Katsarov PD, Pilicheva BA, Manev HM, Lukova PK, Kassarova MI. Optimization of Chitosan Microspheres Spray Drying via 3<sup>2</sup> Full Factorial Design, *Folia Med*, 2017, 59, 310-317.

Kim JE, Cho HJ, Kim DD. Budesonide/cyclodextrin complex-loaded lyophilized microparticles for intranasal application, *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40, 743-748.

Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme TF. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J Control Release*, 2010, 147, 304-310.

Liu L, Fishman ML, Hicks KB. Pectin in controlled drug delivery - A review, *Cellulose*, 2007, 14, 15-24.

Lusina Kregar M, Dürriegl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development and validation of an *in vitro* release method for topical particulate delivery systems. *Int J Pharm*, 2015, 485, 202-214.

Martinac A, Filipović-Grčić J, Perissutti B, Voinovich D, Pavelić Ž. Spray-dried chitosan/ethylcellulose microspheres for nasal drug delivery: Swelling study and evaluation of *in vitro* drug release properties, *J Microencapsul*, 2005, 22, 549-561.

Martino BJ, Church CA, Seiberling K. Effect of intranasal dexamethasone on endogenous cortisol level and intraocular pressure, *Int Forum Allergy Rhinol*, 2015, 5, 605-609.

Mullol J, Obando A, Pujols L, Alobid I. Corticosteroid treatment in chronic rhinosinusitis: The possibilities and the limits. *Immunol Allergy Clin*, 2009, 657-668.

Netzsch. Thermogravimetric Analysis (TGA), <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/contract-testing/methods/thermogravimetric-analysis/>, datum pristupa: 03.08.2020.

Nižić L. Utjecaj brzine dotoka uzorka i protoka medija za sušenje na svojstva alginatnih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem, diplomski rad, 2017.

Nižić L, Keser S, Duvnjak Romić M, Hafner A. Utjecaj parametara sušenja raspršivanjem na svojstva alginatnih mikročestica, *Farm Glas*, 2018, 74, 619-632.

Nižić L, Potaš J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M, Jug M, Hafner A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141, 105-115.

Ohtake S, Shalaev E. Effect of Water on the Chemical Stability of Amorphous Pharmaceuticals: I. Small Molecules. *J Pharm Sci*, 2013, 102, 1139-1154.

Ohtake S, Feng S, Shalaev E. Effect of Water on the Chemical Stability of Amorphous Pharmaceuticals: 2. Deamidation of Peptides and Proteins, *J Pharm Sci*, 2018, 107, 42-56.

Opatowsky I, Feldman RM, Gross R, Feldman ST. Intraocular pressure elevation associated with inhalation and nasal corticosteroids. *Ophthalmology*, 1995, 102, 177-179.

Padivitage NLT, Smuts JP, Armstrong DW. Water determination. U: Specification of Drug Substances and Products: Development and Validation of Analytical Methods. Riley CM, Rosanske TW, Rabel Riley SR, urednici, Oxford, Elsevier, str. 223-241.

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.



PerkinElmer, FAQ Beginners Guide to Thermogravimetric Analysis, [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE\\_TGABeginnersGuide.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_TGABeginnersGuide.pdf), datum pristupa: 06.09.2020.

Pozzoli M, Traini D, Young PM, Sukkar MB, Sonvico F. Development of a Soluplus budesonide freeze-dried powder for nasal drug delivery, *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43, 1510-1518.

Pujols L, Mullol J, Pérez M, Roca-Ferrer J, Juan M, Xaubet A, Cidrowski JA, Picado C. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24, 49-57.

Rattes AL i Oliveira WP. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles, *Powder Technol*, 2007, 1, 7-14.

Rumondor ACF, Taylor LS. Effect of polymer hygroscopicity on the phase behavior of amorphous solid dispersions in the presence of moisture, *Mol Pharm*, 2010, 7, 477-490.

Sansone F, Mencherini T, Picerno P, d'Amore M, Aquino RP, Lauro MR. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts, *J Food Eng*, 2011, 105, 468-476.

Santos D, Maurício AC, Sencadas V, Domingos Santos J, Fernandes MH, Gomes PS. Spray Drying: An Overview. Biomaterials – Physics and Chemistry – New Edition, *IntechOpen*, 2017.

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

Shan L, Tao EX, Meng QH, Hou, WX, Liu K, Shang HC, Tang JB, Zhang WF. Formulation, optimization, and pharmacodynamic evaluation of chitosan/phospholipid/ $\beta$ -cyclodextrin microspheres, *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10, 417-429.

Shojaei TR i Azhari S. Fabrication, functionalization, and dispersion of carbon nanotubes. U: Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures, Hamdy Makhoul AS, Barhoum A, urednici, Philadelphia, Elsevier, 2018, 501-531.

Singh I i Aboul-Enein HY. Advantages of USP Apparatus IV (Flow-through Cell Apparatus) in Dissolution Studies, *J Iran Chem Soc*, 2006, 3, 220-222.

Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100, 27-50.

Soane RJ, Hinchcliffe M, Davis SS, Illum L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity, *Int J Pharm*, 217, 183-191.

Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Col Inter Sci*, 2015, 223, 40-54.

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.

Tonon RV, Freitas SS, Hubinger MD. Spray Drying of Açai (*Euterpe oleraceas Mart.*) Juice: Effect of Inlet Air Temperature and Type of Carrier Agent, *J Food Process. Preserv*, 2011, 35, 691-700.

Trows S, Scherliess R. Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccinesutilizing BSA as model drug, *Powder Technol*, 2016, 292, 223-231.

Valenzuela CV, Liu JC, Vila PM, Simon L, Doering M, Lieu JEC. Intranasal Corticosteroids Do Not Lead to Ocular Changes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Laryngoscope*, 2018, 129, 6-12.

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

Zhou X, Hines P, Borer WM. Moisture determination in hygroscopic drug substances by near infrared spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 17, 219-225.

Zitt M, Kosoglou T, Hubbell J. Mometasone Furoate Nasal Spray: A Review of Safety and Systemic Effects. *Drug Saf*, 2007, 30, 317-326.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena kortikosteroida veoma je zastupljena u liječenju bolesti nosne sluznice. Najčešći farmaceutski oblik za nazalnu primjenu kortikosteroida je suspenzija. Kao tekući oblik, suspenzija je podložna curenju iz nosne šupljine i mukocilijarnom klirensu. Praškasti sustavi mogu osigurati dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici te veću stabilnost uz manju upotrebu konzervansa u odnosu na tekuće oblike za nazalnu primjenu. Sušenje raspršivanjem prikladna je metoda izrade praškastih sustava, s mogućnošću prilagodbe procesnih i formulacijskih parametara u svrhu dobivanja željenih fizičko-kemijskih svojstava konačnog produkta.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti mikrosfere za nazalnu primjenu deksametazona (u obliku natrijevog deksametazon fosfata) temeljene na pektinu i hipromelozi metodom sušenja raspršivanjem te ispitati utjecaj koncentracije sastavnica i dotoka uzorka na iskorištenje procesa, sadržaj lijeka u mikrosferama, svojstva bubrenja mikrosfera, profil oslobađanja lijeka te sadržaj vlage. Mikrosfere masenog omjera hipromeloze i pektina od 1:1 i 5:1 i sadržaja lijeka od 1,5 do 32,9 % uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem uz korištenje sapnice promjera 0,7 mm te pri ulaznoj temperaturi plina za sušenje od 120°C, dotoku sušene otopine od 2,5 ili 4,5 g/min, protoku komprimiranog zraka 600-700 Nl/h te radu aspiratora na 50% kapaciteta. Postignuta je velika uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere ( $91,3 \pm 3,2\%$  do  $104,5 \pm 4,9\%$ ) neovisno o sastavu i dotoku raspršivane otopine. Mikrosfere su u procesu bubrenja apsorbirale manji volumen umjetnog nazalnog fluida (SNF) nego pročišćene vode, a uslijed umrežavanja pektina ionima kalcija prisutnim u SNF-u. Profili oslobađanja lijeka iz mikrosfera slični su profilu otapanja krutine natrijevog deksametazon fosfata. Već nakon 10 minuta, iz mikrosfera je oslobođeno 48,1 do 58,8% uklopljenog lijeka, a više od 92,7% uklopljenog lijeka oslobođeno je nakon 60 minuta. Takav profil oslobađanja odgovara nazalnoj primjeni mikrosfera, s obzirom na očekivano vrijeme njihovog zadržavanja na nosnoj sluznici. Sadržaj vlage u mikrosferama bio je u rasponu od  $3,2 \pm 0,8\%$  do  $9,1 \pm 0,2\%$ , što je prihvatljivo za higroskopne praške. Nije uočena ovisnost sadržaja vlage u mikrosferama o dotoku sušene otopine, čime je potvrđena prikladnost postavljenih parametara sušenja za izradu ispitivanih mikrosfera.

Nasal drug administration of corticosteroids is widely used in the treatment of nasal mucosa disorders. The most common pharmaceutical form of nasal corticosteroids is suspension. Being a liquid formulation, suspension is susceptible to leakage from the nasal cavity and mucociliary clearance. Powders may assure prolonged drug retention at the nasal mucosa and improved stability with reduced use of preservatives compared to nasal liquid formulations. Spray drying is a suitable method for the preparation of powders, with the possibility of adjusting process and formulation parameters in order to achieve targeted physicochemical properties of the final product.

The aim of this thesis was to prepare spray dried pectin/hypromellose microspheres for nasal application of dexamethasone (in the form of dexamethasone sodium phosphate) and to evaluate the influence of feed composition and flow rate on the process yield, microsphere drug loading, swelling properties, drug release and moisture content. Microspheres with hypromellose to pectin weight ratio of 1:1 and 5:1 and drug loading of 1.5 to 32.9% were successfully prepared by spray drying method using 0.7 mm nozzle, at inlet temperature of 120°C, feed flow rates of 2.5 or 4.5 g/min, compressed air flow rate of 600-700 NI/h and 50% of aspirator capacity. High entrapment efficiency of drug in microspheres was achieved ( $91.3 \pm 3.2\%$  to  $104.5 \pm 4.9\%$ ) regardless of the feed composition and flow rate. Microspheres absorbed less volume of simulated nasal fluid (SNF) compared to distilled water, due to pectin crosslinking with calcium ions present in SNF. Drug release profiles from microspheres were similar to dissolution profile of solid dexamethasone sodium phosphate. In only 10 minutes, 48.1 to 58.8% of the entrapped drug was released from the microspheres, and more than 92.7% of the entrapped drug was released in 60 minutes. Such release profile is suitable for nasal route of administration, considering the expected microsphere residence time at the nasal mucosa. The moisture content of the microspheres ranged from  $3.2 \pm 0.8\%$  to  $9.1 \pm 0.2\%$ , which is considered acceptable for hygroscopic powders. The relationship between moisture content in microspheres and feed flow rate was not observed, which confirmed the suitability of spray drying parameters employed in the production of the microspheres.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### **IN VITRO KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH MIKROSFERA ZA NAZALNU PRIMJENU DEKSAMETAZONA**

**Julia Ružić**

#### **SAŽETAK**

Nazalna primjena kortikosteroida veoma je zastupljena u liječenju bolesti nosne sluznice. Najčešći farmaceutski oblik za nazalnu primjenu kortikosteroida je suspenzija. Kao tekući oblik, suspenzija je podložna curenju iz nosne šupljine i mukocilijarnom klirensu. Praškasti sustavi mogu osigurati dulje zadržavanje lijeka na nosnoj sluznici te veću stabilnost uz manju upotrebu konzervansa u odnosu na tekuće oblike za nazalnu primjenu. Sušenje raspršivanjem prikladna je metoda izrade praškastih sustava, s mogućnošću prilagodbe procesnih i formulacijskih parametara u svrhu dobivanja željenih fizičko-kemijskih svojstava konačnog produkta.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti mikrosfere za nazalnu primjenu deksametazona (u obliku natrijevog deksametazon fosfata) temeljene na pektinu i hipromelozi metodom sušenja raspršivanjem te ispitati utjecaj koncentracije sastavnica i dotoka uzorka na iskorištenje procesa, sadržaj lijeka u mikrosferama, svojstva bubrenja mikrosfera, profil oslobađanja lijeka te sadržaj vlage. Mikrosfere masenog omjera hipromeloze i pektina od 1:1 i 5:1 i sadržaja lijeka od 1,5 do 32,9 % uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem uz korištenje sapnice promjera 0,7 mm te pri ulaznoj temperaturi plina za sušenje od 120°C, dotoku sušene otopine od 2,5 ili 4,5 g/min, protoku komprimiranog zraka 600-700 Nl/h te radu aspiratora na 50% kapaciteta. Postignuta je velika uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere ( $91,3 \pm 3,2\%$  do  $104,5 \pm 4,9\%$ ) neovisno o sastavu i dotoku raspršivane otopine. Mikrosfere su u procesu bubrenja apsorbirale manji volumen umjetnog nazalnog fluida (SNF) nego pročišćene vode, a uslijed umrežavanja pektina ionima kalcija prisutnim u SNF-u. Profili oslobađanja lijeka iz mikrosfera slični su profilu otapanja krutine natrijevog deksametazon fosfata. Već nakon 10 minuta, iz mikrosfera je oslobođeno 48,1 do 58,8% uklopljenog lijeka, a više od 92,7% uklopljenog lijeka oslobođeno je nakon 60 minuta. Takav profil oslobađanja odgovara nazalnoj primjeni mikrosfera, s obzirom na očekivano vrijeme njihovog zadržavanja na nosnoj sluznici. Sadržaj vlage u mikrosferama bio je u rasponu od  $3,2 \pm 0,8\%$  do  $9,1 \pm 0,2\%$ , što je prihvatljivo za higroskopne praške. Nije uočena ovisnost sadržaja vlage u mikrosferama o dotoku sušene otopine, čime je potvrđena prikladnost postavljenih parametara sušenja za izradu ispitivanih mikrosfera.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica i 68 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mikrosfere; Deksametazon; Sušenje raspršivanjem; Iskorištenje procesa; Sadržaj vlage; Bubrenje mikrosfera; Oslobađanje deksametazona

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ***IN VITRO* CHARACTERIZATION OF POLYMER MICROSPHERES FOR DEXAMETHASONE NASAL DELIVERY**

**Julia Ružić**

#### **SUMMARY**

Nasal drug administration of corticosteroids is widely used in the treatment of nasal mucosa disorders. The most common pharmaceutical form of nasal corticosteroids is suspension. Being a liquid formulation, suspension is susceptible to leakage from the nasal cavity and mucociliary clearance. Powders may assure prolonged drug retention at the nasal mucosa and improved stability with reduced use of preservatives compared to nasal liquid formulations. Spray drying is a suitable method for the preparation of powders, with the possibility of adjusting process and formulation parameters in order to achieve targeted physicochemical properties of the final product.

The aim of this thesis was to prepare spray dried pectin/hypromellose microspheres for nasal application of dexamethasone (in the form of sodium dexamethasone phosphate) and to evaluate the influence of feed composition and flow rate on the process yield, microsphere drug loading, swelling properties, drug release and moisture content. Microspheres with hypromellose to pectin weight ratio of 1:1 and 5:1 and drug loading of 1.5 to 32.9% were successfully prepared by spray drying method using 0.7 mm nozzle, at inlet temperature of 120°C, feed flow rates of 2.5 or 4.5 g/min, compressed air flow rate of 600-700 Nl/h and 50% of aspirator capacity. High entrapment efficiency of drug in microspheres was achieved ( $91.3 \pm 3.2\%$  to  $104.5 \pm 4.9\%$ ) regardless of the feed composition and flow rate. Microspheres absorbed less volume of simulated nasal fluid (SNF) compared to distilled water, due to pectin crosslinking with calcium ions present in SNF. Drug release profiles from microspheres were similar to dissolution profile of solid sodium dexamethasone phosphate. In only 10 minutes, 48.1 to 58.8% of the entrapped drug was released from the microspheres, and more than 92.7% of the entrapped drug was released in 60 minutes. Such release profile is suitable for nasal route of administration, considering the expected microsphere residence time at the nasal mucosa. The moisture content of the microspheres ranged from  $3.2 \pm 0.8\%$  to  $9.1 \pm 0.2\%$ , which is considered acceptable for hygroscopic powders. The relationship between moisture content in microspheres and feed flow rate was not observed, which confirmed the suitability of spray drying parameters employed in the production of the microspheres.

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

Thesis includes: 40 pages, 9 figures, 6 tables and 68 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Microspheres; Dexamethasone; Spray drying; Process yield; Moisture content; Swelling of microspheres; Dexamethasone release

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

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

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

**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020