

Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi za nazalnu primjenu natrijevog deksametazon fosfata

Pačarić, Matea

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:163:525452>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Pačarić

**Mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi za
nazalnu primjenu natrijevog deksametazon
fosfata**

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 u 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 mentorici, izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na prenesenom znanju, stručnim savjetima i strpljenju prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici Lauri Nižić, mag.pharm. na uloženom vremenu, svim savjetima i pomoći oko izrade praktičnog dijela diplomskog rada te svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci za vrijeme studiranja, a posebno mami i tati – bez vas ništa ne bi bilo moguće.

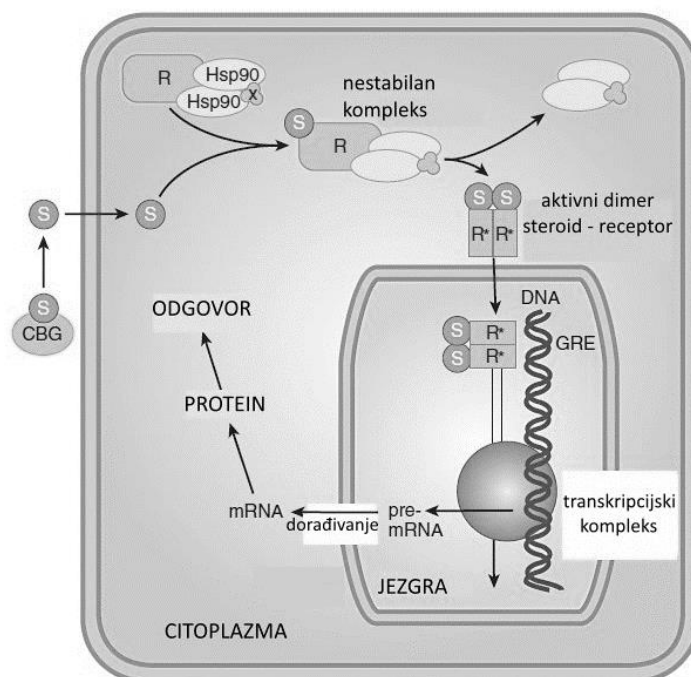
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Djelovanje i primjena natrijevog deksametazon fosfata	1
1.2. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu.....	5
1.2.1. Mikrosfere	5
1.3. Polimeri za pripravu mikrosfera	6
1.3.1. Pektin.....	7
1.3.2. Hipromeloza (hidroksipropilmetilceluloza)	11
1.4. Sušenje raspršivanjem.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Priprava otopina polimera i lijeka za sušenje raspršivanjem.....	16
3.2.2. Priprava mikrosfera sušenjem raspršivanjem	17
3.2.3. Određivanje iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem	18
3.2.4. Određivanje veličine mikrosfera.....	18
3.2.5. Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka u mikrosfere.....	19
3.2.6. Ispitivanje bubrenja mikrosfera	19
3.2.7. Ispitivanje oslobađanja lijeka <i>in vitro</i>	20
3.2.8. Određivanje sadržaja natrijevog deksametazon fosfata	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Priprema mikrosfera.....	22
4.2. Veličina čestica.....	23
4.3. Svojstva bubrenja mikrosfera	25
4.4. Uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama	26
4.5. <i>In vitro</i> oslobađanje lijeka	27
5. ZAKLJUČCI	29
6. LITERATURA	30
7. SAŽETAK / SUMMARY	38
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card	

1. UVOD

1.1. DJELOVANJE I PRIMJENA NATRIJEVOG DEKSAMETAZON FOSFATA

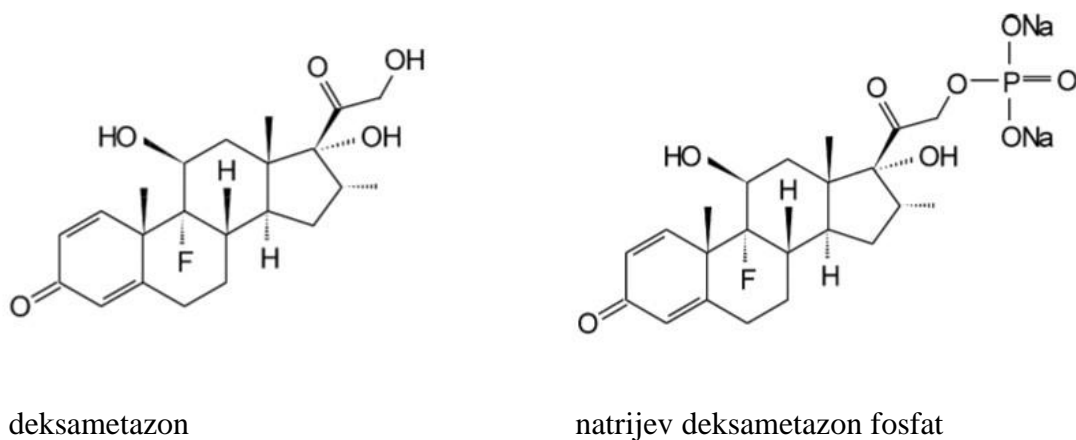
Glukokortikoidi su među vodećim lijekovima u terapiji brojnih upalnih, imunoloških, hematoloških i drugih poremećaja, što je potaknulo razvoj brojnih sintetskih steroida s protuupalnom i imunosupresivnom aktivnošću. Većinu učinaka ostvaruju djelovanjem na široko rasprostranjene glukokortikoidne receptore iz superporodice nuklearnih receptora u koje ubrajamo receptore za steroide, vitamin D, tiroidne hormone i retinoičnu kiselinu te brojne druge receptore s nepoznatim ligandima. U odsutnosti hormona, glukokortikoidni receptori (Slika 1.) se nalaze u citoplazmatskom kompleksu s proteinima toplinskog šoka (Katzung, 2011). Glukokortikoidi su lipofilne molekule koje lako prolaze staničnu membranu i vežu se na glukokortikoidni receptor, pri čemu dolazi do njegove alosteričke promjene i disocijacije proteina toplinskog šoka. Novonastali kompleks hormona i receptora premješta se u jezgru i veže na dio molekule DNA koji odgovara na glukokortikoide (engl. *glucocorticoid response element*) te posljedično regulira transkripciju mRNA, odnosno dovodi do inhibicije ili aktivacije ekspresije ciljnih gena. Protupalni učinak glukokortikoida uglavnom se zasniva na inhibiciji ekspresije proinflamatornih gena (Van der Laan, 2008).



Slika 1. Shematski prikaz interakcije steroidnog hormona *S* i receptora *R* te posljedičnih događaja u stanici (preuzeto i prilagođeno prema Katzung, 2011)

Upalu karakterizira ekstravazacija leukocita i infiltracija u zahvaćeno tkivo koja se odvija nizom složenih interakcija između adhezijskih molekula na leukocitima i onih na endotelnim stanicama. Glukokortikoidi inhibiraju te interakcije i tako smanjuju koncentraciju, distribuciju i aktivnost perifernih leukocita te suprimiraju učinak citokina, kemokina i drugih upalnih medijatora. Osim djelovanja na leukocite, glukokortikoidi utječu na imunosti odgovor inhibicijom fosfolipaze A₂ i posljedičnim smanjenjem sinteze prostaglandina, leukotriena i faktora aktivacije trombocita (Katzung, 2011).

Deksametazon (Slika 2.) je sintetski glukokortikoid s 25 do 30 puta većom glukokortikoidnom aktivnošću u odnosu na kortizol (www.halmed.hr). Natrijev deksametazon fosfat (NDP) je njegov vodotopljivi esterski prolijek i općenito jedan od najlakše topljivih steroida, što ga čini pogodnim za parenteralne pripravke, inhalate i topikalne pripravke (Gagné i Lodge, 1980). Fosfatni ester ima dvije ionizacijske skupine (pK_{a1}=2,0 i pK_{a2}=6,0) pa je pri fiziološkim uvjetima dianion (Cázares-Delgado i sur., 2010). Prolijek se djelovanjem fosfataza brzo aktivira u deksametazon (Zhang i sur., 2011).



Slika 2. *Struktura deksametazona i natrijevog deksametazon fosfata (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2011)*

Glukokortikoidi su široko primjenjivani, a neke od indikacija su: endokrine i reumatske bolesti, kožne i alergijske bolesti koje ne reagiraju na konvencionalno liječenje, očne bolesti kod kojih je ugrožen vid, ulcerozni kolitis, Chronova bolest, upalne bolesti bubrega i dišnih organa, palijativno liječenje pacijenata s malignim bolestima (www.halmed.hr).

Kronična oralna primjena može rezultirati razvojem ozbiljnih sistemskih nuspojava kao što su osteoporozna, usporenje rasta i dugotrajno zatajenje nadbubrežnih žlijezda, pretilost, dijabetes, Cushingov sindrom, mišićna atrofija i dr. (Katzung, 2011). Zbog toga je u interesu zamijeniti oralnu primjenu lokalnom primjenom terapijskih sustava s kontroliranim i kontinuiranim oslobađanjem lijeka na mjestu primjene, a s ciljem smanjenja rizika za razvoj nuspojava. Do danas je poznato više različitih terapijskih sustava s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP), a neki od istraživanih prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. *Primjeri istraživanih terapijskih sustava s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP)*

TERAPIJSKI SUSTAV	PUT PRIMJENE	CILJ ISTRAŽIVANJA	KOMENTAR	LITERATURA
nanočestice	subkonjunktivalna injekcija	kontroliranim oslobađanjem lijeka iz formulacije produljiti učinak na mjestu primjene	povećana učinkovitost terapije i adherencija pacijenata s autoimunim uveitisom	Luo i sur., 2019
mikrosfere	oftalmička primjena	odgoditi hidrolizu prolijeka i produljiti njegovo oslobađanje	omogućena opetovana primjena terapijske doze lijeka s manjim rizikom od nuspojava	Bucataruiu i sur., 2016
<i>in situ</i> termoreverzibilni gel	intraperitonealna primjena	razviti formulaciju termoreverzibilnog bioadhezivnog dugodjelujućeg gela za intraperitonealnu primjenu tijekom abdominalnih operacija	potrebno je ispitati sposobnost adhezije formulacija u peritoneumu i profil oslobađanja lijeka	Arbealez-Camargo i sur., 2016

supramolekularni hidrogel	intraokularna primjena	razvoj biokompatibilnog i sigurnog terapijskog sustava s ciljem poboljšanja ishoda liječenja upalne bolesti oka	dobivena terapijska alternativa za neinfektivni uveitis s minimalnim rizikom zamućenja leće i pojave zavojitosti žila očne pozadine	Wu i sur., 2017
film	oftalmička primjena	povećati bioraspoloživost lijeka primjenom biopolimernog filma koji adherira na površinu oka	mjerenjem biološkog odgovora može se pratiti uspješnost dostave lijeka uklopljenog u hijaluronski film	Calles i sur., 2016
EryDex System – crvene krvne stanice s uklopljenim NDP-om	parenteralna primjena	postići kontrolirano oslobađanje lijeka i smanjiti neželjene nuspojave	eritrocitne fosforilaze postupno defosforiliraju NDP u deksametazon koji sporo difundira iz eritrocita	Coker i sur., 2018

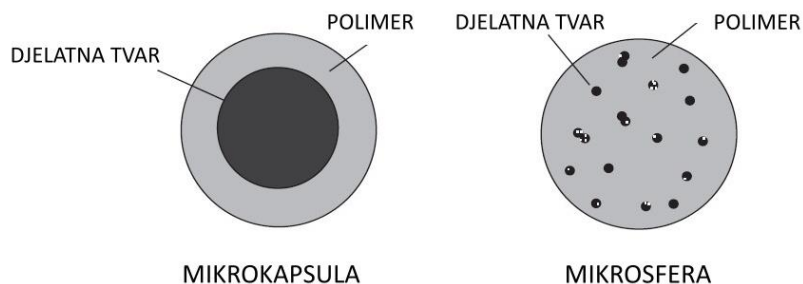
U Republici Hrvatskoj na tržištu se nalaze četiri registrirana pripravka koji kao djelatnu tvar sadrže deksametazon u obliku natrijevog deksametazon fosfata. Među njima su zastupljeni sljedeći farmaceutski oblici: otopina za injekciju/infuziju, kapi za oko (otopina) i gel za oko (www.halmed.hr).

1.2. PRAŠKASTI SUSTAVI ZA NAZALNU PRIMJENU

Nazalna primjena lijekova s lokalnim učinkom prvi je izbor u prevenciji i liječenju bolesti nosne sluznice kao što su alergijski rinitis i kongestija nosa jer se brzo otklanjaju simptomi bolesti, a smanjen je rizik za razvoj sistemskih nuspojava u usporedbi s oralnom ili parenteralnom primjenom lijekova. Za lokalno djelovanje potrebne su značajno manje doze lijeka, no ograničen volumen tekućeg pripravka koji se može primijeniti u nosnicu (25-200 μL) i uklanjanje lijeka iz nosne šupljine mukocilijarnim klirensom predstavljaju ograničenja za nazalnu primjenu tekućih pripravaka (Hafner i sur., 2014). Praškasti sustavi bubrenjem polimernog matriksa omogućuju nastanak mukoadhezivnog gela u nosnoj šupljini. Na taj način produljuje se vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene i smanjuje uklanjanje lijeka mukocilijarnim klirensom. Difuzijom lijeka iz polimernog matriksa modificira se njegov profil oslobađanja (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Praškasti sustavi osiguravaju veću stabilnost u usporedbi s tekućim formulacijama, a budući da je smanjena i potreba za dodatkom pomoćnih tvari kao što su konzervansi, povećana je sigurnost primjene lijeka. Balansiranim bubrenjem, mukoadhezijom i oslobađanjem lijeka u kontaktu s nosnim fluidom, produljuje se kontakt s nosnom sluznicom i povećava terapijski učinak na mjestu primjene (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

1.2.1. MIKROSFERE

Mikrosfere su polimerni terapijski sustavi koji omogućuju stabilizaciju djelatne tvari, ciljanu dostavu lijeka, kontrolirano oslobađanje, smanjenje nuspojava i toksičnosti (Vehring i sur., 2007). Morfološki ih možemo opisati prema obliku, promjeru, unutarnjoj strukturi i površinskim svojstvima. Mogu biti promjera od 1 do 1000 μm , a za nazalnu primjenu obično se koriste promjera 45 μm u izbubrenom stanju (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Prema smjernicama Europske agencije za lijekove za farmaceutsku kvalitetu inhalacijskih proizvoda i proizvoda za nazalnu primjenu, promjer čestica za nazalnu primjenu treba biti veći od 10 μm (www.ema.europa.eu). Ovisno o tome je li djelatna tvar sadržana u jezgri čestice koja je obložena polimernom ovojnicom ili je djelatna tvar dispergirana u polimernom matriksu, razlikujemo redom mikrokapsule i mikrosfere (Slika 3).



Slika 3. Polimerni sustavi – mikrokapsula i mikrosfera (preuzeto i prilagođena prema Tamilvanan, 2008)

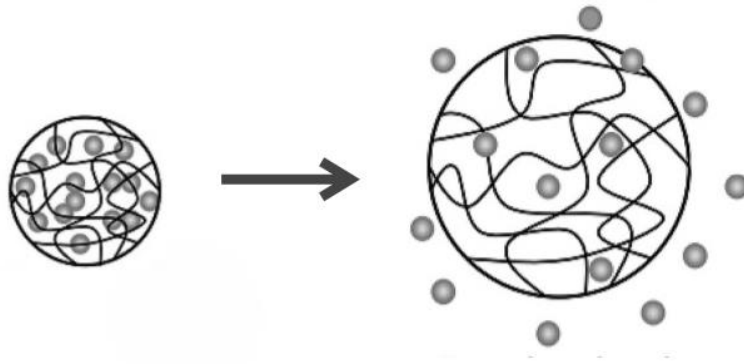
Svi tipovi mikrosfera koji se primjenjuju nazalno su netopljivi u malom volumenu nosne tekućine, ali apsorbiraju vodu, što rezultira bubrenjem i stvaranjem gela (Pereswetoff-Morath, 1998). Zahvaljujući mukoadheziji produljen je kontakt s nosnom sluznicom te povećana apsorpcija i bioraspoloživost uklopljenog lijeka na mjestu djelovanja (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Za hidrofilne lijekove, osim zbog adhezije, apsorpcija se povećava i otvaranjem čvrstih spojeva između epitelnih stanica sluznice. Kada mikrosfere vežu vodu i bubre, epitelne stanice dehidriraju i razmiču se, osiguravajući tako lakšu penetraciju lijeka (Pereswetoff-Morath, 1998).

Najčešće korištene metode za pripremu mikrosfera su odjeljivanje faza iz vodenih i nevodenih medija (koacervacija), sušenje raspršivanjem, odjeljivanje faza emulzije isparavanjem ili ekstrakcijom otapala te odjeljivanje nastalih krutih čestica (Jalšenjak i sur., 1998).

1.3. POLIMERI ZA PRIPRAVU MIKROSFERA

Za pripremu mikrosfera koriste se visokomolekularni polimeri koji mogu formirati vodikove, ionske, hidrofobne i Van der Waalsove veze (Smart, 2005). Stupanj umreženosti polimera i sposobnost bubrenja obrnuto su proporcionalni, tj. što je veća umreženost, to je manja mogućnost vezanja vode i bubrenje je manje. Osim funkcionalnih skupina, na sposobnost adhezije utječe i molekulska masa polimera, zatim koncentracija, fleksibilnost polimernog lanca, vrijeme kontakta s mukozom, pH te fiziološki faktori kao što su izmjena mucina i trenutno stanje bolesti (Filipović-Grčić i Hafner, 2008).

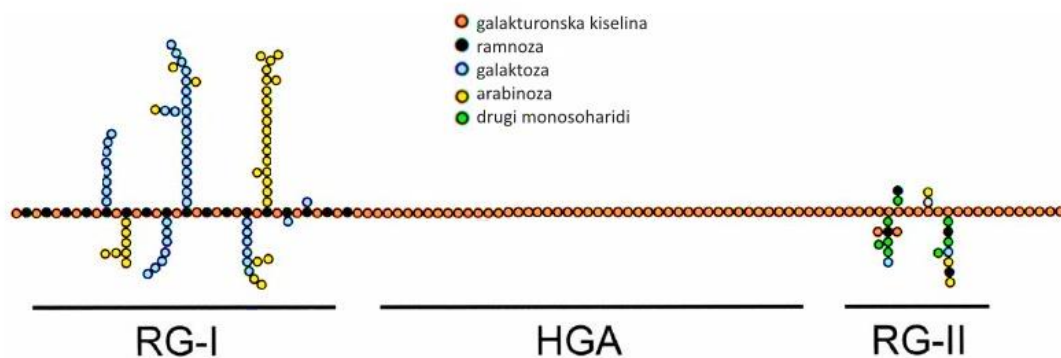
Polimeri za pripremu mukoadhezivnih mikrosfera su biorazgradljivi i biokompatibilni te u kontaktu s nosnim fluidom osiguravaju bubrenje mikrosfera, formiranje gela i oslobađanje lijeka difuzijom (Slika 4.) (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004).



Slika 4. Shematski prikaz nastanka strukture gela bubrenjem polimera i oslobađanje lijeka difuzijom (prilagođeno prema Vijayakumar i Subramanian, 2016)

1.3.1. PEKTIN

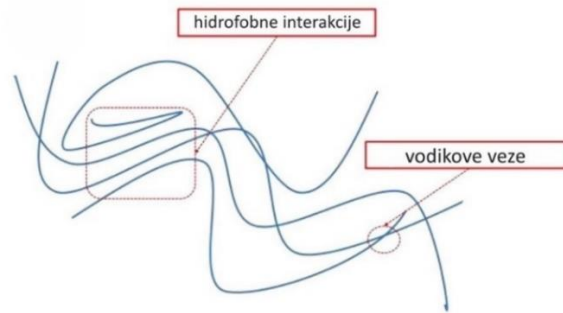
Pektini su raznolika skupina biopolimera s polisaharidnom okosnicom koju čine molekule D-galakturonske kiseline povezane α -1,4-glikozidnom vezom, a može sadržavati i ramnozu, galaktozu i arabinozu. Točna kemijska struktura pektina nije definirana, a najbolje je prihvaćen model koji uključuje nekoliko strukturnih domena – homogalakturonan (HGA) , ramnogalakturonan I (RG-I) i ramnogalakturonan II (RG-II) (Slika 5.). Prirodni izvor pektina su biljke u kojima pektin čini jednu trećinu stanične stijenke (Chan i sur., 2017). Najčešće se dobiva ekstrakcijom iz kore citrusa i suhog ostatka dobivenog nakon mljevenja i prešanja jabuka (Sriamornsak, 2003). Nakon sinteze i oslobađanja iz Golgijevog aparata, biljni pektin je visoko metoksiliran, što se kasnije može modificirati kemijski ili djelovanjem metil-esteraza (Gawkowska i sur., 2018).



Slika 5. Pojednostavljen shematski prikaz fragmenta pektina koji se sastoji od 3 domene – ramnogalakturonan I (RG-I), homogalakturonan (HGA) i ramnogalakturonan II (RG-II). (Preuzeto i prilagođeno prema Willats i sur., 2001)

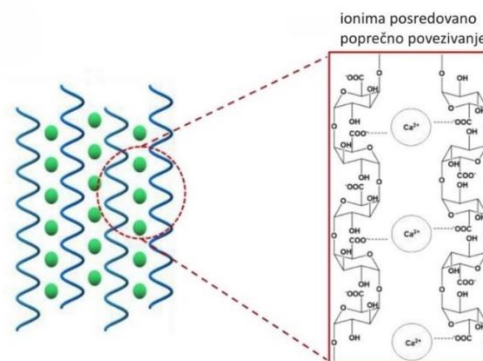
Obzirom na stupanj esterifikacije, razlikujemo visokometoksilirani pektin (engl. *high methoxyl pectin* – HMP) sa stupnjem esterifikacije >50% i niskometoksilirani pektin (engl. *low methoxyl pectin* – LMP) sa stupnjem esterifikacije <50% (Watts i Smith, 2009). Budući da sposobnost pektina za geliranje ovisi o molekulskoj masi i stupnju esterifikacije, pektini iz različitih izvora nemaju jednaka gelirajuća svojstva. Pektini dobiveni ekstrakcijom su oko 70% esterificirani i da bi se proizveo niskometoksilirani pektin neke esterske skupine moraju biti hidrolizirane ili se uz amonijak prevode u amidne skupine, dajući tako amidirani niskometoksilirani pektin (May, 1990).

Stupanj esterifikacije je važan parametar koji utječe na sposobnost formiranja gela. Visokometoksilirani pektin (HMP) gelira uz prisutnost saharoze ili škroba u visokoj koncentraciji i pri niskom pH. U kiselim uvjetima smanjuje se elektrostatska repulzija jer su karboksilne skupine protonirane, a otopljeni šećer smanjuje hidrataciju pektina i tako povećava interakciju pektinskih lanaca. HMP gel stabiliziran je intermolekularnim vodikovim vezama između slobodnih karboksilnih i hidroksilnih skupina te hidrofobnim interakcijama između esterificiranih skupina (Slika 6.) (Chan i sur., 2017). Što je veći stupanj esterifikacije, veći je broj hidrofobnih interakcija te raste brzina formiranja gela (Sriamornsak, 2003).



Slika 6. Shematski prikaz interakcija pektinskih lanaca kod visokometoksiliranog pektina (preuzeto i prilagođeno prema Chan i sur., 2017)

Niskometoksilirani pektin (LMP) gelira u prisustvu dvovalentnih kationa, najčešće kalcijevih, zahvaljujući elektrostatskim interakcijama između negativno nabijenih poligalakturonskih jedinica i pozitivno nabijenih kalcijevih iona (Slika 7.). Na taj način nastaje struktura poznata pod nazivom "egg-box" (Pérez Espitia, 2013). Prisustvo šećera nije nužno za formiranje gela, ali u malim koncentracijama može povećati čvrstoću gela i smanjiti količinu kalcijevih iona potrebnih za geliranje (Sriamornsak, 2003).



Slika 7. Shematski prikaz umrežavanja lanaca niskometoksiliranog pektina ionima kalcija (preuzeto i prilagođeno prema Chan i sur., 2017)

Topljivost pektina i viskoznost otopine ovise o njegovoj molekularnoj masi, koncentraciji, stupnju esterifikacije, pH vrijednosti i prisustvu iona suprotnog naboja. Otopljeni pektin spontano se deesterificira i depolimerizira ovisno o pH i temperaturi.

Povećanje temperature i kiseli uvjeti pogoduju depolimerizaciji, a niži pH pogoduje i deesterifikaciji. U alkalnim uvjetima deesterifikacija i depolimerizacija odvijaju se već i pri sobnoj temperaturi (Sriamornsak, 2003).

Pektini se koriste kao emulgatori, stabilizatori, ugušćivači i sredstva za geliranje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Chan i sur., 2017). Pokazalo se da je pektin siguran i prikladan ekscipijens u proizvodnji različitih terapijskih sustava (Mahajan i sur., 2012). U literaturi se najviše spominje priprava formulacija za oralnu primjenu kao što su želučanootporne tablete, tablete s kontroliranim oslobađanjem ili za ciljanu dostavu lijeka u kolon (Watts i Smith, 2009). Osim toga, poznati su primjeri pektinskih mikročestica pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem za različite putove primjene, a neki od njih prikazani su u Tablici 2.

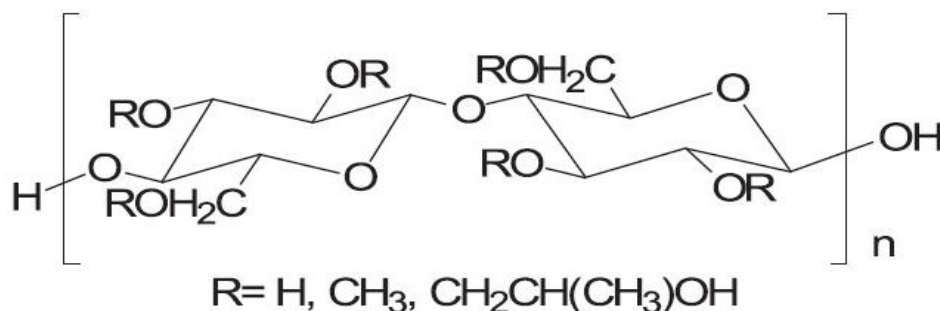
Tablica 2. *Primjeri pektinskih mikročestica kao terapijskih sustava pripremljenih sušenjem raspršivanjem*

Uključeni lijek	Put primjene	Komentar	Literatura
piroksikam	okularna primjena	povećana bioraspoloživost	Sensoy i sur., 2009
vankomicin	oralna primjena	ciljana dostava lijeka u kolon	Bigucci i sur., 2009
melatonin	nazalna primjena	produljeno zadržavanje na mjestu primjene, povećana bioraspoloživost	Nižić i sur., 2019
kukurmin	pulmonalna primjena	povećan antitumorski potencijal kukurmina	Gaikwad, 2017
ondansetron	nazalna primjena	povećana bioraspoloživost, maskiranje organoleptičkih svojstava lijeka	Mahajan i sur., 2012

1.3.2. HIPROMELOZA (HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA)

Hidroksipropilmetilceluloza ili hipromeloza je topljivi eterski derivat celuloze dobiven supstitucijom hidroksilnih skupina metoksilnim i/ili hidroksipropilnim skupinama (Slika 8). Dobiveni eteri celuloze su kemijski stabilni, biorazgradljivi, biokompatibilni te nalaze brojne primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Almeida i sur., 2014; Jiang i sur., 2016). U kontaktu s vodom ili biološkim tekućinama, polimerni lanci hipromeloze se relaksiraju i hidratiziraju, što rezultira nastankom gela (Cahyadi i sur., 2011). Ovisno o stupnju metilacije i koncentraciji, temperatura geliranja hipromeloze varira između 50 i 90 °C (Arbealez-Camargo i sur., 2016).

Zbog svojstva geliranja, hipromeloza se često koristi kao nosač u pripravi hidrofilnih matriksa za oblike s produljenim oslobađanjem (Mourão i sur., 2010). U kontaktu s vodom ili hidrofilnim otapalima na površini takvih matriksnih sustava stvara se sloj gela koji kontrolira oslobađanje djelatne tvari iz matriksa. Što je veći stupanj viskoznosti hipromeloze, jači je intenzitet geliranja i sporije oslobađanje lijeka (Mužiková i sur., 2014).

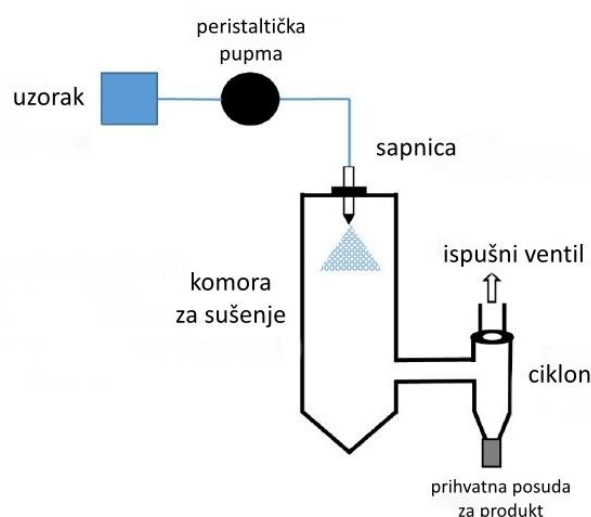


Slika 8. *Kemijska struktura hidroksipropilmetilceluloze (preuzeto i prilagođeno prema Ueda i sur., 2019)*

Pokazano je da hipromeloza može utjecati na veličinu i oblik mikročestica dobivenih procesom sušenja raspršivanjem, dajući relativno sferične čestice (Sacchetti i sur., 2002; Oh i sur., 2015). Osim toga, hipromeloza značajno utječe na sposobnost bubrenja i mukoadhezivna svojstva mikrosfera (Nižić i sur., 2019).

1.4. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem je tehnološki proces za prevođenje tekućeg uzorka u suhi praškasti produkt. Primjenjuje se u različitim granama proizvodnje – prehrambenoj industriji, proizvodnji boja, gnojiva i deterdženata, te farmaceutskoj industriji (Paudel i sur., 2013). Proces se može prilagoditi za proizvodnju širokog spektra veličina čestica, uključujući mikročestice koje se mogu koristiti u biomedicinske i farmaceutske svrhe. U tipičnom procesu dobivanja čestica sušenjem raspršivanjem, u odgovarajućem otapalu priprema se otopina/disperzija/emulzija suhe tvari koja čini većinu čestice (npr. polimera) uz dodatak drugih sastavnica kao što su djelatna tvar, dijagnostički agens ili sredstvo za formiranje pora (Chickering i sur., 2001). Pripravljeni uzorak se peristaltičkom pumpom dovodi do ulaza u komoru za sušenje, prolazi kroz sapnicu i atomizira (raspršuje) u fine sitne kapljice koje stupaju u kontakt s medijem za sušenje. Kao medij za sušenje najčešće se koriste vrući zrak, dušik, argon, ugljikov dioksid. Zbog raspršivanja tekućine u sitne kapljice dolazi do povećanja dodirne površine između otapala i medija za sušenje. Olakšan je prijenos topline pa otapalo isparava i nastaju suhe čestice (Dürriegl, 2011). Čestice se potom odvajaju iz medija za sušenje pomoću ciklona i sakupljaju u posudu za produkt (Singh i Van den Mooter, 2015). Komponente uređaja za sušenje raspršivanjem prikazane su na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz komponenti uređaja za sušenje raspršivanjem (preuzeto i prilagođeno prema Singh i Van den Mooter, 2015).

Možemo reći da se proces sušenja raspršivanjem sastoji od četiri osnovna koraka – raspršivanje tekućeg uzorka, miješanje uzorka i medija za sušenje, isparavanje otapala i odvajanje čestica produkta od medija za sušenje (Paudel i sur., 2013). Unatoč visokim temperaturama medija za sušenje, proces je primjenjiv i za termolabilne tvari. Zbog isparavanja otapala i učinka hlađenja, temperatura kapljica ostaje relativno niska (Bürki i sur. 2011). U procesne parametre ubrajamo ulaznu i izlaznu temperaturu, postavke aspiratora, vlažnost i protok medija za sušenje, brzinu dotoka uzorka. Formulacijski parametri uključuju svojstva pripremljenog tekućeg uzorka za sušenje, a među njima su sastav uzorka i koncentracija, vrsta otapala i viskoznost (Focaroli i sur., 2019; Singh i Van den Mooter, 2015). Variranjem navedenih parametara tijekom procesa proizvodnje, može se utjecati na željena svojstva čestica suhog produkta (Davis i Walker, 2018). Primjerice, povećanje brzine dotoka uzorka može uzrokovati povećanje veličine čestica i vlažnosti konačnog produkta. Veća ulazna temperatura nema utjecaja na veličinu čestica, ali obično osigurava i veću izlaznu temperaturu te manju vlažnost produkta. Također, svojstva tekućeg uzorka za sušenje utječu na svojstva osušenog produkta – povećanje koncentracije i viskoznosti uzorka dovodi do povećanja veličine osušenih čestica (Patel i sur., 2015). Može se zaključiti da su parametri procesa sušenja raspršivanjem i svojstva čestica dobivenog produkta kompleksno povezani te da ispravnom prilagodbom i variranjem parametara možemo postići željena svojstva osušenog produkta.

Proizvodnja biorazgradljivih mikročestica sušenjem raspršivanjem pokazala se dobrom alternativom konvencionalnim metodama mikrokapsuliranja i prikladnom metodom za pripremu praškastih sustava za nova područja primjene. Radi se o jednostavnoj, brznoj i reproducibilnoj metodi koja omogućuje primjenu blagih temperaturnih uvjeta bez velike ovisnosti o topljivosti lijeka ili polimera. Iskorištenje procesa je relativno nisko zbog gubitka čestica kroz ispuh uređaja ili adherencije na stijenke komore za sušenje (Uyen i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kortikosteroidi su zahvaljujući svom protuupalnom djelovanju vrlo učinkoviti u liječenju bolesti nosne sluznice kao što su akutni rinosinuitis, kronični rinosinuitis sa ili bez polipa te nosna kongestija (Martino i sur., 2015; Mullol i sur., 2009). Prednost nazalne primjene kortikosteroida je brzo otklanjanje simptoma bolesti i smanjen rizik za pojavu sistemskih nuspojava u usporedbi s oralnom ili parenteralnom primjenom. Registrirani pripravci za nazalnu primjenu kortikosteroida su suspenzije u obliku kapi ili sprejeva za nos čija je učinkovitost ograničena zbog kratkog zadržavanja na mjestu primjene (Hafner i sur., 2014).

Kako bi se povećala njihova učinkovitost i sigurnost, razvijaju se novi terapijski sustavi s duljim zadržavanjem i kontroliranim oslobađanjem lijeka na mjestu primjene. Brojna istraživanja uključuju razvoj praškastih sustava temeljenih na mukoadhezivnim polimerima koji bubrenjem stvaraju mukoadhezivni gel, odgađaju mukocilijarni klirens te omogućuju produljeno zadržavanje lijeka na mjestu primjene. Praškasti sustavi za nazalnu primjenu pokazuju veću stabilnost u usporedbi s tekućim pripravcima bez potrebe za dodatkom konzervansa te osiguravaju višu dozu lijeka na mjestu depozicije u nosnoj šupljini (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

Polimerne mikrosfere su terapijski sustavi koji omogućuju stabilizaciju djelatne tvari, ciljanu dostavu lijeka, kontrolirano oslobađanje, smanjenje nuspojava i toksičnosti (Vehring i sur., 2007). Polimeri za pripremu mukoadhezivnih mikrosfera su biorazgradljivi i biokompatibilni te u kontaktu s nosnim fluidom bubre i stvaraju gel iz kojeg se lijek oslobađa difuzijom (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Pektin je siguran i prikladan ekscipijens u proizvodnji različitih terapijskih sustava, a poznati su i brojni primjeri pektinskih mikrosfera pripremljenih sušenjem raspršivanjem za različite putove primjene (Mahajan i sur., 2012). Hipromeloza se često koristi kao nosač u pripravi hidrofilnih matriksa za oblike s produljenim oslobađanjem te je pokazano da može utjecati na svojstva bubrenja i mukoadhezivnost mikrosfera (Mourão i sur., 2010; Nižić i sur., 2019).

Brza i relativno jednostavna metoda koja omogućuje proizvodnju većih količina polimernih mikrosfera je sušenje raspršivanjem (Uyen i sur., 2019). Variranjem parametara u procesu proizvodnje mikrosfera sušenjem raspršivanjem, moguće je utjecati na željene karakteristike dobivenih mikrosfera (Poozesh i Bilgili, 2019).

U ovom radu sušenjem raspršivanjem pripremljene su mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP) za nazalnu primjenu. NDP je vodotopljivi esterski prolijek deksametazona. Cilj je bio ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na iskorištenje tehnološkog procesa, svojstva dobivenih mikrosfera te uspješnost uklapanja i profil oslobađanja uklopljenog lijeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su:

- natrijev deksametazon fosfat (Carbosynth Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- niskometoksilirani amidirani pektin (Pectin Amid CF 005, Herbstreith & Fox KG, Njemačka)
- hipromeloza (Metolose, Shin-Etsu Chemical Co.,LTD, Japan)
- umjetni nazalni fluid (engl. *simulated nasal fluid* - SNF)

SNF je pripremljen otapanjem 8,77 g NaCl (Kemig, Hrvatska), 2,98 g KCl (Kemig, Hrvatska) i 0,59 g CaCl₂ (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u 1000 mL pročišćene vode.

3.2. METODE

3.2.1. PRIPRAVA OTOPINA POLIMERA I LIJEKA ZA SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Otopina pektina u 1% (*m/V*) koncentraciji pripremljena je otapanjem pektina u pročišćenoj vodi. Pripravljena otopina je miješana na magnetskoj miješalici tijekom 24 h i potom filtrirana. Otopina hipromeloze u 0,5% (*m/V*) koncentraciji pripremljena je otapanjem u vodi zagrijanoj na 80-90 °C i miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom 24 h, nakon čega je još 24 h pohranjena pri 4 °C. Pripremljene su smjese polimernih otopina s masenim omjerima pektina i hipromeloze od 1:0, 1:1, 1:2 i 2:1. Uzorci za sušenje raspršivanjem ukupnog volumena 100 mL pripremljeni su miješanjem vodenih otopina pektina, hipromeloze i natrijevog deksametazon fosfata tako da je ukupna koncentracija polimera bila 0,5% (*m/V*), a natrijevog deksametazon fosfata 0,01% (*m/V*). Vodena otopina natrijevog deksametazon fosfata pripremljena je otapanjem natrijevog deksametazon fosfata u maloj količini vode, nakon čega je dodan preostali volumen vode do ukupnog volumena uzorka za sušenje od 100 mL. Po istom postupku, uz izostavljanje lijeka, pripremljeni su uzorci za sušenje raspršivanjem za pripravu mikrosfera bez natrijevog deksametazon fosfata.

3.2.2. PRIPRAVA MIKROSFERA SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Praškasti produkti pripremljeni su iz tekućih uzoraka procesom sušenja raspršivanjem. Korišten je uređaj Büchi 190 Mini Spray Dryer (Flawil, Švicarska) prikazan na Slici 10.



Slika 10. Uređaj za sušenje raspršivanjem Büchi 190 Mini SprayDryer

Kao medij za sušenje korišten je zrak, a protok komprimiranog zraka iznosio je 700 NL/h. Aspirator je radio na 50% kapaciteta. Promjer sapnice je 0,7 mm, a brzina dotoka tekućeg uzorka u sapnicu iznosila je 0,77 mL/min. Ulazna temperatura bila je unutar intervala 131-140 °C, a izlazna temperatura 87-95 °C. Navedeni parametri sušenja raspršivanjem prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. *Parametri procesa sušenja raspršivanjem*

PARAMETAR	IZNOS
protok medija za sušenje	700 NL/h
kapacitet aspiratora	50%
brzina dotoka uzorka	0,77 mL/min
ulazna temperatura	131-140 °C
izlazna temperatura	85-87 °C
koncentracija polimera	0,5% (m/V)

3.2.3. ODREĐIVANJE ISKORIŠTENJA PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

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

$$I (\%) = \frac{\text{masa produkta (g)}}{\text{masa krute tvari u uzorku za sušenje raspršivanjem (g)}} \times 100$$

Za izračun iskorištenja procesa uzeta je masa dobivenog suhog produkta nakon sušenja raspršivanjem i masa krute tvari u tekućem uzorku za sušenje raspršivanjem.

3.2.4. ODREĐIVANJE VELIČINE MIKROSFERA

Za određivanje srednjeg promjera mikrosfera pripremljenim sušenjem raspršivanjem korišten je Olympus BH-2 mikroskop spregnutog s kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan). Pomoću računalnog programa Optomax V (Cambridge, Velika Britanija) provedena je obrada slike. Uzorci za analizu pripremljeni su nanošenjem tankog sloja praškastog produkta na predmetno stakalce. Za svaki uzorak je izmjereno najmanje 3000 čestica i svaki uzorak je mjeren u triplikatu.

3.2.5. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI UKLAPANJA LIJEKA U MIKROSFERE

Uklapanje lijeka u mikrosfere određeno je spektrofotometrijskom metodom. Za pripremu uzoraka u odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano je 20 mg praškastog produkta i nadopunjeno vodom do oznake. Uzorci su miješani na magnetskoj miješalici, a potom 5 min sonicirani. Uzorci su zatim filtrirani pomoću polietersulfonskih membrana veličine pora od 0,45 μm (Chromafil® Xtra PES-45/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka) i izmjerena je apsorbancija. Korišten je UV-Vis spektrofotometar (UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Probe, Varian, SAD), a apsorbancija uzoraka mjerena je pri valnoj duljini od 241 nm. Za svaki uzorak apsorbancija je mjerena u triplicatu, a za izračun koncentracije uzeta je srednja vrijednost. Koncentracija je izračunata prema jednadžbi pravca izvedenoj iz prethodno dobivenog baždarnog dijagrama.

Određivanje uspješnosti uklapanja lijeka provedeno je prema formuli:

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

Sadržaj lijeka u mikrosferama određen je prema formuli:

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

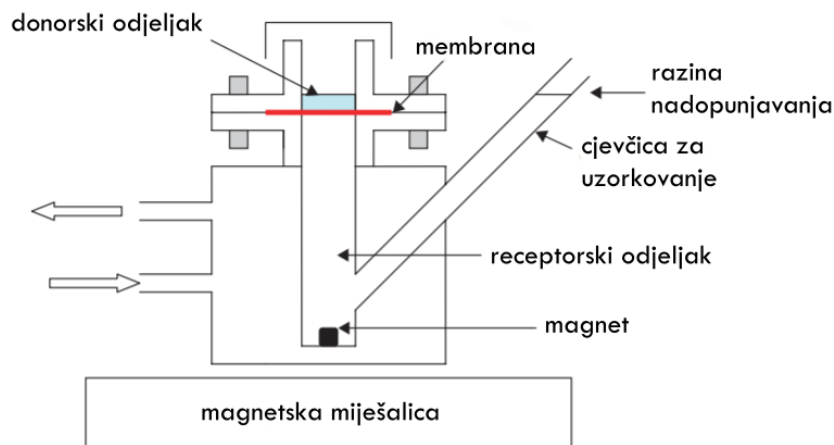
3.2.6. ISPITIVANJE BUBRENJA MIKROSFERA

Bubrenje mikrosfera ispitano je korištenjem Franzove difuzijske ćelije koja je pomoću vodene kupelji termostatorana pri 34 °C. Franzova difuzijska ćelija ima donorski i receptorski odjeljak koji su odijeljeni poliamidnom membranom s porama veličine 0,45 μm (Sartolon®, Sartorius Stedim Biotech, Njemačka). Na membranu u donorskom odjeljku nanoseno je 10 mg uzorka mikrosfera. Receptorski odjeljak napunjen je receptorskim medijem (SNF ili pročišćena voda), a bubrenje mikrosfera uzrokovalo je smanjenje njegove razine u postraničnoj cjevčici.

Tijekom 15 min u vremenskim razmacima od 3 min receptorski medij je nadomještan do početne razine. Stupanj bubrenja mikrosfera izražen je kao ukupni volumen kroz cjevčicu dodanog SNF-a ili pročišćene vode po miligramu mikrosfera.

3.2.7. ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA *IN VITRO*

Ispitivanje oslobađanja lijeka iz mikrosfera provedeno je korištenjem Franzove difuzijske ćelije (Slika 11.) uz SNF termostatiran pri temperaturi od 34 °C kao receptorski medij. Na membranu u donorskom odjeljku stavljeno je 10 mg uzorka mikrosfera, a otvor je prekriven parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje medija. U receptorskom odjeljku medij je miješan pomoću magnetskog mješača (600 okretaja/min). Oslobađanje lijeka praćeno je tijekom 3 sata pri čemu su u određenim vremenskim intervalima (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 i 180 min) kroz postraničnu cjevčicu uzimani alikvoti receptorskog medija (0,5 mL). Prilikom svakog uzorkovanja, receptorski medij nadomještan je jednakim volumenom (0,5 mL) svježeg SNF-a. Nakon 3 sata, preostali lijek u izbubrenim mikrosferama iz donorskog odjeljka je kvantitativno sakupljen te je u svim sakupljenim uzorcima određen sadržaj lijeka kako je opisano u odjeljku 3.2.8.



Slika 11. Shematski prikaz Franzove difuzijske ćelije (preuzeto i prilagođeno prema Watts i Smith, 2009)

3.2.8. ODREĐIVANJE SADRŽAJA NATRIJEVOG DEKSAMETAZON FOSFATA

Kvantitativno određivanje natrijevog deksametazon fosfata u uzorcima receptorskog medija prikupljenima tijekom *in vitro* ispitivanja oslobađanja lijeka iz praškastih sustava provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Kromatografski sustav sastojao se od kontrolera SCL-10Avp, pumpe 10Advp, degazera DGU-14A, pećnice CTO-10Avp i UV-VIS detektora SDP-10Avp. Analiza je provedena izokratnim eluiranjem, a mobilna faza sastojala se od 5 mM acetatnog pufera (pH 4,5) i acetonitrila u volumnom omjeru 68:32. Za analizu je korištena kolona Kinetex C18, promjera pora 2,6 μm , 100 x 4,6 mm, 100 Å (Phenomenex, SAD), koja je tijekom analize termostatorirana na 55 °C. Brzina protoka bila je 0,7 mL/min, volumen injektiranog uzorka 20 μL , a detekcija natrijevog deksametazon fosfata provedena je pri valnoj duljini od 241 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPREMA MIKROSFERA

U ovom radu pripremljene su mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP). Mikrosfere su pripremljene sušenjem raspršivanjem otopina NDP-a i polimera (pektina i hipromeloze) u pročišćenoj vodi bez dodatka organskih otapala. Pripravljene su otopine za raspršivanje s različitim masenim omjerima polimera te su tako dobivena četiri uzorka mikrosfera s NDP-om s masenim omjerima pektina i hipromeloze od 1:0, 1:1, 1:2 i 2:1 (uzorci redom DP, DPH1, DPH2 i DPH3). Izostavljanjem NDP-a iz postupka pripreme, pripremljene su i prazne mikrosfere s istim omjerima polimera (uzorci P, PH1, PH2 i PH3). Cilj je bio ispitati utjecaj masenog omjera korištenih polimera na svojstva čestica dobivenog produkta (veličina mikrosfera, profil bubrenja, uspješnost uklapanja i sadržaj lijeka u mikrosferama).

Za sušenje raspršivanjem korišten je uređaj Büchi 190 Mini SprayDryer (Flawil, Švicarska). Procesni parametri među kojima su karakteristike medija za sušenje, postavke aspiratora i brzina dotoka uzorka utječu na svojstva pripremljenih mikrosfera. Također, svojstva dobivenih mikrosfera ovise o sastavu uzorka za sušenje, koncentraciji otopljenih tvari i vrsti otapala (Focaroli i sur., 2019; Singh i Van den Mooter, 2015). U ovom radu, postavljeni procesni i formulacijski parametri rezultirali su temperaturom izlaznog zraka od 85 do 87 °C. Omogućeno je uspješno sušenje raspršivanjem pripremljenih tekućih uzoraka i dobiven je suhi praškasti produkt.

Iskorištenje procesa kretalo se između 45 i 64%, što je relativno visoko za ovu metodu. Gavini i suradnici (2008) pripravili su mikrosfere s metoklopramidom za nazalnu primjenu s iskorištenjem procesa od 30 do 50%. Kulkarni i suradnici (2016) pripravili su mikrosfere s uklopljenim diltiazem hidrokloridom uz iskorištenje između 22,8 i 34,5%. Do sniženja vrijednosti iskorištenja procesa dolazi zbog gubitka najmanjih čestica kroz ispuh ili adhezije čestica na stijenke uređaja za sušenje raspršivanjem (Uyen i sur, 2019).

4.2. VELIČINA ČESTICA

Veličina čestica praškastih sustava za nazalnu primjenu znatno utječe na pravilnu depoziciju čestica u nosnoj šupljini. Ako je veličina čestica ispod 10 μm , postoji rizik da će dio čestica prilikom primjene pacijent udahnuti u niže dijelove dišnog sustava, što smanjuje dozu lijeka u nosnoj šupljini (Tiozzo Fasiolo, 2018).

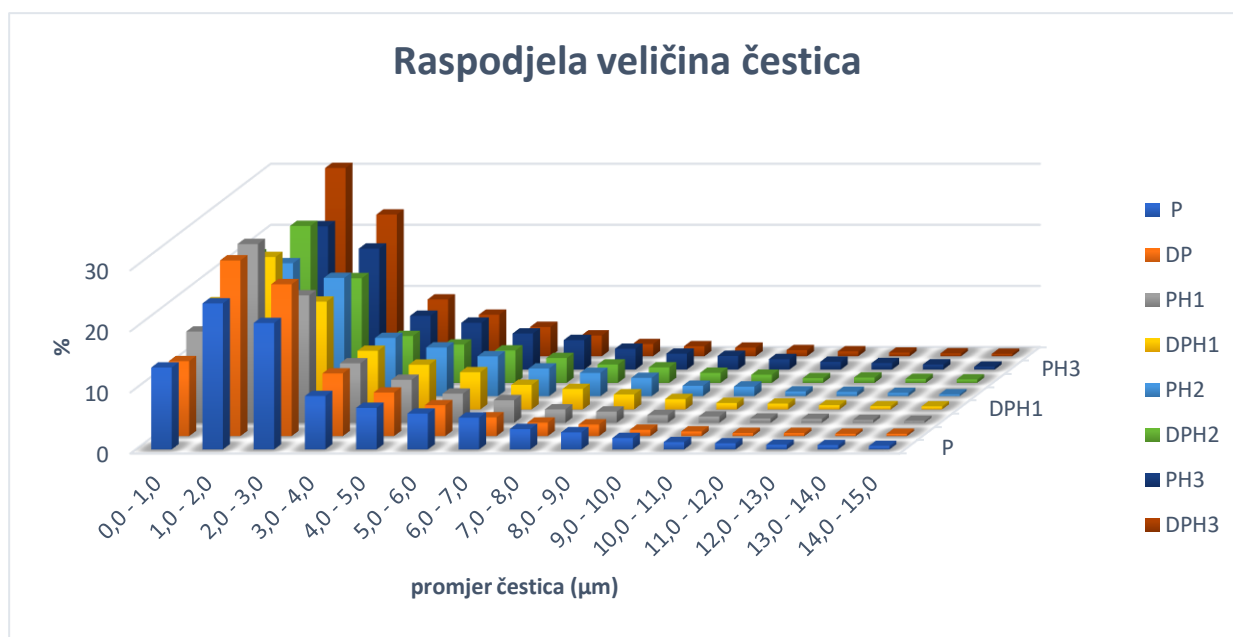
U ovom radu veličina mikrosfera, izražena kao srednji promjer, određena je pomoću mikroskopa spregnutog s kamerom. Za svaki uzorak uzeta je mala količina praškastog produkta i raspoređena na predmetno stakalce, a obrada slike provedena je korištenjem računalnog programa. Srednji promjer čestica dobivenih u ovom radu varirao je između $3,13 \pm 0,46$ i $3,82 \pm 0,32$ μm (Tablica 4.). Jurišić Dukovski i suradnici (2019) su za pripravljene pektinske mikrosfere s deksametazonom za nazalnu primjenu odredili srednji promjer od $2,17 \pm 0,01$ μm .

Tablica 4. Srednji promjer pripremljenih mikrosfera

UZORAK	PEKTIN/HIPROMELOZA (m/m)	SREDNJI PROMJER ČESTICA UZORKA (μm)
DP	1:0	$3,13 \pm 0,46$
P		$3,69 \pm 0,40$
DPH1	1:1	$3,38 \pm 0,09$
PH1		$3,18 \pm 0,28$
DPH2	1:2	$3,40 \pm 0,38$
PH2		$3,46 \pm 0,26$
DPH3	2:1	$3,21 \pm 0,12$
PH3		$3,82 \pm 0,32$

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

Na Slici 12. prikazana je raspodjela veličina čestica za sve uzorke mikročestica dobivene procesom sušenja raspršivanjem. Kod svih uzoraka prisutna je slična raspodjela veličina čestica, a najveći udio čestica (oko 80%) ima promjer manji od 5 μm .



Slika 12. Raspodjela veličina čestica svih uzoraka mikročestica dobivenih procesom sušenja raspršivanjem

Iako je većina mikročestica pripremljenih u ovom radu manja od 10 μm, čestice suhих prašaka veličine ispod 100 μm sklone su stvaranju aglomerata čime se može postići adekvatna depozicija u nosnoj šupljini. Aglomeracija se javlja spontano zbog velikog omjera površine i volumena te kohezivnih sila među česticama, a nastali aglomerati su promjera od nekoliko desetaka do 100 μm (Tiozzo Fasiolo, 2018).

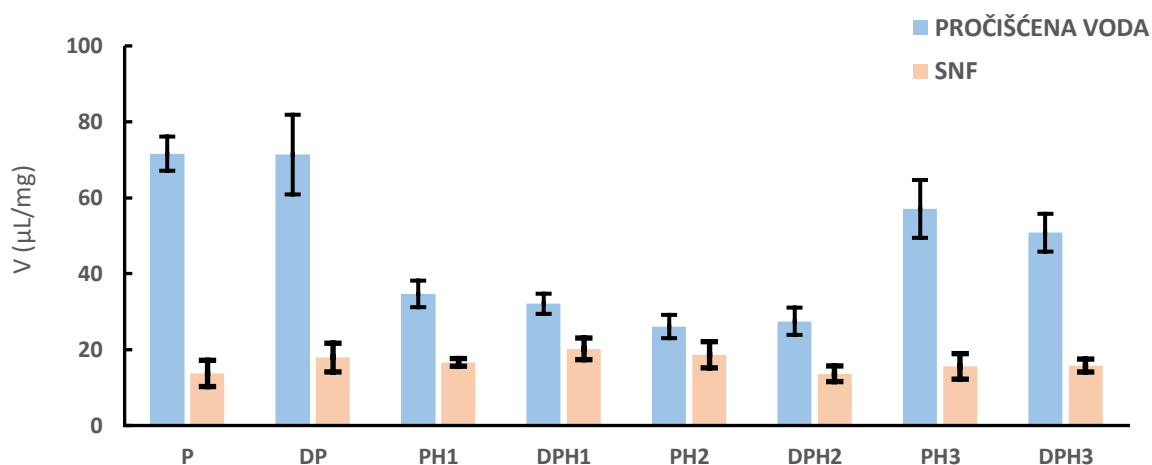
Optimiranjem procesnih parametara u pripremi mikrosfera sušenjem raspršivanjem moguće je utjecati na svojstva čestica dobivenog suhog produkta pa tako i na njihovu veličinu. Povećanje brzine dotoka uzorka uzrokuje povećanje raspršenih kapljica i posljedično nastaju veće suhe čestice (Patel i sur., 2014). Veće čestice mogu se dobiti smanjenjem protoka komprimiranog zraka ili povećanjem koncentracije i viskoznosti uzorka za raspršivanje (Kaye i sur., 2009; Ståhl i sur., 2002). Smanjen protok komprimiranog zraka dovodi do smanjenja atomizacijske energije za raspršivanje uzorka pa tijekom sušenja nastaju veće kapljice i u konačnici veće čestice suhog produkta (Ståhl i sur., 2002).

4.3. SVOJSTVA BUBRENJA MIKROSFERA

Prašasti sustavi za nazalnu primjenu temeljeni na hidrofilnim polimerima kao što su pektin i hipromeloza vezanjem vode stvaraju mukoadhezivni gel na mjestu primjene te produljuju vrijeme zadržavanja lijeka u nosnoj šupljini (Chowdary i Srinivasa Rao, 2004). Također, mikrosfere apsorpcijom vode na mjestu primjene uzrokuju dehidraciju epitelnih stanica i njihovo razmicanje, što može povećati bioraspodjeljivost nekih lijekova (Pereswetoff-Morath, 1998). Optimiranjem bubrenja mikročestica, mukoadhezije i oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa, produljuje se kontakt lijeka s nosnom sluznicom i povećava terapijski učinak na mjestu primjene (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

Hidratacija polimera, odnosno bubrenje, može se procijeniti korištenjem Franzove difuzijske ćelije, a stupanj bubrenja izražava se kao volumen apsorbirane vode ili SNF-a po miligramu mikrosfera (Martinac i sur., 2005). Stupanj bubrenja određen je tijekom 15-minutnog procesa bubrenja mikrosfera, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 13.

Za prazne mikrosfere i mikrosfere s uklopljenim NDP-om s istim omjerom polimera nema značajne razlike u volumenu pročišćene vode ili SNF-a po jediničnoj masi, odnosno uklopljeni lijek nije imao značajan utjecaj na profil bubrenja mikrosfera.



Slika 13. Bubrenje mikrosfera izraženo kao volumen apsorbirane pročišćene vode i SNF-a po miligramu mikrosfera u 15-minutnom procesu bubrenja. Prikazane su srednje vrijednost \pm SD ($n=3$).

Može se primijetiti da uzorci s većim sadržajem pektina u odnosu na hipromelozu pokazuju veći kapacitet bubrenja u pročišćenoj vodi. Nižić i suradnici (2019) opisali su da uvođenje hipromeloze u matriks pektinskih mikrosfera s uklopljenim melatoninom smanjuje volumen apsorbirane vode. Do sličnog zapažanja došli su Mahajan i suradnici (2012) ispitujući bubrenje pektinskih mikrosfera s ondansetronom u fosfatnom puferu (pH 6,6), pri čemu je uočeno da je kapacitet bubrenja veći kod mikrosfera s većim sadržajem pektina u matriksu.

Svi uzorci mikrosfera apsorbirali su značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Jurišić Dukovski i suradnici (2019) opisali su umjereno bubrenje u SNF-u kao posljedicu umrežavanja niskometoksiliranog pektina kakav je korišten u ovom radu u prisustvu iona kalcija u SNF-u. U literaturi je već opisan obrnuto proporcionalni odnos razine umreženja i bubrenja polimera (Jurišić Dukovski i sur., 2019; Pereswetoff-Morath, 1998).

Kod mikrosfera za nazalnu primjenu poželjno je umjereno bubrenje jer se prekomjernim bubrenjem mogu smanjiti adhezivna svojstva. Također, prekomjerno bubrenje može uzrokovati oštećenje sluznice ili izazvati osjećaj nelagode nakon primjene terapijskog sustava u nosnu šupljinu (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Pažljivo optimiranje svojstava bubrenja bitan je korak u razvoju novih formulacija za nazalnu primjenu jer stupanj bubrenja utječe na zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini, oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa i apsorpciju kroz nosnu sluznicu (Nižić i sur., 2019).

4.4. USPJEŠNOST UKLAPANJA I SADRŽAJ LIJEKA U MIKROSFERAMA

Uspješnost uklapanja lijeka u mikrosfere određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 241 nm, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5. Uspješnost uklapanja (UU) je masa lijeka uklopljena u mikročestice izražena u postotku prema teorijskoj masi lijeka. Sadržaj lijeka (DL) izražen je kao maseni udio uklopljenog lijeka u ispitivanim mikročesticama.

Metoda sušenja raspršivanjem pokazala se prikladnom za uklapanje NDP-a u mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi. Postignuto je visoko uklapanje lijeka za sve uzorke mikrosfera (91,46-112,18%), a sadržaj lijeka u mikrosferama iznosio je između 1,83 i 2,24%. S obzirom na to da je u svaku nosnicu moguće dostaviti 10 - 25 mg mikrosfera, izmjereni sadržaj lijeka odgovara dozi od oko 200 do 500 µg lijeka, što je prikladno za nazalnu primjenu deksametazona (Martino i sur., 2015; Tiozzo Fasiolo i sur., 2018). Martino i

suradnici (2015) ispitali su učinkovitost primjene deksametazona u dnevnoj dozi od 800 µg na liječenje simptoma kroničnog rinosinuitisa s nosnim polipima te dobili obećavajuće rezultate (Martino i sur., 2015). Jurišić Dukovski i suradnici (2019) za pektinske mikrosfere s uklopljenim deksametazonom za nazalnu primjenu odredili su sadržaj lijeka od $3,8 \pm 0,9\%$. Nižić i suradnici (2019) pripravili su mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim melatoninom za nazalnu primjenu s visokom uspješnosti uklapanja lijeka ($96,7 - 103,2\%$) i sadržajem uklopljenog lijeka od 24,2 do 33,7%.

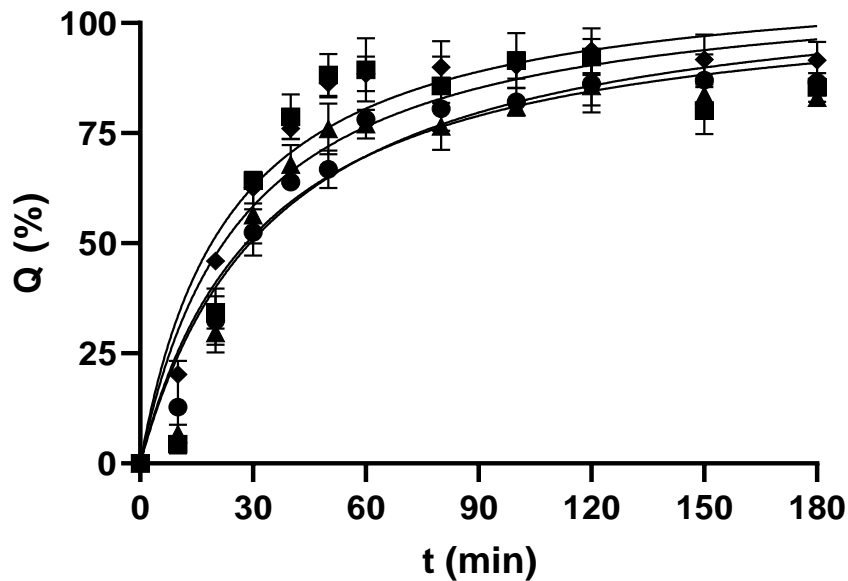
Tablica 5. *Uspješnost uklapanja i sadržaj natrijevog deksametazon fosfata u mikrosferama*

UZORAK	PEKTIN/HIPROMELOZA (m/m)	EE (%)	DL (%)
DP	1:0	$91,72 \pm 3,54$	$1,83 \pm 0,07$
DPH1	1:1	$95,61 \pm 5,31$	$1,91 \pm 0,11$
DPH2	1:2	$112,18 \pm 2,19$	$2,24 \pm 0,04$
DPH3	2:1	$91,46 \pm 0,30$	$1,83 \pm 0,01$

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

4.5. IN VITRO OSLOBAĐANJE LIJEKA

Praškasti sustavi za nazalnu primjenu temeljeni na mikrosferama u kontaktu s nosnom sluznicom bubre i stvaraju gel iz kojeg se lijek oslobađa difuzijom. *In vitro* oslobađanje natrijeva deksametazon fosfata ispitano je pomoću Franzove difuzijske ćelije u kojoj donorski i receptorski odjeljak odjeljuje poliamidna membrana. Lijek difuzijom prelazi iz gela preko membrane u receptorski medij. Kao receptorski medij korišten je SNF s koncentracijom kalcija od 5,3 mM termostatiran pri 34 °C. Prisustvo iona kalcija u SNF-u uzrokuje umrežavanje pektinskih lanaca i omogućuje umjereno bubrenje mikrosfera. Na Slici 14. prikazana je usporedba *in vitro* profila oslobađanja NDP-a iz svih uzoraka polimernih mikrosfera u vremenskom intervalu od 180 min.



Slika 14. Profili oslobađanja natrijevog deksametazon fosfata iz polimernih mikrosfera temeljenih na pektinu i hipromelozi u omjeru redom 1:0 (DP; krug), 1:1 (DPH1; kvadrat), 1:2 (DPH2; trokut) i 2:1 (DPH3; romb). Q = kumulativni postotni udio oslobođenog lijeka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD ($n=3$).

Utvrđeno je brzo inicijalno oslobađanje lijeka tijekom prvih 60 min ($77,0 \pm 2,6 - 89,4 \pm 5,9$ %), nakon čega slijedi sporija faza oslobađanja. Usporedbom različitih uzoraka mikrosfera nije uočena značajna razlika u brzini oslobađanja lijeka. Slični rezultati prikazani su i u istraživanju Jurišić Dukovski i suradnika (2019), gdje je ispitan profil oslobađanja deksametazona iz pektinskih mikrosfera kroz dva sata. Nakon sat vremena, oslobođeno je oko 60% lijeka, što je nešto manje nego iz sustava prikazanih u ovom radu. Mogući razlozi tome su razlika u topljivosti deksametazona i natrijevog deksametazon fosfata u mediju za oslobađanje (SNF-u), te činjenica da je deksametazon uklopljen u lipidno-alginatne nanočestice unutar polimernog matriksa mikrosfera.

Ovakav profil oslobađanja odgovara nazalnoj primjeni, s obzirom na to da bi preveliko usporavanje oslobađanja lijeka moglo rezultirati smanjenim terapijskim učinkom (Jurišić Dukovski i suradnici, 2017).

5. ZAKLJUČCI

- Mikrosfere s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom i masenim omjerom pektina i hipromeloze od 1:0, 1:1, 1:2 i 2:1 uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem otopine natrijeva deksametazon fosfata (0,01%, *m/V*) i polimera (0,5%, *m/V*).
- Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se od 46 do 64%.
- Srednji promjer dobivenih čestica varirao je između $3,13 \pm 0,46$ i $3,82 \pm 0,32$ μm . Kod svih uzoraka mikrosfera prisutna je slična raspodjela veličina čestica pri čemu oko 80% čestica ima promjer manji od 5 μm .
- Postignuta je visoka uspješnost uklapanja lijeka (91,46 - 112,18%), a sadržaj natrijeva deksametazon fosfata u pripremljenim mikrosferama iznosio je između 1,83 i 2,24%, što odgovara terapijskoj dozi.
- Tijekom procesa bubrenja mikrosfere su apsorbirale značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom.
- Pri bubrenju mikrosfera u pročišćenoj vodi uočeno je da mikrosfere s većim sadržajem pektina u odnosu na hipromelozu pokazuju veći stupanj bubrenja, dok uklopljeni lijek nije imao značajan utjecaj na svojstva bubrenja mikrosfera u pročišćenoj vodi i SNF-u.
- Profili oslobađanja lijeka *in vitro* pokazuju brzo inicijalno oslobađanje lijeka te usporavanje nakon 60 minuta, što odgovara nazalnoj primjeni. Nije uočena značajna razlika u brzini oslobađanja lijeka ovisno o polimernom sastavu mikrosfera.

6. LITERATURA

Almeida, N., Rakesh, L., Zhao, J. Monovalent and divalent salt effects on thermogelation of aqueous hypromellose solutions. *Food Hydrocolloids*, 2014, 36, 323-331.

Arbelaez-Camargo, D., Suñé-Negre, J. M., Roig-Carreras, M., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Miñarro-Carmona, M., & Ticó-Grau, J. R. Preformulation and characterization of a lidocaine hydrochloride and dexamethasone sodium phosphate thermo-reversible and bioadhesive long-acting gel for intraperitoneal administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 498(1-2), 142–152.

Baza lijekova – dexamethasonum, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 25.11.2019.

Bigucci F, Luppi B, Monaco L, Cerchiaraand T, Zecchi V. Pectin-based microspheres for colon-specific deliveryof vancomycin. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61, 41-46.

Bucatariu, S., Constantin, M., Ascenzi, P., & Fundueanu, G. Poly(lactide- co - glycolide)/cyclodextrin (polyethyleneimine) microspheres for controlled delivery of dexamethasone. *Reactive and Functional Polymers*, 2016, 107, 46–53.

Bürki, K., Jeon, I., Arpagaus, C., Betz, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 408(1-2), 248–256.

Cahyadi, C., Chan, L. W., Colombo, P., & Heng, P. W. S. The butterfly effect: A physical phenomenon of hypromellose matrices during dissolution and the factors affecting its occurrence. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 406(1-2), 31–40

Calles, J. A., López-García, A., Vallés, E. M., Palma, S. D., & Diebold, Y. Preliminary characterization of dexamethasone-loaded cross-linked hyaluronic acid films for topical ocular therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 509(1-2), 237–243.

Cázares-Delgadillo, J., Balaguer-Fernández, C., Calatayud-Pascual, A., Ganem-Rondero, A., Quintanar-Guerrero, D., López-Castellano, A. C., Merino, V., Kalia, Y. N. Transdermal

iontophoresis of dexamethasone sodium phosphate *in vitro* and *in vivo*: Effect of experimental parameters and skin type on drug stability and transport kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, 75(2), 173–178.

Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 161, 118–139.

Chickering, D., Keegan, M., Randall, G., Bernstein, H., Straub, J. 2001. U.S. Patent 6,308,434.

Chowdary, K. P. R., & Srinivasa Rao, Y. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(11), 1717–1724.

Coker, S.A., Szczepiorkowski, Z.M., Siegel, A.H., Ferrari, A., Mambrini, A., Anand, R., Hartman, R.D., Benatti, L., Dumont, L.J. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate in Healthy Volunteers. *Transfusion Medicine Reviews*, 2018, 32, 102-110.

Davis, M., Walker, G., Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of controlled release*, 2018, 269, 110-127.

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

Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., & McHugh, T. H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 2013, 35, 287–296.

European Medicines Agency: : EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 - Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products 2006, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-pharmaceutical-quality-inhalation-nasal-products_en.pdf, siječanj 2020.

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, P. T., Hastedt, J. E., Gitlin, I., Oscarson, S., Fahy, J. V., Healy, A. M. A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 562, 228-240.

Gagné, D., & Lodge, B. A. Analysis of dexamethasone sodium phosphate formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1980, 193(1), 160–162.

Gavini, E., Rassa, G., Muzzarelli, C., Cossu, M., Giunchedi, P., Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinon chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68, 245-252.

Gaikwad, D., Shewale, R., Patil, V., Mali, D., Gaikwad, U., Jadhav, N. Enhancement in *in vitro* anti-angiogenesis activity and cytotoxicity in lung cancer cell by pectin-PVP based curcumin particulates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104, 656–664.

Gawkowska, D, Cybulska, J., Zdunek, A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, 2018, 10, 762.

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

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 125-127.

Jiang, Q., Zhou, W., Wang, J., Tang, R., Zhang, D., & Wang, X. Hypromellose succinate-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91, 85–91.

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.

Jurišić Dukovski, B., Plantić, I., Čunčić, I., Krtalić, I., Juretić, M., Pepić, I., Lovrić, J., Hafner, A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 533(2), 480–487.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology. New York, The McGraw-Hill, 2011, str. 697-706.

Kaye R.S., Purewal T.S, Alpar O.H. Development and testing of particulate formulation for the nasal delivery of antibodies. *Journal of Controlled Release*, 2009, 135(2), 127-135

Kulkarni, A.D., Bari, D.B., Surana, S.J, Pardeshi, C.V., *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, 31, 108-117.

Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleiteix, F., Vandamme, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 2010, 147, 304-310.

Luo, L., Yang, J., Oh, Y., Hartsock, M. J., Xia, S., Kim, Y.C., Ding, Z., Meng, T., Eberhart, C.G., Ensign, L.M., Thorne, J.E., Stark, W.J., Duh, E.J., Xu, Q., Hanes, J. Controlled release of corticosteroid with biodegradable nanoparticles for treating experimental autoimmune uveitis. *Journal of Controlled Release*, 2019, 296, 68-80.

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.

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

Martino, B. J., Church, C. A., & Seiberling, K. A. Effect of intranasal dexamethasone on endogenous cortisol level and intraocular pressure. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 2015, 5(7), 605–609.

May, C.D. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 1990, 12, 79-99.

Mourão, S. C., da Silva, C., Bresolin, T. M. B., Serra, C. H. R., & Porta, V. Dissolution parameters for sodium diclofenac-containing hypromellose matrix tablet. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 386(1-2), 201–207.

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

Mužiková, J., Hávová, Š., Ondrejček, P., Komersová, A., & Ločař, V. A Study of Tablets with a Co-Processed Dry Binder Containing Hypromellose and α -Lactose Monohydrate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2014, 24(1), 100-104

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. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 141, 105-115.

Oh, C. M., Ru Shan Siow, C., Wan Sia Heng, P., & Chan, L. W. Impact of HPMC on the physical properties of spray-congealed PEG microparticles and its swelling effect on rifampicin dissolution. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2015, 42(3), 403–411

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, Z. A., Meeus, J., Guns, S., Van den Mooter, G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 453(1), 253–284.

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

Poozesh, S., Bilgili, E., Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 562, 271-292.

Sacchetti, C., Artusi, M., Santi, P., Colombo, P. Caffeine microparticles for nasal administration obtained by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242(1-2), 335–339.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Deksametazon Sandoz 4 mg/ml otopina za injekciju, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno: 20.11.2019.

Sensoy, D., Cevher, E., Sarıcı, A., Yılmaz, M., Özdamar, A., & Bergişadi, N. Bioadhesive sulfacetamide sodium microspheres: Evaluation of their effectiveness in the treatment of bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 72(3), 487–495.

Singh, A., Van den Mooter, G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015.

Smart, J. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(11), 1556–1568.

Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses : A review. *Silpakorn Univ Int J*, 2003, 3, 206–228.

Ståhl, K., Claesson, M., Lilliehorn, P., Lindén, H., & Bäckström, K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 233(1-2), 227–237.

Tamilvanan S., Progress in the Design of Biodegradable Polymer-Based Microspheres for Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptide/Protein, *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Gad, SH, urednik, New Jersey, John Wiley and Sons, 2008, str.393-403.

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.

Ueda, K., Iwai, T., Sunazuka, Y., Chen, Z., Kato, N., Higashi, K., & Moribe, K. Effect of molecular weight of hypromellose on mucin diffusion and oral absorption behavior of fenofibrate nanocrystal. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 564, 39-47.

Uyen, N.T.T., Hamid, Z.A.A., Tram N.X.T., Ahmad N.B., Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019.

Van der Laan, S., Meijer, O.C., Pharmacology of glucocorticoids: Beyond receptors. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 585, 483-491.

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

Vijayakumar V., Subramanian K.G., Drug Carriers, Polymers as: Synthesis, Characterization, and In Vitro Evaluation. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 2016, 1-28.

Watts P, Smith A. PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6, 543-552.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Paul Knox JP. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*, 2001, 47, 9–27.

Wu, W., Zhang, Z., Xiong, T., Zhao, W., Jiang, R., Chen, H., & Li, X. Calcium ion coordinated dexamethasone supramolecular hydrogel as therapeutic alternative for control of non-infectious uveitis. *Acta Biomaterialia*, 2017, 61, 157–168.

Zhang, M., Moore, G. A., Jensen, B. P., Begg, E. J., & Bird, P. A. Determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate in human plasma and cochlear perilymph by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(1), 17–24.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Nazalna primjena kortikosteroida indicirana je u liječenju akutnih i kroničnih upalnih bolesti sluznice nosa. Nedostatak registriranih pripravaka u obliku kapi ili spreja za nos je kratko zadržavanje na mjestu primjene. Zbog toga se razvijaju novi terapijski sustavi koji osiguravaju dulji kontakt s nosnom sluznicom i kontrolirano oslobađanje lijeka, a jedan od takvih sustava su polimerne mikrosfere s uklopljenim lijekom za nazalnu primjenu.

U ovom diplomskom radu metodom sušenja raspršivanjem pripremljene su mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP). Cilj rada bio je ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na svojstva dobivenih mikrosfera koja su važna kod nazalne primjene praškastih sustava.

Mikrosfere s uklopljenim NDP-om masenog omjera pektina i hipromeloze od 1:0, 1:1, 1:2 i 2:1 uspješno su pripremljene sušenjem raspršivanjem otopine NDP-a koncentracije 0,01% (*m/V*) i otopina polimera ukupne koncentracije 0,5% (*m/V*). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se od 46 do 64%. Dobivene mikrosfere karakterizirane su srednjim promjerom od $3,13 \pm 0,46$ i $3,82 \pm 0,32$ μm . Kod svih uzoraka mikrosfera uočena je slična raspodjela veličina čestica pri čemu oko 80% ima promjer manji od 5 μm . Sadržaj NDP-a iznosio je između 1,83 i 2,24%. U procesu bubrenja uočeno je da mikrosfere s većim sadržajem pektina u odnosu na hipromelozu pokazuju veći stupanj bubrenja u pročišćenoj vodi, dok uklopljeni lijek nema značajan utjecaj na svojstva bubrenja. Svi uzorci mikrosfera apsorbirali su značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Utvrđeno je brzo inicijalno oslobađanje lijeka tijekom prvih 60 min ($77,0 \pm 2,6$ - $89,4 \pm 5,9$ %), nakon čega slijedi sporija faza oslobađanja. Nije uočena značajna razlika u brzini oslobađanja lijeka između različitih uzoraka mikrosfera.

Nasal administration of corticosteroids is indicated in the treatment of acute and chronic inflammatory diseases of nasal mucosa. A disadvantage of registered drugs in the form of drops or nasal spray is short retention time on the application site. Therefore, new drug delivery systems with prolonged contact with nasal mucosa and controlled release of the drug at the site of administration are being developed, such as polymeric drug loaded microspheres.

In this diploma thesis, sodium dexamethasone phosphate (SDP) loaded microspheres based on pectin and hypromellose for nasal administration were prepared by spray-drying method. The aim of this study was to investigate the influence of pectin to hypromellose weight ratio in the polymeric matrix on the obtained microspheres' properties which are important for nasal powder systems.

SDP loaded microspheres with pectin to hypromellose weight ratio of 1:0, 1:1, 1:2 and 2:1 were successfully prepared by spray-drying of SDP solution at concentration of 0.01% (w/v) and polymer(s) solution at total concentration of 0.5% (w/v). Process yield ranged between 46 and 64%. Obtained microspheres are characterized by mean diameter from 3.13 ± 0.46 to 3.82 ± 0.32 μm . A similar particle sizes distribution is observed in all microspheres samples with about 80% of particles having diameter smaller than 5 μm . Microspheres were characterized by drug loading from 1.83 to 2.24%. In the swelling process, microspheres with higher pectin content in comparison to hypromellose showed a higher swelling degree, while the incorporated drug had no significant effect on the swelling properties. All microsphere samples absorbed significantly less SNF volume per mass unit in comparison to the purified water. Rapid initial drug release during the first 60 min (77.0 ± 2.6 - $89.4 \pm 5.9\%$) was observed, followed by a slower release phase. No significant difference was observed in the *in vitro* release rate between different microsphere samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

MIKROSFERE TEMELJENE NA PEKTINU I HIPROMELOZI ZA NAZALNU PRIMJENU NATRIJEVOG DEKSAMETAZON FOSFATA

Matea Pačarić

SAŽETAK

Nazalna primjena kortikosteroida indicirana je u liječenju akutnih i kroničnih upalnih bolesti sluznice nosa. Nedostatak registriranih pripravaka u obliku kapi ili spreja za nos je kratko zadržavanje na mjestu primjene. Zbog toga se razvijaju novi terapijski sustavi koji osiguravaju dulji kontakt s nosnom sluznicom i kontrolirano oslobađanje lijeka, a jedan od takvih sustava su polimerne mikrosfere s uklopljenim lijekom za nazalnu primjenu. U ovom diplomskom radu metodom sušenja raspršivanjem pripremljene su mikrosfere temeljene na pektinu i hipromelozi s uklopljenim natrijevim deksametazon fosfatom (NDP). Cilj rada bio je ispitati utjecaj masenog omjera pektina i hipromeloze u polimernom matriksu na svojstva dobivenih mikrosfera koja su važna kod nazalne primjene praškastih sustava. Mikrosfere s uklopljenim NDP-om masenog omjera pektina i hipromeloze od 1:0, 1:1, 1:2 i 2:1 uspješno su pripremljene sušenjem raspršivanjem otopine NDP-a koncentracije 0,01% (m/V) i otopina polimera ukupne koncentracije 0,5% (m/V). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem kretalo se od 46 do 64%. Dobivene mikrosfere karakterizirane su srednjim promjerom od $3,13 \pm 0,46$ i $3,82 \pm 0,32$ μm . Kod svih uzoraka mikrosfera uočena je slična raspodjela veličina čestica pri čemu oko 80% ima promjer manji od 5 μm . Sadržaj NDP-a iznosio je između 1,83 i 2,24%. U procesu bubrenja uočeno je da mikrosfere s većim sadržajem pektina u odnosu na hipromelozu pokazuju veći stupanj bubrenja u pročišćenju vodi, dok uklopljeni lijek nema značajan utjecaj na svojstva bubrenja. Svi uzorci mikrosfera apsorbirali su značajno manji volumen SNF-a po jediničnoj masi u usporedbi s pročišćenom vodom. Utvrđeno je brzo inicijalno oslobađanje lijeka tijekom prvih 60 min ($77,0 \pm 2,6$ - $89,4 \pm 5,9$ %), nakon čega slijedi sporija faza oslobađanja. Nije uočena značajna razlika u brzini oslobađanja lijeka između različitih uzoraka mikrosfera.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 14 grafičkih prikaza, 5 tablica i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Natrijev deksametazon fosfat; Pektin; Hipromeloza; Sušenje raspršivanjem; Mikrosfere; 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. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: veljača 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

PECTIN AND HYPROMELLOSE BASED MICROSPHERES FOR NASAL DELIVERY OF DEXAMETHASONE SODIUM PHOSPHATE

Matea Pačarić

SUMMARY

Nasal administration of corticosteroids is indicated in the treatment of acute and chronic inflammatory diseases of nasal mucosa. A disadvantage of registered drugs in the form of drops or nasal spray is short retention time on the application site. Therefore, new drug delivery systems with prolonged contact with nasal mucosa and controlled release of the drug at the site of administration are being developed, such as polymeric drug loaded microspheres.

In this diploma thesis, sodium dexamethasone phosphate (SDP) loaded microspheres based on pectin and hypromellose for nasal administration were prepared by spray-drying method. The aim of this study was to investigate the influence of pectin to hypromellose weight ratio in the polymeric matrix on the obtained microspheres' properties which are important for nasal powder systems. SDP loaded microspheres with pectin to hypromellose weight ratio of 1:0, 1:1, 1:2 and 2:1 were successfully prepared by spray-drying of SDP solution at concentration of 0.01% (w/v) and polymer(s) solution at total concentration of 0.5% (w/v). Process yield ranged between 46 and 64%. Obtained microspheres are characterized by mean diameter from 3.13 ± 0.46 to 3.82 ± 0.32 μm . A similar particle sizes distribution is observed in all microspheres samples with about 80% of particles having a diameter smaller than 5 μm . Microspheres were characterized by drug loading from 1.83 to 2.24%. In the swelling process, microspheres with higher pectin content in comparison to hypromellose showed a higher swelling degree, while the incorporated drug had no significant effect on the swelling properties. All microsphere samples absorbed significantly less SNF volume per mass unit in comparison to the purified water. Rapid initial drug release during the first 60 min (77.0 ± 2.6 - $89.4 \pm 5.9\%$) was observed, followed by a slower release phase. No significant difference was observed in the in vitro release rate between different microsphere samples.

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

Thesis includes: 39 pages, 14 figures, 5 tables and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Sodium dexamethasone phosphate; Pectin; Hypromellose; Spray drying; Microspheres; 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
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2020.