

# Priprava i karakterizacija mikrosfera natrijevog hijaluronata i manitola za nazalnu primjenu pripremljenih sušenjem raspršivanjem

---

Ivanković, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:570824>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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



Luka Ivanković

**Priprava i karakterizacija mikrosfera natrijevog  
hijaluronata i manitola za nazalnu primjenu  
pripravljenih sušenjem raspršivanjem**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Laure Nižić Nodilo.

*Zahvaljujem mentorici, dr. sc. Lauri Nižić Nodilo na izdvojenom vremenu, stručnom vodstvu, jednostavnom i smirenom pristupu te velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Svojim prijateljima i kolegama zahvaljujem na druženju i pomoći tijekom studija uz koje su mi studentski dani prošli ljepše i zabavnije.*

*Posebno bih se htio zahvaliti svojim roditeljima, baki, dedi, bratu i sestri koji su kroz cijelo moje obrazovanje bili velika podrška i vjerovali u mene te mi omogućili sve kako bi uspio u svojim ciljevima.*

*Za kraj, najveće zahvale idu mojoj Ingrid koja mi je svaki dan učinila ljepšim i uvijek bila uz mene bez obzira na sve. Hvala na svakoj lijepoj riječi, podršci i bezuvjetnoj ljubavi.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Nazalna primjena lijekova.....	1
1.1.1. Građa nosne šupljine .....	1
1.1.2. Farmaceutski oblici za nazalnu primjenu .....	3
1.2. Sušenje raspršivanjem .....	4
1.3. Natrijev hijaluronat .....	5
1.4. Manitol .....	6
1.5. Veličina mikrosfera.....	7
1.6. Ostatna vlaga .....	8
1.6.1. Utjecaj vlage na stabilnost produkta.....	8
1.6.2. Utjecaj procesnih parametara na sadržaj ostatne vlage .....	8
1.7. Svojstva tečenja prašaka.....	9
1.8. Zeta potencijal .....	10
1.9. Bubrenje mikrosfera prilikom nazalne primjene.....	10
1.9.1. Bubrenje i mukoadhezija .....	10
1.9.2. Mukoadhezivni polimeri.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Materijali .....	15
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem.....	15
3.2.2. Sušenje raspršivanjem i izračun iskorištenja procesa .....	16
3.2.3. Određivanje sadržaja vlage.....	17
3.2.4. Mjerenje veličine mikrosfera .....	17
3.2.5. Određivanje svojstava tečenja prašaka .....	18
3.2.6. Mjerenje zeta potencijala uzoraka .....	19
3.2.7. Ispitivanje bubrenja mikrosfera .....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Iskorištenje sušenja raspršivanjem .....	21
4.2. Sadržaj vlage .....	22
4.3. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera .....	23
4.4. Svojstva tečenja mikrosfera.....	25
4.5. Zeta potencijal mikrosfera.....	26
4.6. Bubrenje mikrosfera .....	27

5. ZAKLJUČCI.....	30
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	31
7. LITERATURA.....	32
8. SAŽETAK.....	39
SUMMARY .....	40

## 1. UVOD

### 1.1. Nazalna primjena lijekova

Porast zainteresiranosti za nazalnu primjenu lijekova u posljednje je vrijeme prisutan u znanstvenoj zajednici zbog brojnih mogućnosti koji ovaj put primjene lijekova nudi. Neke od glavnih značajki jesu mogućnost dostave lijeka izravno u mozak, lokalno, specifično i brzo djelovanje lijeka, zaobilaznje krvno – moždane barijere kao i metabolizma prvog prolaska lijeka kroz jetru te smanjenje mogućnosti pojave sistemskih nuspojava (Kashyap i Shukla, 2019). Ono što ovaj neinvazivni i bezbolni put primjene lijekova čini dodatno pogodnim jesu jednostavnost i sigurnost primjene. Nadalje, nazalna primjena lijekova je i pogodan alternativni put primjene lijekova za pacijente koji nisu u stanju uzimati oralne oblike lijekova (Alghareeb i sur., 2024). Najčešće se koristi kod razvoja novih lijekova protiv bolova, cjepiva, lijekova protiv migrene, citostatika i hormonskih lijekova (Piazzini i sur., 2019).

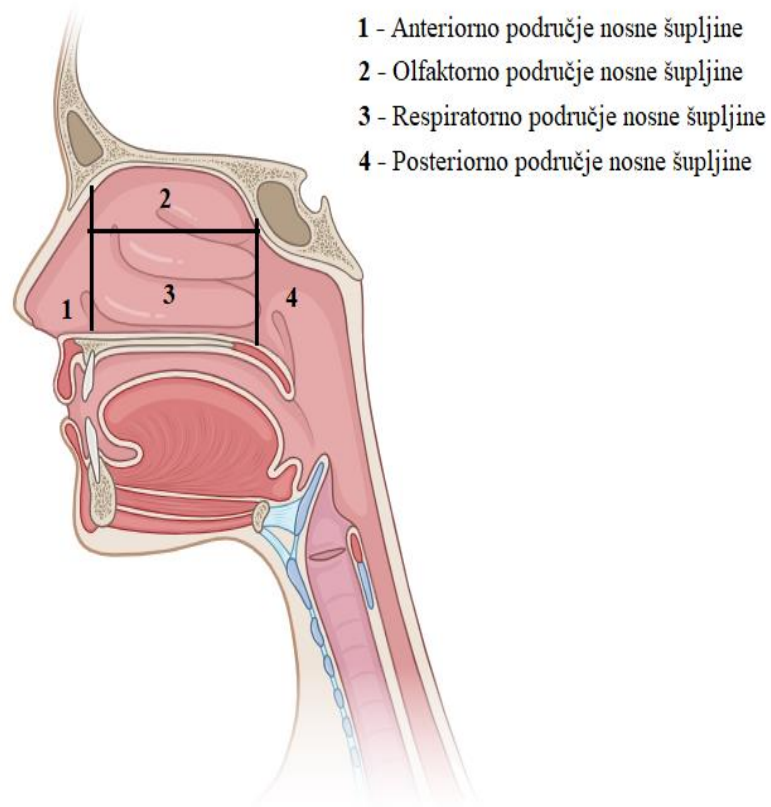
Izazovi u nazalnoj primjeni lijekova protežu se od jednostavnijih u vidu patoloških stanja kao što su obična prehlada ili rinitis, ali i do kompleksnijih kao što su složenost strukture nosne šupljine, mukocilijarni klirens i enzimaska razgradnja pojedinih lijekova, zbog čega je potrebno razvijati formulacije koje su sposobne nadvladati ove probleme i omogućiti adekvatno liječenje pacijenata ovim putem primjene lijekova (Kashyap i Shukla, 2019).

#### 1.1.1. Građa nosne šupljine

Anatomski dio tijela koji je u fokusu ovog rada naziva se nosna šupljina. Ona se sastoji od dvije nepovezane šupljine koje su odvojene pregradom zvanom septum. Volumni kapacitet same šupljine iznosi oko 15 mililitara, dok je ukupna površina oko 150 cm<sup>2</sup> (Chavda i sur., 2022).

Tri regije na koje se dijeli nosna šupljina nazivaju se vestibularna, respiratorna i olfaktorna (Slika 1.) Svaka od tih regija ima specifične funkcije te građu koje ih čine prikladnim mjestima za ciljanu dostavu lijekova. Regija najbliža nosnicama i dodiru s okolinom naziva se vestibularnom (ili anteriornom) regijom. Sadrži dlačice koje služe filtriranju udahnutih čestica kako bi se uklonile štetne čestice udahnute iz zraka. Apsorpcija lijekova u ovoj je regiji vrlo ograničena zbog njene male površine i višeslojnog pločastog epitela kojim je prekrivena. Iduća po redu je respiratorna regija koja je površinom i vaskulaturom najveća što ju čini dobrim mjestom za apsorpciju lijekova. Prekrivena je respiratornim epitelom koji sadrži četiri tipa stanica: vrčaste, cilijarne i necilijarne cilindrične te bazalne stanice. Ono što ovu regiju također čini jednom od glavnih meta u nazalnoj primjeni lijekova jest inerviranost ograncima trigeminalnog živca koji predstavlja jednu od potencijalnih meta za prijenos lijekova izravno u

središnji živčani sustav, odnosno mozak (Erdő i sur., 2018). Posljednja je olfaktorna regija koja je zaslužna za osjet njuha preko olfaktornih stanica koje se u njoj nalaze, ali je i izravna poveznica između nosne šupljine i središnjeg živčanog sustava pa je zbog toga glavna meta za izravnu dostavu lijekova do središnjeg živčanog sustava, zaobilazeći krvno – moždanu barijeru (Chavda i sur., 2022).



**Slika 1.** Građa nosne šupljine (izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com), korištena probna verzija)

### 1.1.2. Farmaceutski oblici za nazalnu primjenu

Trenutno najčešći oblici lijekova za nazalnu primjenu su tekuće formulacije koje dolaze u obliku kapi ili spreja. Nakon primjene farmaceutskog oblika lijeka nazalnim putem, kapljice ili čestice lijeka adheriraju na sluznicu u nosnoj šupljini. Neprestano micanje nosnih trepetljiki (cilija) dovodi do transporta sluzi prema grlu, što se naziva mukocilijarnim klirensom. Nedostatak konvencionalnih tekućih oblika jest kratko vrijeme zadržavanja na nazalnoj sluznici upravo zbog mukocilijarnog klirensa koji uklanja sav sadržaj iz nosne šupljine za 15 – 20 minuta, što rezultira smanjenom raspoloživosti lijeka na mjestu primjene (Trenkel i Scherlies, 2023). Inovativni farmaceutski oblici, kao što su *in situ* gelirajući sustavi, koriste se zbog sposobnosti da zadrže lijek u nosnoj šupljini, smanje mukocilijarni klirens i enzimsku razgradnju, te povećaju bioraspoloživost lijeka stvaranjem gela iz kojeg se lijek postepeno oslobađa (Agrawal i sur., 2020). Primjer jednog takvog oblika jest PecFent, otopina u obliku spreja za nos koja sadrži fentanil. Prilikom primjene dobiva se maglica koja se u nosnoj šupljini u dodiru s kalcijevim ionima pretvara u gel iz kojeg lijek difundira i apsorbira se putem sluznice. Apsorpcija intranazalno primjenjenog PecFenta vrlo je brza te vrijeme do postizanja vršne koncentracije ( $T_{max}$ ) iznosi u rasponu od 15 – 21 minute, dok u usporedbi s njime,  $T_{max}$  za oralni transmukozni oblik fentanila iznosi 90 minuta. Zbog toga se primjenom nazalnog oblika brže postiže vršna koncentracija lijeka u plazmi ( $C_{max}$ ) nego primjenom oralnog transmukoznog oblika. Relativna bioraspoloživost nazalnog oblika je otprilike 1,2 puta veća nego za oralni transmukozni oblik fentanila (PecFent, Sažetak opisa svojstava lijeka).

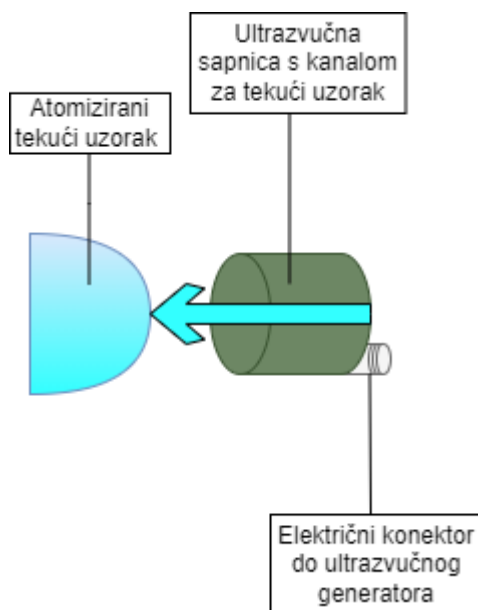
U današnje vrijeme, sve se više radi na razvoju praškastih farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu koji se pomno dizajniraju s ciljem savladavanja izazova nazalne primjene lijekova, odnosno s ciljem poboljšanja raspoloživosti i stabilnosti formulacija. U slučaju primjene nazalnih prašaka s ciljem systemske apsorpcije, bioraspoloživost je poboljšana zbog brze apsorpcije, male enzimske razgradnje i zaobilazjenja prvog prolaska kroz jetru. Ovaj put također pruža mogućnost uzimanja lijekova za pacijente koji nisu u mogućnosti koristiti oralne oblike lijekova (Espinoza i sur., 2019). U tu svrhu, praškastim se oblicima uz djelatnu(e), dodaju pomoćne tvari kao što su mukoadhezivni polimeri i inhibitori enzima. Mukoadhezivni polimeri jače se vežu za nazalnu sluznicu te usto navlače vodu čime usporavaju mukocilijarni klirens i time produljuju vrijeme zadržavanja lijeka na sluznici te omogućuju bolju raspoloživost lijeka. Inhibitori enzima koriste se kako bi zaštitili djelatne tvari kao što su proteini ili peptidi od enzimske razgradnje na sluznici i time povećali (bio)raspoloživost lijeka (Chavda i sur., 2022).



## 1.2. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem proces je čiji počeci datiraju još iz 19. stoljeća, točnije 1872. godine kada je patentiran. Proces se temelji na prevođenju tekućih oblika, kao što su otopine, suspenzije i emulzije u suhi, praškasti oblik uklanjanjem tekućeg disperzijskog sredstva uz pomoć zagrijanog plinovitog medija (Noske i sur., 2024). Zbog poboljšane mikrobiološke i kemijske stabilnosti, kao i lakšeg transporta, proces je široko korišten u farmaceutskoj, ali i prehrambenoj industriji (Dantas i sur., 2024).

Četiri glavna dijela uređaja za sušenje raspršivanjem su komora za sušenje, atomizator, aspirator i ciklon u kojem se sakuplja produkt sušenja. Nakon što se kapljice tekućine atomiziraju, ulaze u komoru za sušenje gdje se nalazi zagrijani plinoviti medij. Dolazi do isparavanja otapala i stvaranja čvrstih čestica koje se u ciklonu odvajaju od plinovitog medija i sakupljaju u spremnik za sakupljanje produkta (Ziaee i sur., 2019). Na izgled i fizičko-kemijska svojstva produkta ponajviše utječu procesni parametri kao što su ulazna i izlazna temperatura, kapacitet rada aspiratora te snaga sapnice. Kako bi se dobio uzorak sa što manje ostatne vlage, potrebno je ulaznu temperaturu držati što višom, a razliku između ulazne i izlazne temperature što manjom. Povećani kapacitet aspiratora osigurava kraće vrijeme zadržavanja u komori za sušenje, što rezultira boljim odvajanjem čestica u ciklonu, ali i većim sadržajem ostatne vlage. Veća snaga sapnice rezultira dobivanjem manjih čestica (Potočki, 2022). Dvije najčešće korištene vrste sapnica u procesima sušenja raspršivanjem jesu ultrazvučna i bifluidna sapnica. Bifluidne sapnice koriste strujanje dvaju plinova, jednog za atomiziranje, a drugog za održavanje potrebnog tlaka pod kojim se tekući uzorak atomizira. Pogodne su za uzorke visoke viskoznosti i za kontroliranje veličine atomiziranih kapljica (Liang i sur., 2018). Za razliku od bifluidnih, ultrazvučne sapnice rade na principu pretvaranja zvučnih valova visokih frekvencija u mehaničku energiju koja djeluje na tekući uzorak i po izlasku iz sapnice ga pretvara u kapljice odgovarajuće veličine (Slika 2.) ([www.sono-tek.com](http://www.sono-tek.com)).



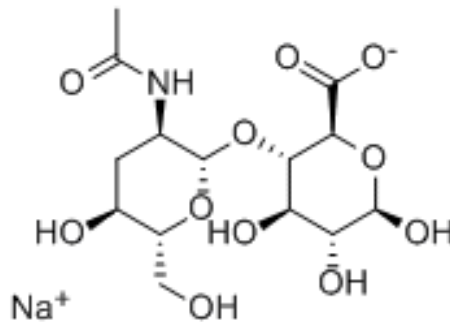
**Slika 2.** Shematski prikaz ultrazvučne sapnice (prilagođeno prema [www.sono-tek.com](http://www.sono-tek.com))

Neke od najvećih prednosti procesa su relativno kratko vrijeme sušenja, mogućnost korištenja tvari osjetljivih na povišenu temperaturu s obzirom da suhe čestice nikad ne dostižu ulaznu temperaturu sušenja, mogućnost dizajniranja produkata specifičnih karakteristika te dosljedna kakvoća praškastog produkta kroz cijeli proces, dok su najveći nedostaci procesa visoka cijena opreme te mala iskorištenja procesa (Ziaee i sur., 2019).

### 1.3. Natrijev hijaluronat

Hijaluronska kiselina supstanca je koja se prirodno nalazi u ljudskome organizmu u sklopu kože, zglobova i vezivnog tkiva i jedan je od ključnih dijelova izvanstaničnog matriksa. Njene ključne uloge u organizmu uključuju hidrataciju i lubrikaciju tkiva i kože, barijernu i potpornu funkciju, smanjivanje upalnog odgovora i pospješivanje zacjeljivanja rana (Adamyán i sur., 2024). Natrijev hijaluronat (Slika 3.) oblik je natrijeve soli hijaluronske kiseline čija se struktura sastoji od ponavljajućih disaharidnih jedinica Na-glukuronat-N-acetilglukozamina povezanih izmjenjujućim  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama čineći zajedno dugi polimerni lanac. Ovaj oblik topljiv je u vodi i ima dobru sposobnost navlačenja vode čime potiče hidrataciju tkiva (Cuomo i sur., 2024). Procesom sušenja raspršivanjem najčešće se formuliraju mikrosfere s natrijevim hijaluronatom kao jednim od ekscipijensa zbog njegove biokompatibilnosti i neimunogenosti, te mogućnosti uklapanja u sustave za parenteralnu upotrebu ili dostavu lijeka putem dišnog sustava. Kim i Kim (2015) proučavali su razvoj mikrosfera natrijeva hijaluronata

dobivenih sušenjem raspršivanjem u koje je bio uklopljen humani hormon rasta te su zaključili da se natrijev hijaluronat pokazao kao odličan ekscipijens zbog već navedenih svojstava. Martinelli i suradnici (2016) također su proučavali praškaste sustave s uklopljenim natrijevim hijaluronatom za dostavu lijekova u pluća, te su zaključili kako je natrijev hijaluronat u stanjima bolesti odličan izbor zbog svojih protuupalnih svojstava, remodeliranja tkiva te funkcijama povezanima s receptorom CD44.



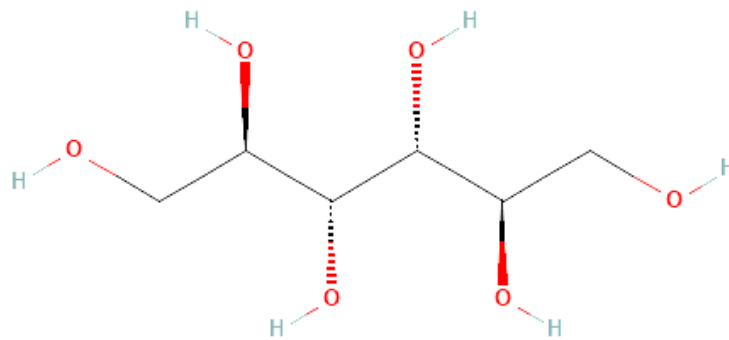
**Slika 3.** Struktura natrijeva hijaluronata (preuzeto s chemicalbook.com)

Zbog svojih dobrih svojstava, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i neimunogenosti, hijaluronska se kiselina često koristi u raznim područjima medicine kao što su ortopedija, oftalmologija, liječenje osteoartritisa, dermatologija, ali i u kozmetičke svrhe (Necas i sur., 2008). S obzirom na povoljan utjecaj na sluznice, u širokoj je upotrebi i u proizvodima za nazalnu primjenu kao što su fiziološke i hipertonične otopine za ispiranje i njegu nosne šupljine te nazalni dekongestivi ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

#### **1.4. Manitol**

Manitol (Slika 4.), kemijske formule  $C_6H_{14}O_6$ , prirodni je šećerni alkohol koji nastaje redukcijom manoze i glukoze. U biljkama i životinjama prisutan je u D-konfiguraciji te je izomer sorbitola od kojeg se razlikuje i po tome što nije higroskopan pa se zbog toga koristi kao pomoćna tvar u lijekovima sklonima hidrolizi (Blažon, 2021.). Za terapijski učinak farmaceutskih oblika koji u svom sastavu sadrže manitol bitni su veličina i morfologija čestica, koji se lako kontroliraju u procesu sušenja raspršivanjem (Yan i sur., 2024). Šećeri kao pomoćne tvari često se koriste za stabilizaciju proteina u formulacijama, te se manitol tu pokazao

najboljim jer poboljšava aerosolizacijska svojstva u formulacijama za inhalaciju (Arte i sur., 2024).



**Slika 4.** Struktura D-manitola (preuzeto s [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/))

U farmaceutskoj se industriji manitol pojavljuje u obliku kristaliničnog praška bijele boje i slatkog okusa. Najčešće se koristi kao punilo za čvrste oblike u postupcima vlažne granulacije i direktnog komprimiranja zbog svoje kemijske stabilnosti i smanjene mogućnosti za alergijske reakcije (Valentin i sur., 2022). Osim kao punilo, manitol se koristi i kao osmotski diuretik tako što povisuje osmolarnost krvne plazme što rezultira prelaskom vode iz tkiva u plazmu. Iz tog se razloga koristi u liječenju cerebralnog edema, povišenog intrakranijalnog tlaka i akutne insuficijencije bubrega ([www.pubchem.com](https://www.pubchem.com)). Manitol kao supstanca topljiva u vodi može povećati topljivost same formulacije, ali i pojačati proces navlačenja vode što može bitno utjecati na *in situ* formiranje gela ukoliko je manitol dio takve formulacije (Papakyriakopoulou i sur., 2021).

### 1.5. Veličina mikrosfera

Mjerenje veličine čestica za nazalnu primjenu lijekova koristi se za procjenu distribucije i mjesta odlaganja primijenjenih čestica u dišnome sustavu. Kako bi se osigurala depozicija mikrosfera u nosnoj šupljini i izbjegao njihov odlazak u donje dijelove dišnog sustava, potrebno je osigurati stvaranje mikrosfera prikladne veličine (Mitchell JP, 2021). Europska agencija za lijekove propisuje da većina čestica za nazalnu primjenu treba biti promjera većeg od 10  $\mu\text{m}$  kako ne bi došlo do odlaganja u donje dijelove dišnog sustava ([www.ema.europa.eu](https://www.ema.europa.eu)). Nadalje, odgovarajuća veličina čestica iznimno je bitna i zbog ciljanja gornjih regija nosne šupljine gdje su smješteni ogranci trigeminalnog i olfaktornog živca preko kojih se vrši izravna dostava iz nosne šupljine do mozga. Stoga je važno optimirati veličinu s obzirom na ciljanu regiju nosne šupljine (Pina Costa i sur., 2023; Perkušić 2022).

## **1.6. Ostatna vlaga**

### **1.6.1. Utjecaj vlage na stabilnost produkta**

Ostatna vlaga naziv je za vlagu zaostalu u farmaceutskom obliku prilikom nekih proizvodnih procesa poput sušenja raspršivanjem, liofilizacije ili vlažne granulacije (Nižić, 2017., Ohtake i Shalaev, 2013). Preveliki udio ostatne vlage u farmaceutskom obliku može dovesti do nedostatne stabilnosti i kakvoće proizvoda s obzirom da vlaga može ubrzati razgradnju djelatne i pomoćnih tvari, djelovati na svojstva tečenja i kompresibilnost te negativno utjecati na mikrobiološku stabilnost oblika. Postoje različiti mehanizmi kojima vlaga može negativno utjecati na stabilnost farmaceutskog oblika. Vlaga djeluje kao plastifikator, zatim može sudjelovati u kemijskoj reakciji kao reaktant ili kao produkt te može sniziti temperaturu staklišta čime je pokretljivost molekula manja (Ohtake i Shalaev, 2013). Kod prašaka inhalata, sadržaj vlage i količina adsorbirane vode na česticama uvelike mogu utjecati na fizičku stabilnost oblika te na kapilarne sile koje uzrokuju agregaciju čestica što negativno utječe na fizička svojstva prašaka (Depreter i Amighi, 2010).

### **1.6.2. Utjecaj procesnih parametara na sadržaj ostatne vlage**

Kako bi sadržaj vlage bio čim niži i samim time stabilnost oblika veća, moguće je na njega utjecati kontroliranjem procesnih parametara tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Focaroli i suradnici zaključili su u svojem istraživanju da su dva parametra koja imaju najveći utjecaj na količinu ostatne vlage u produktu sušenja raspršivanjem protok uzorka i ulazna temperatura plina za sušenje. Povećanjem ulazne temperature plina za sušenje, isparavanje otapala je učinkovitije i samim time dolazi do smanjenog udjela ostatne vlage u suhom produktu. Ipak, potrebno je uzeti u obzir i razliku ulazne i izlazne temperature. Što je ta razlika veća, veći je i konačni udio vlage (Singh i Van den Mooter, 2016). Stoga je potrebno pomno optimirati proces sušenja raspršivanjem s ciljem dobivanja produkta željenih svojstava. Udio ostatne vlage u suhom produktu povećava se i povećanjem protoka uzorka te ga je stoga potrebno smanjiti kako bi se smanjio udio vlage u produktu (Focaroli i sur., 2019). Parametar koji uz ova dva može također utjecati na udio ostatne vlage u produktu jest tlak na sapnici. Što je tlak na sapnici veći, dobivene kapljice uzorka su manje i iz tog razloga se brže suše čime se smanjuje udio ostatne vlage u produktu (Kanojia i sur., 2016).

### 1.7. Svojstva tečenja prašaka

Određivanje svojstava tečenja prašaka vrlo je važan korak u početnim fazama razvoja praškastih farmaceutskih oblika kako bi se njima moglo ispravno rukovati i dalje ih procesirati (Saw i sur., 2015). Uzrok nepredvidivosti svojstava tečenja prašaka jesu sile kohezije, odnosno privlačenja između istovrsnih čestica i sile adhezije, odnosno privlačenja između raznovrsnih čestica. Dva najčešće korištena parametra za određivanje svojstava tečenja prašaka jesu Hausnerov omjer i Carrov indeks zbog jednostavnosti mjerenja (Aulton i Taylor, 2018). Hausnerov omjer je omjer gustoće nakon potresivanja i nasipne gustoće praška te se prema izračunatoj vrijednosti zaključuje kakvih je svojstava tečenja određeni prašak. Tablica 1. prikazuje vrijednosti Hausnerovog omjera i svojstva tečenja praška kako propisuje Europska Farmakopeja.

**Tablica 1.** Povezanost svojstava tečenja s Hausnerovim omjerom (Ph. Eur. 9.0, 2016)

Hausnerov omjer	Tečenje
1,00-1,11	Izvršno
1,12-1,18	Dobro
1,19-1,25	Zadovoljavajuće
1,26-1,34	Prolazno
1,35-1,45	Loše
1,46-1,59	Vrlo loše
>1,60	Vrlo, vrlo loše

Uz Hausnerov omjer, u određivanju svojstava tečenja koristi se Carrov indeks koji se također računa pomoću nasipne gustoće i gustoće nakon potresivanja prema formuli:  $CI=100[(\rho_T-\rho_B)/\rho_B]$ , pri čemu oznaka CI označava Carrov indeks,  $\rho_T$  gustoću nakon potresivanja, a  $\rho_B$  nasipnu gustoću ispitivanog praška. Ukoliko je vrijednost Carrova indeksa iznad 25, smatra se da prašak posjeduje loša svojstva tečenja, dok se za praške s vrijednošću Carrova indeksa ispod 15 smatra da posjeduju dobra svojstva tečenja (Nandi i sur., 2020).

## **1.8. Zeta potencijal**

Zeta potencijal svojstvo je čestica koje označava elektrostatski potencijal čestica ili molekula u mediju, a proizlazi iz površinskog naboja, koncentracije i vrste iona u otopini. Određivanje zeta potencijala bitan je parametar kod korištenja mikrosfera za nazalnu primjenu zbog negativnog naboja staničnih membrana i interakcije nabijenih čestica i membrana (Lepur, 2017). Iako su stanične membrane negativno nabijene, do interakcije i mukoadhezije dolazi i kod negativno i kod pozitivno nabijenih čestica. Vrijednosti zeta potencijala izražavaju se u milivoltima te mogu biti pozitivne i negativne. Ukoliko vrijednosti iznose između -10 mV i +10 mV, čestice se smatraju relativno neutralnima, dok se čestice s izmjerenim vrijednostima manjim od -30 mV i većim od +30 mV smatraju izrazito anionskim, odnosno kationskim (Clogston i Patri, 2011). Mjerenje zeta potencijala odvija se po principu elektroforetske pokretljivosti, odnosno kretanja čestica i molekula između elektroda pod utjecajem električnog polja. Vrijednost izmjerenog zeta potencijala proporcionalna je brzini kretanja čestica jer će se čestice koje imaju veći naboj brže kretati između elektroda pod utjecajem električnog polja (Lepur, 2017., Mohammadi-Jam i sur., 2022).

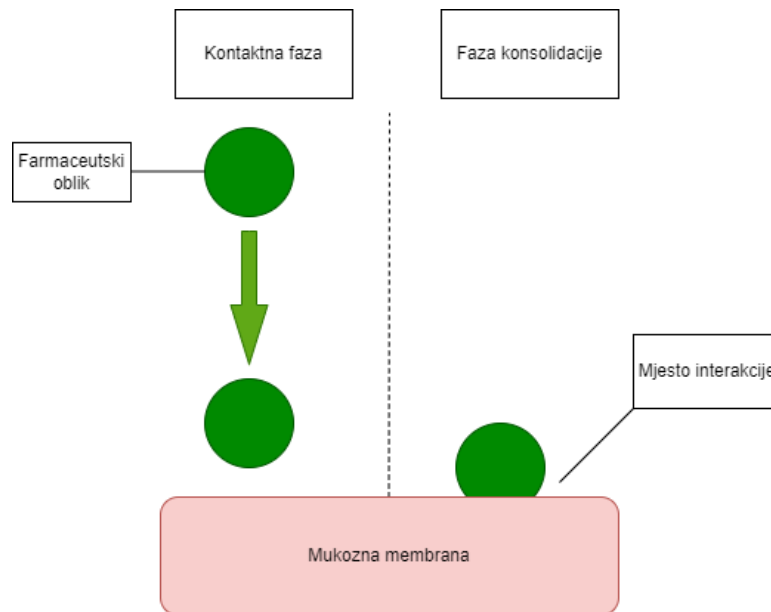
## **1.9. Bubrenje mikrosfera prilikom nazalne primjene**

### **1.9.1. Bubrenje i mukoadhezija**

Prilikom nazalne primjene farmaceutskih oblika namijenjenih za izravnu dostavu lijeka do mozga, važno je zadržati čestice lijeka u nosnoj šupljini i izbjeći njihov odlazak u donje dišne putove ili u probavni sustav i daljnje metaboliziranje prvim prolaskom kroz jetru. S ciljem produljenja zadržavanja čestica u nosnoj šupljini, a samim time i poboljšanja raspoloživosti uklopljenog lijeka, razvijaju se *in situ* gelirajući sustavi. Takvi sustavi temelje se na mukoadhezivnim polimerima sa sposobnošću bubrenja u nosnoj šupljini pri određenoj temperaturi, pH i prisutnosti iona (Pina Costa i sur., 2023).

Temelj primjene sustava koji bubre u nosnoj šupljini jest proces mukoadhezije, odnosno prijanjanja krutog praškastog oblika na sluznicu nosa. Ovaj se proces odvija u dva koraka prilikom kojeg se stvara veza između polimera i mukoze. Prvi korak naziva se kontaktna faza tijekom koje dolazi do močenja i bubrenja polimera na sluznici. Lanci polimera oslobađaju se u kontaktu s vodom i dolazi do stvaranja strukture gela. Drugi korak u procesu mukoadhezije

naziva se faza učvršćivanja (engl. *consolidation stage*) tijekom koje nastaju veze između polimernih lanaca i lanaca mucina iz sluznice te dolazi do penetracije polimera u utore tkiva nosne šupljine (Komati i sur., 2018). Mehanizam procesa mukoadhezije prikazan je na Slici 5.



**Slika 5.** Proces mukoadhezije u dva koraka (prilagođeno prema Gavini i sur., 2014)

Bubrenje polimera uvelike ovisi o svojstvima polimera te o fiziološkim čimbenicima u području bubrenja kao što su temperatura, pH, prisustvo iona i drugi. Primjerice, pretjerana hidratacija može negativno utjecati na adheziju čestica praška na sluznicu zbog pretjeranog bubrenja i povećanog stvaranja sluzi (Jurišić Dukovski i sur., 2019).

### **1.9.2. Mukoadhezivni polimeri**

Mukoadhezivni polimeri pokazali su se kao odličan izbor za nazalnu primjenu lijekova. Karakterizirani su prikladnom biokompatibilnosti, produljuju kontakt lijeka s mjestom depozicije, a neki od njih se mogu ponašati kao pospješivači apsorpcije djelatne tvari. Osim toga, lako su dostupni, povoljni, biorazgradivi i nisu štetni za upotrebu s obzirom da se ne apsorbiraju u sistemsku cirkulaciju pa samim time nisu toksični za organizam (Dolanjski, 2020, Gazzaniga i sur., 2008, Wu i sur., 2019).

Prvi mukoadhezivni polimeri otkriveni su u 20. stoljeću te ih prema razdoblju otkrića dijelimo u dvije generacije. Prvu generaciju čine prirodni i sintetski hidrofilni polimeri poput derivata celuloze, hijaluronata, pektina, škroba, alginata i kitozana koji u svojoj strukturi sadrže



funkcionalne skupine, kao što su karboksilna, hidroksilna i amino skupina preko kojih tvore vodikove veze s nazalnom sluznicom. Unutar prve generacije postoji daljnja podjela na kationske, anionske i neionske polimere. Drugu generaciju čine noviji polimeri poput lektina i tiomera koji se vežu za površinu sluznice specifičnim vezanjem kemijskih struktura (Komati i sur., 2018).

Castellani i suradnici (2024) u svome su radu koristili alginat i hidroksietilcelulozu kao pomoćne tvari za nazalnu primjenu dopamina uklopljenog u lipidne nanočestice. Zaključili su kako je korištena smjesa mukoadhezivnih polimera pogodna za korištenje u željenu svrhu jer posjeduje zadovoljavajuća mukoadhezivna svojstva, ne iritira sluznicu te posjeduje svojstva pospešivača apsorpcije lijekova. U radu kojeg su objavili Javed i suradnici (2023) korišten je kitozan uklopljen u nanočestice s tobramicinom kako bi se poboljšala mukoadhezija i farmakokinetika. Zaključeno je da je zbog jakih površinskih naboja došlo do zadovoljavajuće mukoadhezije i produljenog kontakta lijeka s ciljanim mjestom primjene što je dovelo do poboljšane suradljivosti pacijenata zbog smanjenja učestalosti doziranja lijeka.

Lektini, kao predstavnici druge generacije mukoadhezivnih polimera, u posljednje su vrijeme sve više korišteni zbog svoje sposobnosti da se vežu na slobodne šećere, polisaharide, glikoproteine ili glikolipide. Također su dobri kandidati za lijekove koji se primjenjuju oralno zbog svoje rezistencije na kiseli pH i enzimsku degradaciju (Mansuri i sur., 2016). Adebisi i Conway (2014) koristili su mikrosfere s lektinima u eradikaciji i liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *Helicobacter pylori*, te su zaključili kako je zbog pojačane mukoadhezije produljeno i vrijeme zadržavanja antibiotika u želucu čime se poboljšava učinkovitost liječenja bolesti.

Tiomeri, kao i lektini, pripadaju drugoj generaciji mukoadhezivnih polimera. Sadrže tiolne skupine preko kojih se disulfidnim vezama vežu za glikoproteine mukoze bogate cisteinom (Bandi i sur., 2021). Koriste se za lijekove s kontroliranim oslobađanjem zbog sposobnosti mukoadhezije, otpornosti na razgradnju enzimima, bolje permeacije i stabiliziranja formulacija zbog čega povećavaju bioraspoloživost lijeka iz oralnih oblika (Zahra i sur., 2022).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalni put primjene lijekova sve se više istražuje u današnje vrijeme jer se pokazao sigurnim, neinvazivnim i bezbolnim načinom primjene lijekova (Alghareeb i sur., 2024). Odvija se kroz nosnu šupljinu te otvara mogućnost primjene lijekova izravno do mozga putem olfaktornog i trigeminalnog živca. Nazalnom primjenom lijeka zaobilazi se prvi prolazak kroz jetru te krvno-moždana barijera (Sipos i sur., 2021). Nazalni put primjene također se pokazao kao odličan alternativni put primjene lijekova za pacijente koji nisu u mogućnosti koristiti oralne oblike lijekova (Espinoza i sur., 2019). Većina odobrenih lijekova za nazalnu primjenu je u tekućem obliku. U posljednje vrijeme razvijaju se praškasti farmaceutski oblici za nazalnu primjenu koji su karakterizirani boljim profilom stabilnosti i duljim zadržavanjem na nazalnoj sluznici. Usto, omogućuju i postizanje veće koncentracije djelatne tvari na mjestu primjene (Tiozzo Fasiolo i sur., 2018).

Sušenje raspršivanjem dobro je poznata i često korištena metoda pripreme praškastih oblika iz tekućih u jednome koraku, te je uz to relativno jeftina i dosljedna. Jedna od glavnih prednosti sušenja raspršivanjem je mogućnost optimiranja formulacijskih i procesnih parametara čime se dobivaju produkti sa željenim fizičko-kemijskim svojstvima, kao što su veličina i oblik čestica (Strojewski i Krupa, 2022). Korištenje ultrazvučne sapnice kao atomizatora tekućeg uzorka omogućuje dobru kontrolu veličine dobivenih čestica te postizanje uže raspodjele veličine čestica (Khaire i Gogate, 2020).

Prilikom razvoja praškastog farmaceutskog oblika za nazalnu primjenu, bitno je odabrati prikladne pomoćne tvari te optimirati svojstva farmaceutskog oblika uzimajući u obzir anatomske i fiziološke značajke nosne šupljine. Većina čestica farmaceutskog oblika za nazalnu primjenu treba biti veća od 10  $\mu\text{m}$  s ciljem izbjegavanja prolaska praškastog sustava u donje dišne putove ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Za praškaste nazalne farmaceutske oblike važno je svojstvo navlačenja tekućine, odnosno bubrenja, kojim se stvara mukoadhezivni gel te omogućuje produljeno zadržavanje na mjestu primjene (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Natrijev hijaluronat je biokompatibilan, mukoadhezivan polimer koji ima povoljna biofarmaceutska svojstva za nazalnu sluznicu (Gelardi i sur., 2013). Manitol se koristi kao nosač u razvoju farmaceutskih oblika za nazalnu i pulmonalnu primjenu zbog dobrih svojstava aerosolizacije (Arte i sur., 2024). Korištenje mukoadhezivnih polimera omogućuje produljeni kontakt farmaceutskog oblika s nosnom sluznicom, dok inertno punilo osigurava prikladnu veličinu čestica za nazalnu primjenu.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj koncentracije manitola na fizičko-kemijska svojstva mikrosfera natrijevog hijaluronata i manitola pripremljenih procesom sušenja raspršivanjem. Pripremljenim mikrosferama određena su sljedeća svojstva: veličina čestica, sadržaj ostatne vlage, svojstva tečenja, zeta potencijal i svojstva bubrenja.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

U svrhu izrade mikrosfera u ovom radu korišteni su natrijev hijaluronat (Contipro, Češka), D-manitol (dalje u tekstu manitol; Lach-Ner, Češka) i pročišćena voda. Etanol (96%, *V/V*) korišten u metodama nabavljen je od proizvođača Gram-mol, Hrvatska. Za izradu simuliranog nosnog fluida (engl. *Simulated Nasal Fluid*, SNF) otopljeni su NaCl (Alkaloid AD, Sjeverna Makedonija) pri koncentraciji od 150 mM, KCl (Gram-mol, Hrvatska) pri koncentraciji od 40 mM i CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Njemačka) pri koncentraciji od 5,3 mM u pročišćenoj vodi.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Priprema otopina za sušenje raspršivanjem

Otopine za sušenje raspršivanjem izrađene su otapanjem izvaganog natrijevog hijaluronata u pročišćenoj vodi, uz miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 24 sata pri sobnoj temperaturi i zatim dodavanjem različitih količina manitola, te ponovnim miješanjem na magnetskoj miješalici 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Za kraj je provedeno soniciranje otopine kroz jednu minutu kako bi se uklonio preostali zrak iz otopine.

Sastav pripremljenih otopina prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav vodenih otopina za pripravu mikrosfera

Uzorak	Koncentracija natrijevog hijaluronata (% , <i>m/V</i> )	Koncentracija manitola (% , <i>m/V</i> )
1	0,5	5,0
2	0,5	6,0
3	0,5	7,0
4	0,5	8,0
5	0,5	10,0

### 3.2.2. Sušenje raspršivanjem i izračun iskorištenja procesa

Mikrosfere su izrađene postupkom sušenja raspršivanjem pomoću uređaja Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik, Švicarska) s ultrazvučnom sapnicom koji je prikazan na Slici 6. Ulazna temperatura tijekom sušenja iznosila je 120 °C, dok je izlazna temperatura iznosila između 71°C i 76°C. Aspirator je bio postavljen na 100 % kapaciteta, peristaltička pumpa na 5 %, a snaga ultrazvučne sapnice je bila postavljena na 65 %.

Za izračun iskorištenja procesa, prije samog sušenja raspršivanjem izvagana je prazna epruveta u koju je sakupljan praškasti uzorak nakon procesa sušenja raspršivanjem. Ta ista epruveta je izvagana i nakon sakupljanja praškastog uzorka dobivenog sušenjem raspršivanjem. Od mase epruvete s uzorkom oduzeta je masa prazne epruvete kako bi se dobila masa uzorka koja je uzeta u izračun iskorištenja. Masa suhe tvari određena je iz masenog udjela manitola i natrijevog hijaluronata u otopinama prije sušenja. Iskorištenje procesa (I) izračunato je pomoću te dvije vrijednosti masa pomoću formule:

$$I (\%) = \frac{\text{masa dobivenih mikrosfera (g)}}{\text{masa suhe tvari u otopini prije sušenja raspršivanjem (g)}} \times 100$$



Slika 6. Büchi Mini Spray Dryer B-290

### 3.2.3. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u uzorcima određen je pomoću halogenog vlagomjera (HX204, Mettler Toledo, SAD; Slika 7.) metodom gubitka pri sušenju. Nakon što je posudica na koju se stavlja uzorak postavljena u uređaj i tarirana, na nju je ravnomjerno nanoseno 0,2 grama uzorka mikrosfera i započeta je analiza pri čemu je uzorak sušen tijekom 2 minute pri temperaturi od 120 °C. Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultat je izražen kao udio izgubljene mase prilikom sušenja u postotku.



**Slika 7.** Halogeni vlagomjer (Mettler Toledo, model HX204)

### 3.2.4. Mjerenje veličine mikrosfera

Raspodjela veličina mikrosfera i udio mikrosfera promjera manjeg od 10  $\mu\text{m}$  analizirani su koristeći uređaj Mastersizer 3000 s Hydro SV ćelijom (Malvern Panalytical Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo; Slika 8.) metodom laserske difrakcije. Uzorak za analizu dobiven je dispergiranjem male količine mikrosfera (oko 5 mg) u 10 ml etanola (96%, *V/V*) koji je zatim soniciran s ciljem što boljeg dispergiranja mikrosfera. Prije mjerenja samog uzorka mikrosfera, uređaj je kalibriran etanolom kako bi se poništile pozadinske interferencije. Nakon toga, u ćeliju je dodan uzorak s mikrosferama i magnet kako bi se spriječila sedimentacija mikrosfera i nastanak većih aglomerata koji bi smetali u analizi. Uzorak je dodavan do zasjenjenja između 10 % i 20 %, nakon čega je pokrenuta analiza. Mjerenje je provedeno u pentaplikatu, a dobiveni

rezultati su izraženi vrijednostima  $D_v(10)$ ,  $D_v(50)$  i  $D_v(90)$ , kao i udjelom čestica manjih od  $10\ \mu\text{m}$ .



**Slika 8.** Mastersizer 3000

### 3.2.5. Određivanje svojstava tečenja prašaka

Svojstva tečenja praškastog uzorka mikrosfera određena su mjerenjem nasipne gustoće (engl. *bulk density*) i gustoće nakon potresivanja (engl. *tapped density*), odnosno izračunavanjem Hausnerovog omjera. Izvaganih 200 mg mikrosfera stavljeno je u plastičnu brizgaljku, čije je dno zatvoreno parafilmom i ljepljivom trakom. Odmah nakon dodatka uzorka u brizgaljku očitana je volumen prije potresivanja. Nakon toga, brizgaljka je potresivana do očitavanja volumena koji se ne mijenja dodatnim potresivanjem (oko 100 puta). Iz dobivenih volumena i poznate masa mikrosfera izračunate su nasipna gustoća i gustoća nakon potresivanja. Mjerenja su provedena u triplikatu za svaki pojedini uzorak. Hausnerov omjer izračunat je prema formuli:

$$\text{Hausnerov omjer} = \frac{\text{gustoća nakon potresivanja}}{\text{nasipna gustoća}}$$

### 3.2.6. Mjerenje zeta potencijala uzoraka

Za mjerenje zeta potencijala mikrosfera korišten je uređaj Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo; Slika 9.). Mala količina uzorka (vrh špatule) dispergirana je u 10 mL 10 mM otopine NaCl, nakon čega je pomoću šprice uzorak dodan u kivetu za mjerenje zeta potencijala. Kiveta je zatim zatvorena odgovarajućim čepićima i stavljena u uređaj kako bi se izmjerio zeta potencijal uzorka. Mjerenja svih uzoraka provedena su u triplikatu.



Slika 9. Zetasizer Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)

### 3.2.7. Ispitivanje bubrenja mikrosfera

Bubrenje mikrosfera ispitano je indirektnom, volumetrijskom metodom pomoću Franzove difuzijske ćelije (Martinac i sur., 2005). Franzova difuzijska ćelija postavljena je na metalni stalak i uravnotežena pomoću libele. Vanjski dio ćelije spojen je silikonskim cijevima s vodenom kupelji u kojoj se nalazila voda termostatorana pri 34 °C, dok je u receptorski dio ćelije kao medij za bubrenje dodana pročišćena voda u jednom, odnosno SNF u drugom setu mjerenja. Na polupropusnu poliamidnu membranu promjera pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka) kroz sito je ravnomjerno izvagano 10 mg mikrosfera i membrana je umetnuta između receptorskog i donorskog odjeljka ćelije. Tijekom 15 minuta praćeno je smanjivanje razine medija za bubrenje iz receptorskog odjeljka u postraničnoj cjevčici te je svake 3 minute pomoću graduirane šprice dodan potreban volumen medija za bubrenje.



Rezultati su izraženi kao ukupni volumen dodanog medija za bubrenje tijekom 15 minuta po masi mikrosfera na membrani, odnosno ukupni volumen dodanog medija za bubrenje tijekom 15 minuta po masi natrijevog hijaluronata u uzorku mikrosfera na membrani. Za svaki uzorak mjerenje je provedeno u triplicatu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Iskorištenje sušenja raspršivanjem

Procesom sušenja raspršivanjem pripravljene su mikrosfere manitola i natrijevog hijaluronata. Parametri sušenja kao što su ulazna temperatura (postavljena na 120 °C), izlazna temperatura (70 °C – 74 °C), kapacitet aspiratora (postavljen na 100 %), postavka peristaltičke pumpe (5 %, 2 mL/min) i snaga sapnice (postavljena na 65 %) bili su jednaki prilikom sušenja svih pripremljenih otopina. Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je u relativno uskom rasponu od 39,7 % do 45,1 % (Tablica 3.), pokazujući da raspon primijenjenih koncentracija manitola nije utjecao na iskorištenje procesa.

**Tablica 3.** Iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem

Uzorak	Konc. natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje (% <i>, m/V</i> )	Konc. manitola u otopini za sušenje (% <i>, m/V</i> )	Iskorištenje (%)
1	0,5	5,0	42,8
2	0,5	6,0	39,7
3	0,5	7,0	43,6
4	0,5	8,0	45,1
5	0,5	10,0	39,4

Valentin i suradnici (2022) sušili su otopinu manitola i polistirena koristeći uređaj Büchi Mini B-191. U navedenom radu, ulazna temperatura bila je 120 °C, izlazna temperatura iznosila je 43 °C, protok uzorka bio je 5 mL/min, a protok zraka 29,4 m<sup>3</sup>/h. Pri navedenim parametrima, dobiveno iskorištenje iznosilo je oko 25 %, što je znatno manje od iskorištenja dobivenih u ovome eksperimentu. Usporedbom rezultata u navedenom radu i rezultata dobivenih u ovom eksperimentu, može se zaključiti da su rezultati zadovoljavajući jer je pri postavljenim parametrima iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo znatno veće u usporedbi s iskorištenjem u navedenom radu.

## 4.2. Sadržaj vlage

U praškastim sustavima, vlaga može imati značajan negativni utjecaj na svojstva praška jer može uzrokovati promjenu površine čestica i aglomeraciju (Wu i sur. 2014). Nadalje, Shan i suradnici (2016) zaključili su kako visoki sadržaj vlage u uzorku može dovesti do aglomeracije čestica, a samim time i smanjenja stabilnosti mikrosfera i djelatnih tvari te da bi iz tog razloga sadržaj vlage u takvim uzorcima trebao biti manji od 10 %. Izmjereni sadržaj vlage za uzorke u ovom radu bio je u rasponu od  $1,25 \pm 0,50$  % do  $1,98 \pm 0,52$  % (Tablica 4.) što je izvrsno s obzirom na korišteni postupak dobivanja suhog produkta (Shan i sur., 2016).

**Tablica 4.** Sadržaj vlage u mikrosferama pripremljenim metodom sušenja raspršivanjem

Uzorak	Konc. natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje (% , <i>m/V</i> )	Konc. manitola u otopini za sušenje (% , <i>m/V</i> )	Sadržaj vlage (%)
1	0,5	5,0	$1,98 \pm 0,52$
2	0,5	6,0	$1,25 \pm 0,50$
3	0,5	7,0	$1,85 \pm 0,29$
4	0,5	8,0	$1,92 \pm 0,02$
5	0,5	10,0	$1,48 \pm 0,50$

Vrijednosti sadržaja vlage prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3).

Focaroli i sur. (2019) dokazali su u svome radu kako na sadržaj vlage prilikom pripreme uzoraka sušenjem raspršivanjem utječu ulazna temperatura i protok uzorka. Sadržaj vlage u njihovim uzorcima bio je između 1,5 i 6,1 %, a bio je najmanji kod uzoraka kod kojih je tijekom sušenja ulazna temperatura bila najveća, a protok uzorka najmanji. Ova dva parametra bili su jednaki za sve uzorke pripremljene u ovom eksperimentu, stoga nije iznenađujuće da su i vrijednosti sadržaja vlage slične za sve uzorke. Također se može zaključiti da sadržaj manitola u otopini za sušenje nije bitno utjecao na sadržaj vlage u mikrosferama.

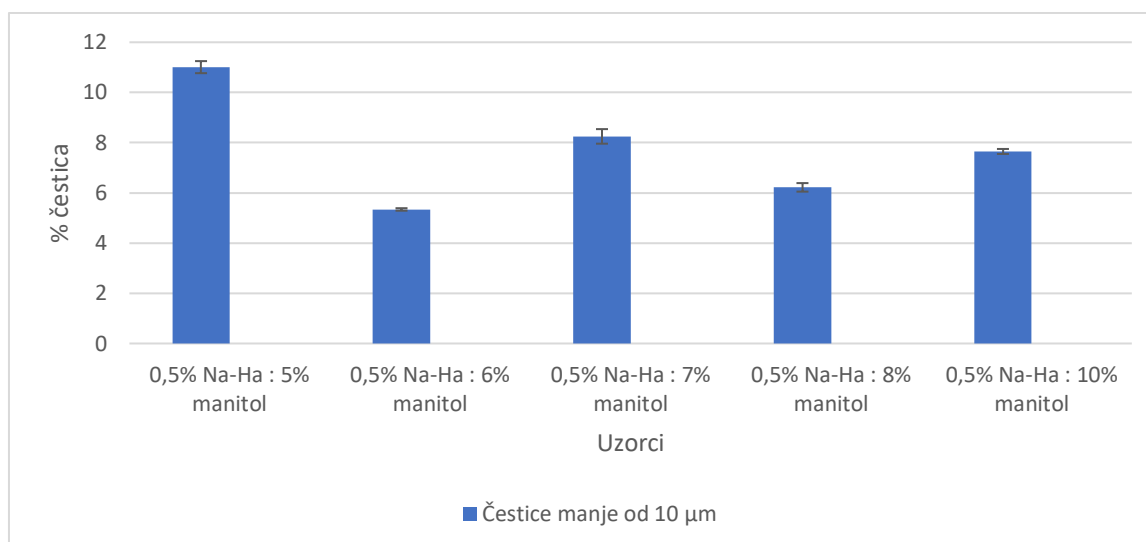
### 4.3. Veličina i raspodjela veličina mikrosfera

Većina farmaceutskih oblika u obliku prašaka sastoji se od čestica koje nisu pravilnog oblika sfere i koje su različitih veličina. Iz razloga što su nepravilnog oblika, njihova se veličina opisuje ekvivalentnim sferičnim promjerom koji označava promjer kugle koja odgovara čestici nepravilnog oblika u jednom od njenih svojstava (Aulton i Taylor, 2018). S obzirom da je u ovom eksperimentu metoda za mjerenje veličine čestica bila laserska difrakcija, rezultati su izraženi kao volumni promjeri  $D_v$ . Volumni promjer označava promjer sfere koja ima jednak volumen kao i promatrana čestica (Aulton i Taylor, 2018). Raspodjela čestica izražena je preko volumnih promjera  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$  koji označavaju promjer 10 %, 50 % i 90 % ukupnog volumena čestica u uzorku koje su manje od određene vrijednosti promjera (Pina Costa C. i sur., 2023). Jedan od načina dobivanja čestica s boljom raspodjelom veličina jest korištenje ultrazvučne sapnice koja zbog manje brzine atomizacije daje čestice čija je raspodjela veličina uža nego čestica dobivenih korištenjem drugih vrsta sapnica (Khaire i Gogate, 2020). S ciljem osiguravanja depozicije farmaceutskog oblika u nosnoj šupljini, većina čestica treba biti promjera većeg od 10  $\mu\text{m}$  (Europska agencija za lijekove, 2006). Stoga je u ovom radu određen i postotni udio čestica manjih od 10  $\mu\text{m}$ . Raspodjela veličina mikrosfera prikazana je u Tablici 5., dok je postotak čestica manjih od 10  $\mu\text{m}$  u pojedinom uzorku prikazan na Slici 10.

**Tablica 5.** Raspodjela veličina mikrosfera u uzorku

Uzorak	Konc. natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje (% $m/V$ )	Konc. manitola u otopini za sušenje (% $m/V$ )	$D_{v10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{v90}$ ( $\mu\text{m}$ )
1	0,5	5,0	$9,7 \pm 0,1$	$18,3 \pm 0,1$	$34,9 \pm 1,1$
2	0,5	6,0	$11,0 \pm 0,3$	$19,7 \pm 0,6$	$34,9 \pm 2,6$
3	0,5	7,0	$10,5 \pm 0,1$	$18,8 \pm 0,2$	$31,7 \pm 0,8$
4	0,5	8,0	$11,3 \pm 0,1$	$19,9 \pm 0,2$	$32,6 \pm 0,8$
5	0,5	10,0	$10,8 \pm 0,1$	$21,1 \pm 0,2$	$44,5 \pm 1,4$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=5).



**Slika 10.** Postotak čestica manjih od 10 µm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=5). Na-Ha – natrijev hijaluronat

Iz dobivenih rezultata u Tablici 5. vidljivo je da su vrijednosti  $D_{v10}$  i  $D_{v50}$  približno iste za sve uzorke, dok je vrijednost  $D_{v90}$  bila nešto veća za uzorak s 10 % manitola u otopini za sušenje. Generalno, povećanjem koncentracije čvrstih tvari u otopini za sušenje dobivaju se veće čestice, što su u svome radu dokazali He i sur. (1999). Iz podataka sa Slike 10. može se zaključiti da je uzorak s 5 % manitola sadržavao najveći udio čestica promjera manjeg od 10 µm te bi stoga bio lošiji izbor kao nazalni farmaceutski oblik u usporedbi s ostalim uzorcima u ovome eksperimentu jer ima više sitnih čestica koje su sklone depoziciji u donjim dišnim putovima.

#### 4.4. Svojstva tečenja mikrosfera

U svrhu određivanja svojstava tečenja mikrosfera, izmjerene su nasipna gustoća i gustoća nakon potresivanja. Iz te dvije vrijednosti izračunat je Hausnerov omjer za svaki uzorak mikrosfera, koji ukazuje na svojstva tečenja. Vrijednosti Hausnerovih omjera za svaki uzorak prikazane su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Hausnerov omjer za mikrosfere pripravljene sušenjem raspršivanjem

Uzorak	Konc. natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje (% <i>m/V</i> )	Konc. manitola u otopini za sušenje (% <i>m/V</i> )	Hausnerov omjer
1	0,5	5,0	1,765 ± 0,068
2	0,5	6,0	1,565 ± 0,037
3	0,5	7,0	1,722 ± 0,081
4	0,5	8,0	1,799 ± 0,030
5	0,5	10,0	1,857 ± 0,045

Vrijednosti Hausnerovog omjera su prikazane kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Iz dobivenih vrijednosti Hausnerovog omjera mikrosfera vidljivo je da uzorci ne pokazuju dobra svojstva tečenja. Najbolja svojstva tečenja imao je uzorak 2, pripremljen iz otopine s udjelom manitola od 6 % (*m/V*). Patil i suradnici (2021) uspoređivali su u svome radu svojstva tečenja kitozana kao pomoćne tvari zajedno s manitolom i krosprovidonom. Koncentracije manitola u uzorcima bile su od 8,2 % do 78,8 %. U uzorcima koji su kao jednu od pomoćnih tvari sadržavali manitol, vrijednosti Hausnerovog omjera iznosili su 2,04 za smjesu pomoćnih tvari koje su bile pomiješane fizički, odnosno 1,52 za smjesu pomoćnih tvari dobivenu sušenjem raspršivanjem.

Rezultati ovog rada uklapaju se u vrijednosti Hausnerovog omjera praškastih sustava s manitolom prijavljenih u literaturi. Koncentracija manitola u ovdje ispitivanom rasponu nije bitno utjecala na svojstva tečenja uzoraka. Praškasti produkt dobiven metodom sušenja raspršivanjem sastoji se od mikročestica koje su sklone aglomeraciji zbog male veličine čestica te posljedično velike površine prema volumenu. Iako takvi prašci pokazuju relativno loša svojstva tečenja, to nije indikator njihovog ponašanja prilikom primjene raspršivanjem u nosnu šupljinu (Juptner i Scherlies, 2019).

#### 4.5. Zeta potencijal mikrosfera

Zeta potencijal svojstvo je čestica koje ukazuje na stabilnost uzorka i rok valjanosti tekuće formulacije, kao i interakciju čestica uzorka s površinom. Stabilnost uzorka očituje se većom otpornošću disperzija na procese kao što su flokulacija i aglomeracija čestica (Lepur, 2017, [www.malvern.com](http://www.malvern.com)). Proces važan u okvirima ovog rada jest interakcija natrijevog hijaluronata iz mikročestica s nazalnom mukozom kako bi se mikrosfere što duže zadržale na samoj sluznici i time omogućile bolju lokalnu raspoloživost djelatne tvari, sistemsku apsorpciju djelatne tvari ili dostavu djelatne tvari do mozga putem olfaktornog i trigeminalnog živca, ovisno o željenom učinku i uklopljenoj djelatnoj tvari (Nižić Nodilo i sur., 2021). Vrijednosti zeta potencijala mikrosfera dobivenih u ovom eksperimentu prikazane su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Zeta potencijal mikrosfera

<b>Uzorak</b>	<b>Konc. natrijevog hijaluronata u otopini za sušenje (%<i>, m/V</i>)</b>	<b>Konc. manitola u otopini za sušenje (%<i>, m/V</i>)</b>	<b>Zeta potencijal (mV)</b>
1	0,5	5,0	-23,4 ± 1,7
2	0,5	6,0	-16,4 ± 1,4
3	0,5	7,0	-8,6 ± 2,0
4	0,5	8,0	-10,6 ± 1,7
5	0,5	10,0	-14,3 ± 3,4

Vrijednosti zeta potencijala prikazane su kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

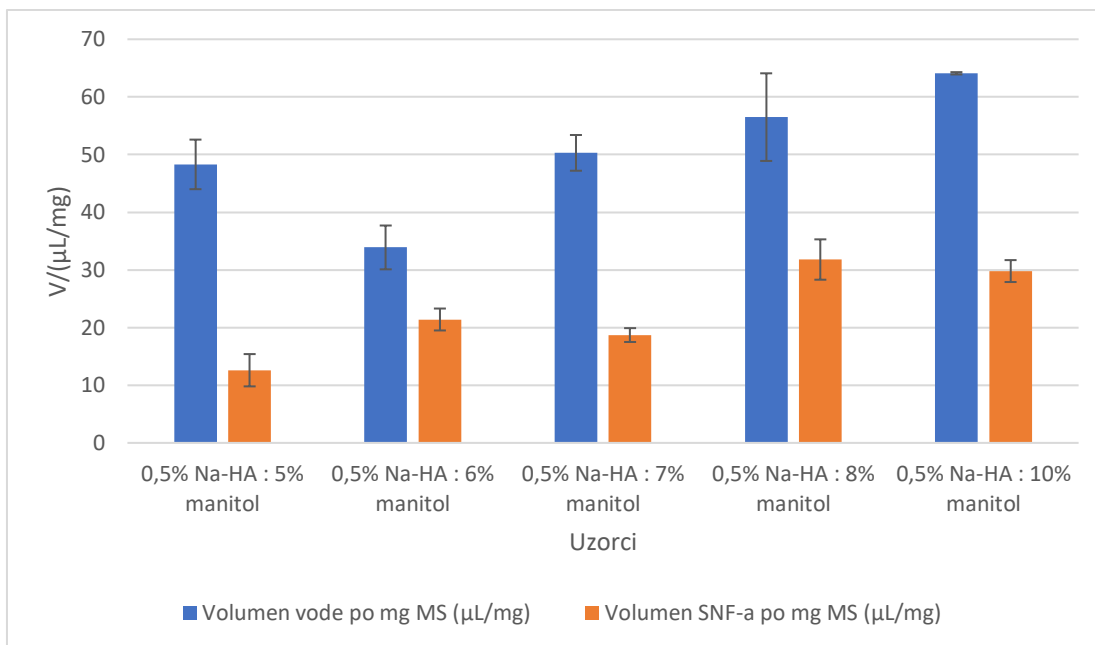
Iz rezultata u Tablici 7. vidljivo je da su sve vrijednosti zeta potencijala negativne, što je i očekivano s obzirom da su mikrosfere građene od natrijevog hijaluronata koji je negativno nabijen zbog negativno nabijene karboksilne skupine u svojoj strukturi ([www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)). Adheriranje mikročestica na sluznicu nosa može se protumačiti interakcijom natrijevog hijaluronata s mucinom koji je sastavni dio same sluznice. Joergensen i sur. (2011) proučavali su interakciju mucina i pektina, koji kao i natrijev hijaluronat korišten u ovom radu u svojoj strukturi ima negativno nabijene karboksilne skupine, te su zaključili kako je njihova interakcija posljedica odmotavanja polimernih lanaca zbog elektrostatskog odbijanja između dvije negativno nabijene molekule i ispreplitanja lanaca polimera s lancima mucina i time stvaranje mukoadhezivne veze (Joergensen i sur., 2011).

Uočen je veći zeta potencijal, odnosno manje apsolutne vrijednosti zeta potencijala kod uzoraka s većim udjelom manitola. U slučaju većeg udjela manitola u mikrosferama, manji je udio natrijevog hijaluronata, odnosno manji je broj negativno nabijenih skupina u uzorku. Prilikom razvoja mikrosfera za nazalnu primjenu, bitno je uzeti u obzir i omjer polimera i punila s ciljem osiguravanja optimalnog vremena zadržavanja na sluznici nosa.

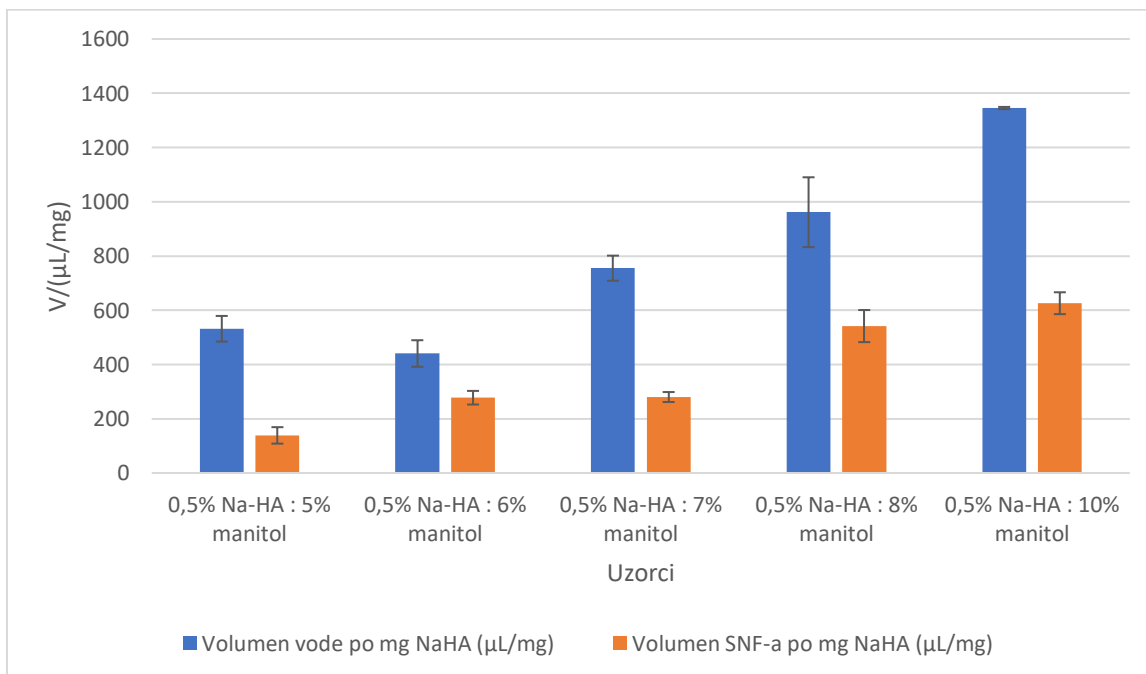
#### **4.6. Bubrenje mikrosfera**

Nazalnom primjenom suhih prašaka, u čijem se sastavu nalazi polimerna tvar, dolazi do adhezije na nazalnoj sluznici u nosnoj šupljini (Chaturvedi i sur., 2011). Ovakav tip interakcije naziva se mukoadhezivnim ponašanjem koje se *in vitro* ispituje, između ostalog, i određivanjem bubrenja mikrosfera (Duggan i sur., 2017). Kontrolirano bubrenje i formiranje hidrogela ključna je karakteristika nazalne primjene prašaka. Pretjerana hidracija može dovesti do povećanog stvaranja sluzi koja smanjuje adhezivnu moć formulacije (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Tijekom razvoja formulacije, potrebno je optimirati svojstva bubrenja mikrosfera jer pretjeranim bubrenjem mikrosfera može doći do osmotskog stresa i pucanja membrane epitelnih stanica nosne sluznice zbog dehidracije (Chaturvedi i sur., 2011). Bubrenje mikrosfera u ovom je radu ispitano korištenjem Franzove difuzijske ćelije uz pročišćenu vodu i SNF kao medije za bubrenje. Rezultati bubrenja izraženi su kao volumen apsorbiranog medija po miligramu mikrosfera, odnosno polimera kroz period od 15 minuta. Usporedba rezultata bubrenja u pročišćenoj vodi i SNF-u izraženih volumenom medija apsorbiranom po miligramu mikrosfera prikazana je na Slici 11., dok Slika 12. prikazuje volumen pročišćene vode ili SNF-a apsorbiranog po miligramu polimera natrijevog hijaluronata.





**Slika 11.** Bubrenje mikrosfera u pročišćenju vodi i SNF-u izraženo volumenom medija (μL) apsorbiranom po miligramu mikrosfera u periodu od 15 minuta. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n=3).



**Slika 12.** Bubrenje mikrosfera u pročišćenju vodi i SNF-u izraženo volumenom medija (μL) apsorbiranom po miligramu natrijevog hijaluronata u periodu od 15 minuta. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Iz rezultata prikazanih na Slici 11. i Slici 12. vidljivo je da je volumen apsorbiranog medija bio manji kada je medij bio SNF nego u slučaju kada je medij bila pročišćena voda. Volumen apsorbirane vode bio je u rasponu od  $33,9 \pm 3,8 \mu\text{L}/\text{mg}$  do  $64,1 \pm 0,2 \mu\text{L}/\text{mg}$  izraženo po miligramu mikrosfera, odnosno od  $440,6 \pm 48,9 \mu\text{L}/\text{mg}$  do  $1345,6 \pm 4,0 \mu\text{L}/\text{mg}$  izraženo po miligramu natrijevog hijaluronata, dok je volumen apsorbiranog SNF-a bio u rasponu od  $12,6 \pm 2,8 \mu\text{L}/\text{mg}$  do  $31,8 \pm 3,5 \mu\text{L}/\text{mg}$  izraženo po miligramu mikrosfera, odnosno od  $138,7 \pm 30,3 \mu\text{L}/\text{mg}$  do  $626,0 \pm 40,3 \mu\text{L}/\text{mg}$  izraženo po miligramu natrijevog hijaluronata. Jedan od razloga smanjenja volumena apsorbiranog medija prilikom korištenja SNF-a kao medija jest smanjena sposobnost bubrenja gela natrijevog hijaluronata zbog ionske jakosti samog medija (Shah i Barnett, 1992). Nadalje, uzevši u obzir manju topljivost manitola u SNF-u zbog prisustva soli u usporedbi s vodom, moguće da je to razlog što je volumen apsorbiranog SNF-a manji nego u slučaju kada je kao medij za bubrenje korištena pročišćena voda (Nižić Nodilo i sur., 2021).

Ono što je također vidljivo iz rezultata u oba slučaja jest povećanje apsorbiranog volumena medija po miligramu mikrosfera, odnosno polimera, porastom koncentracije manitola u uzorcima. Manitol ima veliku osmotsku aktivnost koja je zaslužna za povećano ovlaživanje prašaka (Nižić Nodilo i sur., 2021), što bi moglo objasniti ovu pojavu. Optimizacija procesa bubrenja je bitna kako ne bi došlo do pretjeranog bubrenja i dehidracije u epitelu nosne šupljine (Ali A i sur., 2019), te je stoga potrebno dobro razmotriti koncentraciju manitola kako bi se izbjegle neželjene pojave.

## 5. ZAKLJUČCI

- Mikrosfere s manitolom i natrijevim hijaluronatom uspješno su pripravljene sušenjem raspršivanjem otopina natrijevog hijaluronata (0,5 %, *m/V*) i manitola ( 5, 6, 7, 8 ili 10 %, *m/V*). Raspršivanje je provedeno korištenjem ultrazvučne sapnice (snaga: 65 %) te pri ulaznoj temperaturi od 120 °C, kapacitetu aspiratora od 100 % i postavci peristaltičke pumpe od 5 %.
- Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je u rasponu od 39,4 % do 45,1 %.
- Vrijednosti Hausnerovog omjera iznosile su od  $1,565 \pm 0,037$  do  $1,857 \pm 0,045$ . Najbolja svojstva tečenja pokazao je uzorak u kojem je koncentracija manitola iznosila 6 % (*m/V*) u ishodnoj otopini za sušenje.
- Sadržaj vlage u uzorcima bio je vrlo nizak, a iznosio je od  $1,25 \pm 0,50$  % do  $1,98 \pm 0,52$  %.
- Volumni promjeri pripremljenih mikrosfera,  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ , iznosili su redom  $9,7 \pm 0,1 - 11,3 \pm 0,1$  μm,  $18,3 \pm 0,1 - 21,1 \pm 0,2$  μm,  $31,7 \pm 0,8 - 44,5 \pm 1,4$  μm.
- Uzorak koji je sadržavao najveći postotak čestica manjih od 10 μm jest uzorak u kojem je koncentracija manitola u otopini za sušenje iznosila 5 %, *m/V*.
- Vrijednosti zeta potencijala za sve uzorke bile su negativne i u rasponu od  $-23,4 \pm 1,7$  mV do  $-8,6 \pm 2,0$  mV.
- U procesu bubrenja, mikrosfere su apsorbirale znatno veći volumen pročišćene vode u odnosu na apsorbirani volumen SNF-a.
- Uočen je porast volumena apsorbiranog medija s porastom koncentracije manitola u otopinama za sušenje.
- Rezultati provedenih mjerenja korisni su za daljnji razvoj praškastih farmaceutskih oblika za nazalnu primjenu pripremljenih sušenjem raspršivanjem.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

° - stupanj

° C – Celzijev stupanj

$\rho$  – gustoća

NaCl – natrijev klorid

KCl – kalijev klorid

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O – kalcijev klorid dihidrat

I – iskorištenje

SD – standardna devijacija

Na-Ha – natrijev hijaluronat

SNF – simulirani nosni fluid (*engl.* Simulated Nasal Fluid)

$D_v10$ ,  $D_v50$ ,  $D_v90$  – volumni promjeri, promjer čestica od kojeg manje čestice zauzimaju navedeni postotak ukupnog volumena uzorka

## 7. LITERATURA

Adamyanyan L, Pivazyanyan L, Krylova E, Kurbatova K, Tarlakyan V, Stepanian A. Hyaluronic acid in the prevention of adhesions after gynecological surgery: systematic review and meta-analysis, *Journal of Endometriosis and Uterine Disorders*, 2024, 6.

Adebisi AO, Conway BR. Lectin-conjugated microspheres for eradication of *Helicobacter pylori* infection and interaction with mucus, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 470, 28-40.

Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Dubey SK, Puri A, Gupta U, Kesharwani P, Ravichandiran V, Kumar P, Naidu VGM, Suryanarayana Murty U, Ajazuddin, Alexander A. Stimuli-responsive in situ gelling system for nose-to-brain drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2020, 327, 235-265.

Alghareeb S, Asare-Addo K, Conway B, Adebisi A. PLGA nanoparticles for nasal drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2024, 95

Ali A, Wahlgren M, Rembratt-Svensson B, Daftani A, Falkman P, Wollmer P, Engblom J. Dehydration affects drug transport over nasal mucosa, *Drug Delivery*, 2019, 26, 831-840.

Arte KS, Tower CW, Mutukuri TT, Chen Y, Patel SM, Munson EJ, Zhou Q. Understanding the impact of mannitol on physical stability and aerosolization of spray-dried protein powders for inhalation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 650.

Aulton ME, Taylor K. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. Edinburgh, Elsevier, 2018, str. 142-143.

Bandi SP, Bhatnagar S, Venuganti VVK. Advanced materials for drug delivery across mucosal barriers, *Acta Biomaterialia*, 2021, 119, 13-29.

Blažon S. Ispitivanje utjecaja laktoze i manitola na svojstva praškastog sustava s natrijevim deksametazon fosfatom za nazalnu primjenu. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2021.

Castellani S, Mallamaci R, De Giglio E, Caponio A, Guerra L, Fracchiolla G, Trapani G, Kristan K, Cardone RA, Passantino G, Zizzo N, Franzino G, Larobina D, Trapani A, Conese M. Slightly viscous dispersions of mucoadhesive polymers as vehicles for nasal administration of dopamine and grape seed extract-loaded solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 659, 124255.

Chaturvedi M, Kumar M, Pathak K. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2(4), 215-222.

Chavda V, Jogi G, Shah N, Athalye M, Bamaniya N, Vora L, Paiva-Santos AC. Advanced particulate carrier-mediated technologies for nasal drug delivery, *Jornal of Drug Delivery Science and Technology*, 2022, 74

Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement, *Methods Mol Biol*, 2011,697, 63-70.

Cuomo F, de Nigris A, Zeppa L, Lopez F, Ambrosone L. Viscometric properties of sodium hyaluronate and hypromellose solutions for medical devices, *Journal of Molecular Liquids*, 2024, 398.

Dantas A, Piella-Rifa M, Pontes Costa D, Felipe X, Gou P. Innovations in spray drying technology for liquid food processing: Design, mechanisms and potential for application, *Applied Food Research*, 2024, 4.

Depreter F, Amighi K. Formulation and in vitro evaluation of highly dispersive insulin dry powder formulations for lung administration. *Eu J Pharm Biopharm*, 2010, 454-463.

Dolanjski P. Izrada mikrosfera s natrijev deksametazon fosfatom: utjecaj sastava i brzine dotoka otopine pri sušenju raspršivanjem. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2020.

Duggan S, Cummins W, O'Donovan O, Hughes H, Owens E. Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 100, 64-78.

Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza A, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting, *Brain Research Bulletin*, 2018, 143, 155-170.

Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut, L, Cañas MA, Calpena AC. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*, 2019, 11, E64.

European Pharmacopoeia 9.0, Methods of Analysis, Flowability, 01/2008:20916, 2016, 321-322; Powder flow, 01/2010:20936, 2016, 362- 365.

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

35 trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery, *Int J Pharm*, 2019, 562, 228-240.

Gavini V, Ragini B, Kaumudi K. Mucoadhesive microspheres – A novel approach of drug targeting, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 3(10), 310-335.

Gazzaniga A, Palugan L, Foppoli A, Sangalli ME. Oral pulsatile delivery systems based on swellable hydrophilic polymers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 11–18.

Gelardi M, Iannuzzi L, Quaranta N. Intranasal sodium hyaluronate on the nasal cytology of patients with allergic and nonallergic rhinitis, *International Forum of Allergy and Rhinology*, 2013, 3, 807-813

He P, Davis S, Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 187, 53-65.

Javed S, Abbas G, Shah S, Rasul A, Irfan M, Saleem A, Hosny KM, Bukhary SM, Safhi AY, Sabei FY, Majrashi MA, Alkhalidi HA, Alissa M, Khan SM, Hanif M. Tobramycin-loaded nanoparticles of thiolated chitosan for ocular drug delivery: Preparation, mucoadhesion and pharmacokinetic evaluation, *Heliyon*, 2023, 19877.

Joergensen L, Klösgen B, Cohen Simonsen A, Borch J, Hagesaether E. New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 411, 162-168.

Jüptner A, Scherlies R. Spray Dried Formulations for Inhalation – Meaningful Characterisation of Powder Properties, *Pharmaceutics*, 2020, 12(1), 14.

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, 1915-1925.

Kanojia G, Willems GJ, Frijlink HW, Kersten GF, Soema PC, Amorij JP. A Design of Experiment approach to predict product and process parameters for a spray dried influenza vaccine, *Int J Pharm*, 2016, 511(2), 1098-1111.

Kashyap K, Shukla R. Drug Delivery and Targeting to the Brain Through Nasal Route: Mechanisms, Applications and Challenges, *Curr Drug Delivery*, 2019, 16, 887-901.

Khaire RA, Gogate PR. Novel approaches based on ultrasound for spray drying of food and bioactive compounds, *Drying Technology*, 2020, 39, 1832-1853.

Kim SJ, Kim CW. Development and Characterization of Sodium Hyaluronate Microparticle-Based Sustained Release Formulation of Recombinant Human Growth Hormone Prepared by Spray-Drying, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 105, 613-622.

Lepur A. Određivanje utjecaja procesnih parametara na veličinu i zeta potencijal čestica pripremljenih tehnikom sušenja raspršivanjem. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2017.

Liang W, Chow MYT, Fung Chow S, Chan H, Kwok PCL, Lam JKW. Using two-fluid nozzle for spray freeze drying to produce porous powder formulation of naked siRNA for inhalation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 552, 67-75.

Malvern Panalytical, 2024., <https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/pn12320>, pristupljeno 20.05.2024.

Mansuri S, Kesharwani P, Jain K, Tekade RK, Jain NK. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *Reactive and Functional Polymers*, 2016, 100, 151-172.

Martinac A.; Filipović-Grčić J.; Perissutti B.; Voinovich D.; Pavelić Ž.; Swelling study and evaluation of in vitro drug release properties, *Journal of Microencapsulation*, 2005, 22:5, 549-561.

Martinelli F, Balducci AG, Kumar A, Sonvico F, Forbes B, Bettini R, Buttini F. Engineered sodium hyaluronate respirable dry powders for pulmonary drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 517, 286-295.

Meralys HA Sažetak opisa svojstava lijeka, 2020., <https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Meralys-HA-1-mg-ml-sprej-za-nos-otopina-SPC.pdf>, pristupljeno 20.05.2024.

Mitchell JP. Particle Size Measurements from Orally Inhaled and Nasal Drug Products, *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.*, 2021, 34(6), 325-345.

Mohammadi-Jam S, Waters KE, Greenwood RW. A review of zeta potential measurements using electroacoustics, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2022, 309.



Nandi K, Jyoti Sen D, Patra F, Nandy B, Bera K, Mahanti B. Angle of repose walks on its two legs: Carr indeks and Hausner ratio, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 2020, 9, 1565-1579.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 23663392, Hyaluronic acid sodium salt. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hyaluronic-acid-sodium-salt>, pristupljeno 16.4.2024.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6251, Mannitol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mannitol>, pristupljeno 25.4.2024.

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, 2008, 53, 397-411.

Nižić L. Utjecaj brzine dotoka uzorka i protoka medija za sušenje na svojstva alginatnih mikročestica pripravljenih sušenjem raspršivanjem. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2017.

Nižić Nodilo, L.; Ugrina, I.; Špoljarić, D.; Amidžić Klarić, D.; Jakobušić Brala, C.; Perkušić, M.; Pepić, I.; Lovrić, J.; Saršon, V.; Safundžić Kučuk, M.; et al. A Dry Powder Platform for Nose-To-Brain Delivery of Dexamethasone: Formulation Development and Nasal Deposition Studies. *Pharmaceutics* 2021, 13, 795.

Noske S, Karimov M, Krüger M, Lilli B, Ewe A, Aigner A. Spray-drying of PEI-/PPI-based nanoparticles for DNA or siRNA delivery, *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 2024.

Ohtake S, Shalaev E. Effect of Water on the Chemical Stability of Amorphous Pharmaceuticals, I. Small Molecules, *J Pharm Sci*, 2012.

Papakyriakopoulou P, Manta K, Kostantini C, Kikionis S, Banella S, Ioannou E, Christodoulou E, Rekkas DM, Dallas P, Vertzoni M, Valsami G, Colombo G. Nasal powders of quercetin- $\beta$ -cyclodextrin derivatives complexes with mannitol/lecithin microparticles for nose-to-brain delivery: In vivo and ex vivo evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 607, 121016.

Patil S, Pandit A, Godbole A, Dandekar P, Jain R. Chitosan based co-processed excipient for improved tableting. *Carbohydr. Polym Technol Appl*, 2021, 2, 100071.

PecFent SmPC, Mediatly.com, <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 5.6.2024.

Pharmaceutical quality of inhalation and nasal products, 2017., <https://www.ema.europa.eu> , pristupljeno 4.3.2024.

Piazzini V, Landucci E, D'Ambrosio M, Tiozzo Fasiolo L, Cinci L, Colombo G, Pellegrini-Giampietro DE, Bilia AR, Luceri C, Bergonzi MC. Chitosan coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129, 267-280.

Pina Costa C., Nižić Nodilo L., Silva R., Martins E., Zadavec D., Kalogjera L., Moreira JN., Sousa Lobo JM., Hafner A., Silva AC. In situ hydrogel containing diazepam-loaded nanostructured lipid carriers (DZP-NLC) for nose-to-brain delivery: development, characterization and deposition studies in a 3D-printed human nasal cavity model, *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 644, 8

Potočki I. Utjecaj molekulske mase kitozana na svojstva mikrosfera s donepezilom pripremljenih sušenjem raspršivanjem. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 2022.

Saw HY, Davies CE, Paterson AHJ, Jones JR. Correlation between Powder Flow Properties Measured by Shear Testing and Hausner Ratio, *Procedia Engineering*, 2015, 102, 218-225.

Shah CB, Barnett SM. Swelling behavior of hyaluronic acid gels. *Journal of Applied Polymer Science*, 1992, 45, 293-298.

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.

Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 100, 27-50.

Sipos B, Csóka I, Budai-Szűcs M, Kozma G, Berkesi D, Kónya Z, Balogh GT, Katona G. Development of dexamethasone-loaded mixed polymeric micelles for nasal delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 166.

Strojewski D, Krupa A. Spray drying and nano spray drying as manufacturing methods of drug-loaded polymeric particles, *Polymers in Medicine*, 2022, 52(2), 101-111.

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, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 113, 2-17.

Valentin M, Coibion D, Vertruyen B, Malherbe C, Cloots R, Boschini F. Macroporous Mannitol Granules Produced by Spray Drying and Sacrificial Templating., *Materials (Basel)*. 2022, 16(1), 25.

Wu L.; Miao X.; Shan Z.; Huang Y.; Li L.; Pan X.; Yao Q.; Li G.; Wu C. Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9, 336-341.

Wu Y, Zhang W, Huang J, Luo Z, Li J, Wang L, Di L. Mucoadhesive improvement of alginate microspheres as potential gastroretentive delivery carrier by blending with Bletilla striata polysaccharide, *Int J Biol Macromol*, 2019.

Yan S, Zhang S, Dong Chen X, Duo Wu W. Spray freez dried uniform mannitol microspheres, *Powder Technology*, 2024, 119312.

Zahra T, Sarwar HS, Sarfraz M, Zaman M, Ahmad H, Jalil A, Shahnaz G, Sohail MF. Thiomers coated solid lipid nanoparticles for the enhanced oral bioavailability of tacrolimus: in-vitro and in-vivo evaluation, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2022, 77, 103892.

Ziaee A, Albadarin A, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 127, 300-318.

## 8. SAŽETAK

Sušenje raspršivanjem često je korišten tehnološki postupak u razvoju lijekova zbog jednostavnosti i mogućnosti pripremljanja produkata kontroliranih svojstava optimiranjem procesnih parametara postupka. Produkti sušenja raspršivanjem su prašci koji se koriste u razne svrhe, između ostalog i za razvoj nazalnih farmaceutskih oblika. Nazalnom primjenom lijekova zaobilazi se metabolizam prvog prolaska kroz jetru kao i krvno-moždana barijera što omogućuje dostavu lijeka izravno u središnji živčani sustav. Inovativni oblici za nazalnu primjenu koriste *in situ* gelirajuće polimere s ciljem duljeg zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici te kontroliranog oslobađanja.

U ovom radu pripravljene su mikrosfere natrijevog hijaluronata i manitola metodom sušenja raspršivanjem te su određena njihova fizičko – kemijska svojstva. U otopinama za sušenje varirana je koncentracija manitola (5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 10 %, *m/V*), dok je koncentracija natrijevog hijaluronata bila konstantna (0,5 %, *m/V*). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je u rasponu od 39,4 % do 45,1 %. Sadržaj vlage iznosio je od  $1,25 \% \pm 0,50 \%$  do  $1,98 \% \pm 0,52 \%$ . Volumni promjeri mikrosfera,  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  i  $D_{v90}$ , redom su iznosili  $9,7 \pm 0,1 - 11,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ,  $18,3 \pm 0,1 - 21,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$  i  $31,7 \pm 0,8 - 44,5 \pm 1,4 \mu\text{m}$ . Najveći  $D_{v90}$  zabilježen je za mikrosfere pripravljene iz otopine s 10 % manitola (*m/V*), dok je uzorak s 5 % manitola u otopini za sušenje (*m/V*) imao najveći udio čestica promjera većeg od 10  $\mu\text{m}$ . Svojstva tečenja uzoraka prikazana su Hausnerovim omjerom koji je bio u rasponu od  $1,565 \pm 0,037$  do  $1,857 \pm 0,045$ . Negativan zeta potencijal mikrosfera ( $-23,4 \pm 1,7 - -8,6 \pm 2,0$  mV) očekivan je zbog negativno nabijenih karboksilnih skupina natrijeva hijaluronata. Razvijene mikrosfere apsorbirale su znatno veći volumen pročišćene vode u odnosu na apsorbirani volumen simuliranog nosnog fluida tijekom procesa bubrenja. S porastom udjela manitola u mikrosferama, apsorbiran je veći volumen medija za bubrenje.

## SUMMARY

Spray drying is a commonly used technique in drug development due to its simplicity and the possibility of preparing products with controlled properties by optimizing the process parameters. Spray-dried products are powders that are used for various purposes, among others, for nasal drug delivery systems development. Nasal drug administration bypasses the first pass liver metabolism as well as the blood-brain barrier, which enables the delivery of the drug directly to the central nervous system. Innovative pharmaceutical forms for nasal administration use *in situ gelling* polymers to achieve longer retention of the drug on the nasal mucosa and its controlled release.

In this work, microspheres of sodium hyaluronate and mannitol were prepared by the spray drying method and their physical and chemical properties were determined. In the drying solutions, the concentration of mannitol was varied (5%, 6%, 7%, 8%, 10%, *m/v*), while the concentration of sodium hyaluronate was constant (0.5 %, *m/V*). The yield of the spray drying process ranged from 39.4% to 45.1%. The moisture content amounted to  $1.25\% \pm 0.50\%$  to  $1.98\% \pm 0.52\%$ . The volume diameters of the microspheres,  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$ , were  $9.7 \pm 0.1 - 11.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ,  $18.3 \pm 0.1 - 21.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$  and  $31.7 \pm 0.8 - 44.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$  respectively. The highest  $D_{v90}$  was recorded for microspheres from a solution with 10% mannitol (*m/v*), while the sample with 5% mannitol in the drying solution (*m/V*) had the highest proportion of particles with a diameter greater than 10  $\mu\text{m}$ . The flow properties of the samples were shown by the Hausner ratio, which ranged from  $1.565 \pm 0.037$  to  $1.857 \pm 0.045$ . The negative zeta potential of the microspheres ( $-23.4 \pm 1.7 - -8.6 \pm 2.0 \text{ mV}$ ) is expected due to the negatively charged carboxyl groups of sodium hyaluronate. The developed microspheres absorbed a significantly larger volume of purified water compared to the absorbed volume of simulated nasal fluid during the swelling process. With an increase in the mannitol ratio in the microspheres, a larger volume of the swelling medium was absorbed.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA MIKROSFERA NATRIJEVOG HIJALURONATA I MANITOLA ZA NAZALNU PRIMJENU PRIPRAVLJENIH SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM

Luka Ivanković

#### SAŽETAK

Sušenje raspršivanjem često je korišten tehnološki postupak u razvoju lijekova zbog jednostavnosti i mogućnosti pripremljanja produkata kontroliranih svojstava optimiranjem procesnih parametara postupka. Produkti sušenja raspršivanjem su prašci koji se koriste u razne svrhe, između ostalog i za razvoj nazalnih farmaceutskih oblika. Nazalnom primjenom lijekova zaobilazi se metabolizam prvog prolaska kroz jetru kao i krvno-moždana barijera što omogućuje dostavu lijeka izravno u središnji živčani sustav. Inovativni oblici za nazalnu primjenu koriste *in situ* gelirajuće polimere s ciljem duljeg zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici te kontroliranog oslobađanja.

U ovom radu pripravljene su mikrosfere natrijevog hijaluronata i manitola metodom sušenja raspršivanjem te su određena njihova fizičko – kemijska svojstva. U otopinama za sušenje varirana je koncentracija manitola (5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 10 %,  $m/V$ ), dok je koncentracija natrijevog hijaluronata bila konstantna pri 0,5 % ( $m/V$ ). Iskorištenje procesa sušenja raspršivanjem bilo je u rasponu od 39,4 % do 45,1 %. Sadržaj vlage bio je i iznosio je od  $1,25 \pm 0,50$  % do  $1,98 \pm 0,52$  %. Volumni promjeri mikrosfera,  $D_v10$ ,  $D_v50$  i  $D_v90$ , redom su iznosili  $9,7 \pm 0,1$  –  $11,3 \pm 0,1$   $\mu m$ ,  $18,3 \pm 0,1$  –  $21,1 \pm 0,2$   $\mu m$  i  $31,7 \pm 0,8$  –  $44,5 \pm 1,4$   $\mu m$ . Najveći  $D_v$  zabilježen je za mikrosfere iz otopine s 10 % manitola ( $m/V$ ), dok je uzorak s 5 % manitola u otopini za sušenje ( $m/V$ ) imao najveći udio čestica promjera većeg od 10  $\mu m$ . Svojstva tečenja uzoraka prikazana su Hausnerovim omjerom koji je bio u rasponu od  $1,565 \pm 0,037$  do  $1,857 \pm 0,045$ . Negativan zeta potencijal mikrosfera ( $-23,4 \pm 1,7$  -  $-8,6 \pm 2,0$  mV) očekivan je zbog negativno nabijenih karboksilnih skupina natrijeva hijaluronata. Razvijene mikrosfere apsorbirale su znatno veći volumen pročišćene vode u odnosu na apsorbirani volumen simuliranog nosnog fluida tijekom procesa bubrenja. S porastom udjela manitola u mikrosferama, apsorbiran je veći volumen medija za bubrenje.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 12 grafičkih prikaza, 7 tablica i 71 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Manitol; Natrijev hijaluronat; Mikrosfere; Sušenje raspršivanjem; Nazalna primjena lijeka

Mentor: **Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

**Dr. sc. Andrea Čeri**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### PREPARATION AND CHARACTERISATION OF SPRAY-DRIED SODIUM HYALURONATE AND MANNITOL MICROSPEHERS

Luka Ivanković

#### SUMMARY

Spray drying is a commonly used technique in drug development due to its simplicity and the possibility of preparing products with controlled properties by optimizing the process parameters. Spray-dried products are powders that are used for various purposes, among others, for nasal drug delivery systems development. Nasal drug administration bypasses the first pass liver metabolism as well as the blood-brain barrier, which enables the delivery of the drug directly to the central nervous system. Innovative pharmaceutical forms for nasal administration use *in situ gelling* polymers to achieve longer retention of the drug on the nasal mucosa and its controlled release. In this work, microspheres of sodium hyaluronate and mannitol were prepared by the spray drying method and their physical and chemical properties were determined. In the drying solutions, the concentration of mannitol was varied (5%, 6%, 7%, 8%, 10%, *m/v*), while the concentration of sodium hyaluronate was constant at 0.5% (*m/v*). The efficiency of the spray drying process ranged from 39.4% to 45.1%. The moisture content was and amounted to  $1.25\% \pm 0.50\%$  to  $1.98\% \pm 0.52\%$ . The volume diameters of the microspheres,  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  and  $D_{v90}$ , were respectively  $9.7 \pm 0.1 - 11.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ,  $18.3 \pm 0.1 - 21.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$  and  $31.7 \pm 0.8 - 44.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ . The highest  $D_{v90}$  was recorded for microspheres from a solution with 10% mannitol (*m/v*), while the sample with 5% mannitol in the drying solution (*m/v*) had the highest proportion of particles with a diameter greater than  $10 \mu\text{m}$ . The flow properties of the samples were shown by the Hausner ratio, which ranged from  $1.565 \pm 0.037$  to  $1.857 \pm 0.045$ . The negative zeta potential of the microspheres ( $-23.4 \pm 1.7 - -8.6 \pm 2.0 \text{ mV}$ ) is expected due to the negatively charged carboxyl groups of sodium hyaluronate. The developed microspheres absorbed a significantly larger volume of purified water compared to the absorbed volume of simulated nasal fluid during the swelling process. With an increase in the mannitol ratio in the microspheres, a larger volume of the swelling medium was absorbed.

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

Thesis includes: 40 pages, 12 figures, 7 tables and 71 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mannitol; Sodium hyaluronate; Microspheres; Spray drying; Nasal drug delivery

Mentor: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

**Andrea Čeri, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.