

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Технолошко-металуршки факултет

м-р Тамара Георгиевска

**МОДЕЛИРАЊЕ И ОПТИМИЗАЦИЈА НА ПРОЦЕСОТ НА
МИКРОЕНКАПСУЛАЦИЈА НА БИОАКТИВНИ
КОМПОНЕНТИ ВО ПОЛИСАХАРИДНИ МАТРИЦИ ПРЕКУ
ИМПЛЕМЕНТАЦИЈА НА ПРИНЦИПОТ
*КВАЛИТЕТ СПОРЕД ДИЗАЈН***

Докторска дисертација

Скопје, 2024

Докторанд: м-р Тамара Георгиевска

Тема: Моделирање и оптимизација на процесот на микроенкапсулација на биоактивни компоненти во полисахаридни матрици преку имплементација на принципот *квалитет според дизајн*

Ментор

д-р Кирил Лисичков, ред. проф.
Технолошко-металуршки факултет,
Институт за хемиско и контролно инженерство
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Членови на рецензентската комисија

д-р Катерина Атковска, вонр. проф. - претседател
Технолошко-металуршки факултет,
Институт за неорганска технологија
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

д-р Кирил Лисичков, ред. проф. - член
Технолошко-металуршки факултет,
Институт за хемиско и контролно инженерство
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

д-р Мирко Маринковски, ред. проф. - член
Технолошко-металуршки факултет,
Институт за хемиско и контролно инженерство
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

д-р Дарко Димитровски, вонр. проф. - член
Технолошко-металуршки факултет,
Институт за органска технологија
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

д-р Снежана Филип, вонр. проф. - член
Технички факултет „Михајло Пупин“ - Зрењанин
Катедра за основни и применети науки
Универзитет во Нови Сад, Р. Србија

Научно-истражувачко подрачје:	Техничко-технолошки науки
Научно-истражувачко поле:	Хемиско инженерство
Научно-истражувачка област:	Фармацевтско процесно инженерство
Датум на одбрана:	

АПСТРАКТ

Пристапот *квалитет според дизајн* (QbD) е глобално-регулативна иницијатива, којашто добива на значење во последната декада. Целта е да се подобри фармацевтскиот развој на еден лек преку проактивно моделирање и оптимизација на фармацевтско-производствениот процес и контроли за да се добива лек континуирано со посакуваниот квалитет, безбедност и ефикасност. Истражувањата и фармацевтски развој со примена на QbD пристапот во комплексни фармацевтско-технолошки процеси за моделирање на системи со контролирано ослободување на биоактивна компонента во областа на фармацевтска и фарманутритивна индустрија се ограничени.

За таа цел, во оваа докторска дисертација се дизајнирани два фармацевтско-технолошки процеси на микроенкапсулација: испарување на растворувач од емулзија и надворешно јонотропско гелирање за да се енкапсулираат биоактивни компоненти (ацетаминофен и етерично масло од портокал) со слични фармаколошки својства, во полисахаридни матрици. На добиените микрочестички и микрокапсули беше направена физичко-хемика карактеризација со: оптичка микроскопија, ласерска дифракција, FT-IR, TGA/DTG, DSC и UV-Vis спектрофотометрија. Исто така се евалуираше добиениот принос од пробите, *in vitro* кумулативен профил на ослободување и кинетичка студија, во која беа применети шест модели: нулти ред, прв ред, Higuchi, Hixson-Crowell, Weibull и Korsmeyer-Peppas.

Моделирање и оптимизација на микрочестичките и микрокапсулите со посакуваниот целен профил на квалитет на производот беше направена со D-оптимален експериментален дизајн. На избраниот формулациски состав беше направена евалуација на критичните процесни и формулациски променливи во една дизајн-матрицата, така што се примени неконвенционален пристап во експерименталниот дизајн. Изборот на независни променливи за воспоставување на дизајн-матрицата за двата процеси беше согласно идентификуваните критични атрибути на квалитет, критични процесни параметри и ризик анализа. Независни променливи за добивање на микрочестички беа: брзина на мешање на емулзија во тек на испарување на растворувач (процесна променлива) и удел на полимер во крајниот состав (формулациска променлива). Независни променливи за добивање на микрокапсулите беа: време на вмрежување и брзина на мешање на средство за вмрежување (процесни променливи) и удел на полимер и концентрација на средство за вмрежување (формулациски променливи).

Добиените микрочестички и микрокапсули се одликуваат со сферична и неправилна морфологија и псевдосферична морфологија, соодветно, додека распределбата на големина на честички е во опсег од 495 μm до 760 μm и од 1135 μm до 1893 μm (d_{50}), соодветно. Ефикасноста на енкапсулација во постапката испарување на растворувач од емулзија се зголемува пропорционално со зголемување на брзината на мешање на емулзијата во тек на испарување на растворувачот и уделот на полимерот. Од друга страна, во постапката надворешно јонотропско гелирање, ефикасноста на енкапсулација се зголемува со намалување на уделот на полимерот и времето на вмрежување. Утврдените зависимости преку UV-Vis спектрофотометриска аналитичка постапка се потврдија и со FT-IR анализата. Термичката стабилност на микрочестичките и микрокапсулите е до 200 °C. DSC анализите го потврдија присуството на уделот на ексципиентите во формулацијата. *In vitro* студијата во симулирани гастрични услови покажа дека ослободувањето од хидроксипропилцелулозната матрица е слично како во рН 6,8, додека ослободувањето од алгинатските микрокапсули е ограничено (помалку од 10 % за 2 часа). Со примена на истражуваните постапки за микроенкапсулација се добија микрочестички и микрокапсули со контролиран механизам на ослободување на биоактивните супстанции во рН 6,8 до четири часа и рН-средина 7,4 до пет часа, соодветно. Кинетичката студија потврди добивање на матрикс-структурни системи, така што микрочестичките со ацетаминофен ја следат $Q\sqrt{t}$ кинетика (модел на Higuchi). Механизмот на ослободување на биоактивна компонента од хидроксипропилцелулозата ја следи Фикова дифузија, со исклучок на неколку проби, кои следат аномален транспорт. Микрокапсулите го следат супер случај-II на транспорт, односно ослободувањето на етеричното масло се одвива по пат на бабрење, релаксација и ерозија на биополимерот. *In vitro* профилот на ослободување на микрочестичките беше спореден со комерцијално достапни препарати. Во однос на

комерцијално достапен препарат со конвенционален механизам на ослободување се покажа дека добиените микрочестички имаат модифициран профил на ослободување, а во однос на двослојни таблети со продолжено ослободување се покажа дека добиените микрочестички ослободуваат побрзо во период од четири часа. Оптимизацијата на микроенкапсулација се направи преку дизајн на експерименти со примена на методологија на одзивни површини. Фитување на резултатите се направи преку повеќекратна линеарна регресија за сите истражувани зависни променливи во двата истражувани системи, а добиените коефициенти на регресија се прифатливо високи. Разликата помеѓу предвидените и добиените експериментални вредности во оптимизационата студија е незначајна за истражуваните зависни променливи, што ја потврдува робушноста на математичките модели.

Врз основа на добиените резултати може да се заклучи дека принципите од пристапот *квалитет според дизајн* се успешно применети за моделирање и оптимизација на комплексен фармацевтско-технолошки процес со имплементирање на D-оптимален дизајн. Карактеризацијата на добиените микрочестички и микрокапсули покажа дека биоактивните компоненти се успешно енкапсулирани во полисахаридните матрици. Сепак, потребни се дополнителни истражувања за оптимизација на ефикасноста на енкапсулација и распределбата на големина на честички и изведување на студии на стабилност на добиените микрочестични системи со следење на критичните атрибути на квалитет, согласно дефинираниот целен профил на производ и евалуација на квалитетот на микрочестичките и микрокапсулите. Потребна е изведба и на токсиколошки и клинички студии за евалуирање на безбедноста и ефикасноста на етеричното масло од портокал со цел стандардизирање на неговата максимална дневна доза и негова примена како диететски или граничен производ.

Клучни зборови: микроенкапсулација, испарување на растворувач од емулзија, надворешно јонотропско гелирање, полисахаридни матрици, ацетаминофен, етерично масло од портокал, *квалитет според дизајн* пристап, D-оптимален експериментален дизајн, контролирано ослободување, носачи на биоактивни компоненти

ABSTRACT

Quality by design approach (QbD) is a global regulatory initiative that has gained much attention in the last decade. The aim is to improve the pharmaceutical development of a drug product by proactive modelling and optimization of a pharmaceutical-manufacturing process and controls to constantly deliver a product with desired quality, safety and efficiency. Studies applying QbD approach and pharmaceutical development involving complex pharmaceutical-technological processes to model systems with bioactive compound-controlled-release in pharmaceutical and pharma nutritive industry are limited.

For that purpose, two pharmaceutical-technological microencapsulation processes are designed in this doctoral dissertation: emulsion solvent evaporation (ESE) and ionotropic gelation (IG) to encapsulate bioactive compounds (acetaminophen and orange essential oil (EO)) with similar pharmacological properties in polysaccharide matrices.

The obtained microparticles and microcapsules have been physico-chemically characterized by optical microscopy, laser diffraction, FT-IR, TGA/DTG, DSC and UV-Vis spectrophotometry. Evaluation was performed on yield, *in vitro* cumulative release profiles and kinetic study, in which six models were applied: zero order, first order Higuchi, Hixson-Crowell, Weibull and Korsmeyer-Peppas.

Modelling and optimization of the microparticles and microcapsules with desired QTPP was performed by D-optimal experimental design. The chosen formulation was evaluated for critical process and formulation variables in one design-matrix by using a non-conventional approach in the experimental design. The independent variables for establishing the design-matrix for both processes were chosen based on the identified critical quality attributes, critical process parameters and risk assessment. The independent variables chosen to obtain microparticles were emulsion solvent evaporation mixing speed (process variable) and polymer content in final composition (formulation variable), whereas independent variables to obtain microcapsules were cross-linking time and mixing speed during cross-linking (process variables) and polymer content and cross-linker's concentration (formulation variables).

The obtained microparticles and microcapsules exhibit spherical and irregular morphology and pseudospherical morphology with a particle size distribution in range 495 μm to 760 μm and range 1135 μm to 1893 μm (d_{50}), respectively. Encapsulation efficiency (EE) in ESE is increased as the emulsion solvent evaporation mixing speed and polymer content increase. On the other hand, in IG process the encapsulation efficiency is increased as the polymer content and cross-linking time decrease. The established dependences by UV-Vis-spectrophotometric-based-analytical procedure are confirmed by FT-IR analysis. The thermal stability of both microparticulate forms is up to 200 °C. DSC analysis confirmed the presence of the excipients content in the formulation. The *in vitro* study revealed the drug release from hydroxypropyl cellulose (HPC)-based-matrix in simulated gastric conditions is similar as the release in pH 6.8, whereas the release from the alginate-based-microcapsules is limited (less than 10 % in two hours). By applying both researched microencapsulation-techniques, microparticles and microcapsules have been obtained with a controlled release of bioactive compounds in pH 6.8 up to four hours and in pH 7.4 up to five hours, respectively. The kinetic study confirmed an obtained matrix-based-structure system, thereafter the acetaminophen-loaded-microparticles follow $Q\sqrt{t}$ (Higuchi model). The release of bioactive compound from HPC-based-matrix followed Fickian diffusion, with exception of few trials that follow anomalous transport mechanism. On the other hand, the microcapsules follow super case II transport, i.e. the essential oil release mechanism is governed by swelling, relaxation, and erosion of the biopolymer. The microparticles *in vitro* comparative dissolution profile was compared with commercially available acetaminophen-based-drug products. Compared to the conventional release drug products, the obtained microparticles showed a modified release profile, whereas compared to the bilayered caplets with extended release, the obtained microparticle released the drug faster for a period of four hours.

Optimization of the microencapsulation process is conducted by DoE that is based on methodology of surface responses. Data fitting was performed by MLR and the regression coefficients for all investigated dependent variables in both systems are acceptably high. The bias between predicted and obtained experimental values in the optimization study was close for the investigated responses, confirming the robustness of the mathematical models.

Based on the obtained results, it can be concluded that the QbD principles are successfully implemented in modelling and optimization of a complex pharmaceutical-technological method by implementing a D-optimal design. Characterization of both obtained microparticulate-forms confirmed a successful bioactive compound encapsulation in polysaccharide matrices. Yet, further research in encapsulation efficiency and particle size distribution optimization is required, as well as conducting stability studies to follow-up the CQAs in accordance with the defined QTPP and to evaluate the quality of the microparticulate-dosage-forms. Execution of toxicological and clinical study is further needed to evaluate the safety and efficiency of orange essential oil in order to standardize the maximal daily dose and its application as dietary or marginal product.

Key words: microencapsulation, emulsion solvent evaporation, external ionotropic gelation, polysaccharide matrices, acetaminophen, orange essential oil, quality-by-design, D-optimal experimental design, controlled release, bioactive compound carriers

*Посветено на моите родители
Магдалена и Александар*

*за вашите родителски и пријателски дела, кои постојано искрено
покажуваа кои сте, многу повеќе од самите човечки доблести*

БЛАГОДАРНОСТ

Во оваа прилика би сакала да се заблагодарам на мојот ментор проф. д-р Кирил Лисичков за посветената поддршка во личното надградување како инженер преку докторските студии и волјата за пренесување на искуство.

Се заблагодарувам на проф. д-р Катерина Атковска за конструктивните совети и насоки за подобрување на трудот. Благодарност до проф. д-р Мирко Маринковски, проф. д-р Дарко Димитровски и проф. д-р Снежана Филип за прегледот и сугестиите кон дооформување на докторската дисертација.

Посебна благодарност до моите пријатели и колеги коишто ми помогнаа и ме поддржаа за да го достигнам и ова лично животно поглавје преку нивната стручност, искуство, трпение и бројните развиени дискусии.

Дел од докторскиот труд претставуваше пат, проследен со животни предизвици, поради коишто неминовно овој труд и влог ќе резултираше во друга насока. Ви заблагодарам Магде, Алек и Стефан што ми бевте поткрепа во тие моменти за да го реализирам во целост трасирањето на овој академски пат.

Искрено ја изразувам мојата благодарност кон мојот татко во постојаната поддршка низ деноноќно поминатите викенди во реализација на експерименталниот дел и на мојата мајка за двигателната сила низ овој академско-животен предизвик преку топли разговори, совети и споделеното животно искуство, кои беа светлината дури и во најтешките периоди. Стефан, заблагодарам што беше одлучен, трпелив и истраен со мене, кога овој труд се бореше со мене, што беше клучно за да ја разбираам смислата на непредвидливоста и за да ја осознам моќта на балансот.

Јас, м-р Тамара Георгиевска, изјавувам дека докторскиот труд го работев самостојно, дека уредно ги цитирам сите користени извори и литература и дека трудот не е користен во рамките на други универзитетски студии или за стекнување на друго звање.

м-р Тамара Георгиевска

Јас, м-р Тамара Георгиевска, изјавувам дека докторскиот труд во електронска верзија е идентичен со печатената верзија на докторски труд.

м-р Тамара Георгиевска

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	iii
ABSTRACT	v
Номенклатура	xii
ВОВЕД	1
1 ТЕОРЕТСКИ ДЕЛ И ЛИТЕРАТУРА	7
1.1 Микрочестички	7
1.2 Постапки за микроенкапсулација	9
1.2.1 Постапка на испарување/екстракција на растворувач од емулзија	9
1.2.2 Метод на јонотропско гелирање	13
1.3 Енкапсулирачки и енкапсулирани супстанци	16
1.3.1 Физичко-хемиски својства на енкапсулирачки супстанци	19
1.3.2 Физичко-хемиски својства на енкапсулирани супстанци	21
1.4 Кинетички модели за ослободување на енкапсулирани супстанци	23
1.5 Пристап <i>квалитет според дизајн</i> и експериментален дизајн	28
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ	35
2.1 Цел, предмет и хипотези на истражувањето	35
2.2 Примена на <i>квалитет според дизајн</i> пристап во развој на микрочестички и микрокапсули	37
2.2.1 Дефинирање на QTPP и CQAs за микрочестички и микрокапсули	38
2.2.2 Постапување на ризик анализа	40
2.2.3 Дизајн на процеси за микроенкапсулација на биоактивни супстанци	40
2.3 Материјали и методи	41
2.3.1 Материјали	41
2.3.2 Методи на добивање на микрочестички и микрокапсули	41
2.3.2.1 Метод на испарување на растворувач од емулзија	41
2.3.2.2 Метод на надворешно јонотропско гелирање	43
2.3.3 Методи на карактеризација на микрочестички и микрокапсули	44
2.3.3.1 Морфолошка анализа со примена на оптичка микроскопија	44
2.3.3.2 Определување на дистрибуција на големина на честички	44
2.3.3.3 Фуриеова трансформна инфрацрвена спектроскопија (FT-IR)	45
2.3.3.4 Диференцијално скенирачка калориметрија (DSC)	45
2.3.3.5 Термогравиметриска анализа (TG/DTG)	45
2.3.3.6 Ултра-виолетова спектрофотометрија (UV-Vis)	45
2.3.3.7 Определување на ефикасност на енкапсулација	45
2.3.3.8 <i>In vitro</i> метод за определување на растворливост	46
3 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	51
3.1 Дефинирање CQAs на микрочестички и микрокапсули	51
3.2 Ризик анализа за влијание на СМА и CQAs врз готов производ	53

3.3	Принос на микрочестички и микрокапсули	65
3.4	Карактеризација на микрочестички и микрокапсули	66
3.4.1	Морфолошка анализа на микрочестички и микрокапсули	66
3.4.2	Распределба на големина на микрочестички и микрокапсули	68
3.4.3	Фуриеова трансформна инфрацрвена спектроскопска анализа на микрочестички и микрокапсули.....	69
3.4.4	Термички својства на микрочестички и микрокапсули.....	73
3.4.5	Ефикасност на енкапсулација на микрочестички и микрокапсули.....	79
3.4.6	<i>In vitro</i> ослободување и кинетичка студија	84
3.5	Оптимизација на процес за добивање микрочестички	95
3.6	Оптимизација на процес за добивање микрокапсули	102
ЗАКЛУЧОК.....		115
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА		121
Листа на публикувани трудови поврзани со докторската дисертација.....		131

Номенклатура

API	Active pharmaceutical ingredient	Фармацевтско активно соединение
Ac	N-acetyl-para-aminophenol (paracetamol)	Парацетамол
ATR	Attenuated total reflectance	Придушена тотална рефлексija
AU	Absorbance units	Единици на апсорбанца
BBD	Box-Behken design	Бокс-Бехкен дизајн
BCS	Biopharmaceutical classification system	Биофармацевтски систем на класификација
BSA	Bovine serum albumin	Говедски албумин серум
CCD	Central composite design	Централен композитен дизајн
CDSS	Comparative dissolution	Компаративна растворливост
CLT	Crosslinking time (Modde)	Време на вмрежување
CMA	Critical method parameters	Критични параметри на суровина
COX	cyclooxygenase	Циклооксигеназа
CPP	Critical process parameter	Критичен процесен параметар
CQA	Critical quality attribute	Критичен атрибут на квалитет
DF	Dilution factor	Фактор на разредување
DoE	Design of Experiment	Дизајн на експеримент
DR	Drug release	Ослободен лек
DSC	Differential scanning calorimetry	Диференцијално скенирачка калориметрија
DSS	Dissolution	Растворливост
DTG	Derivative thermogravimetry	Деривативна термогравиметрија
EC	Ethyl cellulose	Етил целулоза
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care	Европски директорат за квалитет на лекови и медицинска грижа
EMA	European medicines agency	Европска агенција за лекови
FDA	Food and drug administration	Агенција за храна и лекови
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy	Фурје-трансформна инфрацрвена спектроскопија
H	High	Висок
HPC	Hydroxypropyl cellulose	Хидроксипропил целулоза
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose	Хидроксипропил метил целулоза
ICH	International council for harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	Интернационален совет за хармонизација на техничките барања за лекови за хумана употреба
L	Low	Низок
M	Medium	Среден
Mix	Mixing speed (Modde)	Брзина на мешање
MLR	Multiple linear regression	Повеќекратна линеарна регресија
NaAlg	Sodium alginate (Modde)	Натриум алгинат
NIST	National Institute of standards and technology	Национален институт на стандарди и технологија
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	Нестероидни анти-инфламаторни лекови
O/O	Oil-in-oil	масло-во-масло
O/W	Oil-in-water	масло-во-вода
OFAT	One factor at a time	Фактор-по-фактор
OTC	Over the counter	Лекови без рецепт

PA	Polyacetal	Полиацетал
ПАА	Polyacrylamine	Полиакриламин
РАСА	Poly(alkyl Cyanoacrylates)	Поли(алкил цианоакрилат)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)	Поли(капронлактон)
PEG	Poly(ethylene glycol)	Поли(етилен гликол)
PGA	Poly(glycolic acid)	Поли(гликолна киселина)
Ph.Eur.	Pharmacopeia european	Европска Фармакопеја
PHA	Preliminary Hazardous Analysis	Прелиминарна анализа на ризик
PHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylate	Полихидроксиетилметакрилат
PLA	Poly(lactic acid)	Поли(млечна киселина)
PLGA	Poly(lactic- <i>co</i> -glycolic acid)	Поли(лактат-ко-гликолна киселина)
PLS	Partial least squares	Парцијални најмали квадрати
PMMA	Poly(methyl methacrylate)	Поли(метил метакрилат)
POE	Poly(ortho ester)	Поли(орто естер)
Pol	Polymer content (Modde)	Удел на полимер
PSD	Particle size distribution	Распределба на големина на честички
PVA	Poly(vinyl alcohol)	Поли(винил алкохол)
QbD	Quality by design	Квалитет според дизајн
QbT	Quality by testing	Квалитет преку испитувања
QTPP	Quality target product profile	Целен профил н квалитетот на производот
R²	R-squared	Коефициент на корелација
RSD	Relative standard deviation	Релативна стандардна девијација
RSDs	Responsive surface designs	Дизајни на одзивни површини
RSM	Responsive surface methodology	Методологија на одзивни површини
SP	Stirring rate (Modde)	Брзина на мешање
TG	Thermogravimetry	Термогравиметрија
Tg	Glass transition temperature	Температура на стаклосување
Tm	Melting temperature	Температура на топење
USP	United States pharmacopeia	Фармакопеја на Соединетите Американски Држави
UV-Vis	Ultraviolet–visible	Ултравioletова-видлива
W/O	Water-in-oil	Вода-во-масло
W/W	Water-in-water	Вода-во-вода
WHO	World health organization	Светска здравствена организација
КТ	-	Контролен тест
ПК	-	Процесна контрола
САД	-	Соединетите Американски Држави

Вовед

ВОВЕД

Техниката на микроенкапсулација опфаќа бројни технолошки постапки, како што се: спреј-сушење, екструзија, коацервација, лиофилизација, микрофлуидизација, емулгирање, испарување/екстракција на растворувач од емулзија, јонотропско гелирање и други технолошки постапки. Многу процеси на микроенкапсулацијата претставуваат модификација на три основни техники: испарување/екстракција на растворувач од емулзија, фазна сепарација (коацервација) и спреј-сушење (Freitas, Hans, & Gander, 2005). Со микроенкапсулација се добиваат микрочестички, кои може да имаат различни функции. Технологијата на микроенкапсулација се применува во: фармацевтска индустрија, агрохемиска индустрија, прехранбена индустрија (Amaral, Andrade, & de Souto, 2019), индустрија за адхезиви, козметичка индустрија, биотехнологија, медицина и медицински уреди, производство на композити, бои и превлаки, експлоатација на нафта и гас (Lipovetskaya, 2010). Земајќи ја предвид широката примена на микроенкапсулацијата, голем е бројот на видовите на материјали кои можат да бидат енкапсулирани. Во оваа група се вбројуваат: фармацевтски активни соединенија (Murtaza, Ahmad, & Akhtar, 2009; Park & Kim, 2004; Hayatunnufus, Wati, & Budianto, 2019), клетки (Batubara, Rahayu, Mohamad, & Prasetyaningtyas, 2012; Capretto, Mazzitelli, Luca, & Nastruzzi, 2010), прехранбени материјали (Fioramonti, Stepanic, Tibaldo, Pavón, & Santiago, 2019), етерични масла (Ozcan & Kandirmaz, 2018; Aziz, Jai, Raslan, & Subuki, 2016; Burhan, Abdel-Hamid, Soliman, & Sammour, 2019), гени и ДНК (Zelikin, и др., 2007; Farris, Brown, Ramer-Tait, & Pannier, 2017), вакцини (Mazzara, и др., 2018), протеини (Mutaliyeva, и др., 2017), пестициди (Pérez-Martínez, Morillo, Maqueda, & Ginés, 2001) и хербициди (Lobo, и др., 2011). Најдобро познати микроенкапсулирани продукти се: хартија за фотокопирање без јаглерод, фотосензитивна хартија, микроенкапсулирани мириси („ленти за мирис“) и микроенкапсулирани ароми („изгреби и помирисај“). Најчесто, овие производи се добиени од желатин – акација по пат на комплексна коацервација. Продуктот „изгреби и помирисај“ се користи во козметички списанија, маркетинг продукти во прехранбена индустрија за ароми и во детски книги (Burgess & Hickey, 2007).

Формулациите кои се засноваат на микроенкапсулација како технолошка постапка сè почесто стануваат цел на истражување во 21. век во фармацевтската индустрија и фармацевтското-процесно инженерство. Микрочестичките се евалуираат за орална, парентерална, топикална, назална или инхалаторна администрација. Ова примарно се должи на можноста за контролирано и продолжено дејство на ослободување на енкапсулирана API, додека неослободениот лек може да биде заштитен од физиолошката средина и деградација. Применливоста на микроенкапсулација во фармацевтската индустрија нуди неколку супериорни предности во споредба со конвенционалните фармацевтски дозирани форми. Со помош на овој процес се заштитува API од деградација (реакции на оксидација, топлина, киселини и бази и ултра-виолетово зрачење); се добива подобрен квалитет во рамки на рок на употреба и може да се маскираат органолептичките својства на API, како вкус, мирис или боја. Во фармацевтската индустрија и за цели на медицинските науки, микросферите имаат

привлечено значајно внимание како дизајнирани системи за носач на лек со контролирано ослободување, но и за целно носење на цитостатици во местата заболени со тумор. Од страна на FDA се одобрени за употреба неколку API¹ за различни индикации: VIVITROL[®] (naltrexone, Alkermes, двојна емулзија), Trelstar[™] (triptorelin, Pfizer, фазна сепарација), Parlodel LAR[™] (bromocriptine, Novartis, спреј-сушење), Nutropin[®] Depot (somatropin, Genntech/Alkermes, криогено спреј-сушење), Sandostatin (octreotide acetate, Novartis, фазна сепарација) и други (FDA, 2023). Оваа категорија на комерцијализирани лекови се во форма на микросфери, кои во соодветниот дилуент се суспендираат и интрамускулно се аплицираат на пациентот. Од друга страна, комерцијално-достапни диететски суплементи со етерично масло во прашкаста форма се: тврди капсули со етерично масло од пеперминт, *Cinnamomum Camphora* и свеж ѓумбир (Puressentiel, Франција), тврди капсули со етерично масло од: еукалиптус, смил, камилица, лаванда, мајоран, лимон и други (Sunday Natural Products GmbH, Германија), меки капсули од смеса на етерични масла на ајован, оригано, цимет, ѓумбир, каранфилче, босилек, *Cinnamosma fragrans* и куркума и растително масло *Perilla* (Salvia Nutrition, Франција) и други диететски суплементи со етерично масло.

Искористувањето на предностите, што ги нудат микросферите во однос на конвенционалните фармацевтски дозирани форми и надминувањето на предизвиканите нус-појави од API-то, резултира со економски раст на комерцијализирани фармацевтски препарати со микросфери. Имено, вредноста на глобалниот пазар на микросфери во 2021 година била проценета за трипати повисока (6.150,92 милиони долари) во однос на 2010 година (2 милијарди долари), а се проектирало дека ќе генерира 13581,38 милиони долари до 2030 година (Straits research, 2022), што е за 3,9 пати повисока во однос на проекцијата за 2015 година (3,5 милијарди долари). Според извештајот „Микросфери: Технологии и глобални пазари“ објавен од страна на BBC во 2010 година, нови индустрии коишто придонесуваат за проектираниот економски раст биле медицинските и природните науки (Lipovetskaya, 2010). Растечката преваленца на хронични заболувања ја фаворизира и употребата на хербални медицински препарати. За ова говори и глобалната статистика на WHO којашто укажува дека поради хронични заболувања на глобално ниво годишно се бележат околу 41 милион смртни случаи. Во таа насока зголемената употреба на хербални препарати во фармацевтската индустрија се очекува да биде двигателна сила за пазарот на овој вид суплементи. Имено, се очекува раст од 319,63 милијарди долари во 2028 година. Очекуваниот растечки тренд се претпоставува дека ќе се должи на проширување на индустријата за производство на хербални препарати и диететски суплементи, зголементио акцент на одржливоста на животната средина и порастот на хроничните здравствени состојби (Reserach and Markets, 2024a). Комплементарно на овие проекции слични се и проекциите за раст на ексципиенси со нутритивен квалитет (Markets, 2024b). Овој растечки тренд на глобален пазар за микросфери го оправдува зголемениот истражувачки интерес за примена на микрочестичките како напредни системи за носачи на лекови со контролирано ослободување.

¹ Комерцијализираните препарати се дадени со следниов облик на податоци „продажно име (генеричко име, производител, технолошка постапка на добивање)“

Од друга страна, сè уште лидери на пазарот се цврстите дозирани форми, со неодамнешна финансиска проценка во висина од 957.55 милијарди долари за период од 2021 до 2027 година (Maximize Market Research, 2021). Согласно класификацијата на фармацевтски дозирани форми во фармакопејата на САД (USP-NF , Pharmaceutical Dosage form, 2022) во цврсти фармацевтски дозирани форми се вбројуваат и гранули. Земајќи ја предвид општата дефиниција за гранули (British Pharmacopoeia, 2022) „препарати, кои се сочинети од цврсти, суви агрегати на прашкасти честички доволно робустни да издржат ракување“, можеме да ги разгледуваме микрочестичките како гранули во рамки на фармакопејата. Суштинските разлики помеѓу микрочестички и другите гранули се: распределбата на големина на микрочестички (опсег од 1 μm до 1000 μm) и технолошката постапка за производство. Оттука, тие може да бидат инкорпорирани во различни фармацевтски дозирани форми (цврсти дозирани форми: капсули, таблети или кесички-прашоци за растворање; полуцврсти дозирани форми: гелови, креми, масти или пасти; течни дозирани форми: раствори, суспензии и парентерални инјекции), кои се усвоени како официјални термини во Ph.Eur. 10. и USP-NF 43. издание.

Комерцијализацијата на микросфери сугерира дека определени технолошки постапки за микроенкапсулација успешно се трансферирани во индустриски услови. Овој аспект е предизвик, кој директно е поврзан со искористеноста на ресурси (енергетски, достапна опрема, човекова сила и материјални биланси), од кои е пресудна изводливоста на процесот на зголемување. Во таа насока, зголемените производствените процеси треба да се: безбедни, ефикасни, добро-контролирани, репродуктивни, економични и робустни. Оттука, економската исплатливост на овие комплексни процеси е предмет на дискусија, поради бројните технолошко-инженерски предизвици за процесот на зголемување од лабораториско на индустриско ниво. Сепак, микроенкапсулацијата како специјализиран процес (EMA, 2014) се одликува и со предизвици од фармацевтски аспект. Во Водичот за валидација на процес за готови производи EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev1, Corr.1 (EMA, 2016) не се дадени насоки за валидација на процеси кои се засноваат на микроенкапсулација. Од друга страна, Анекс II кон Водичот за валидација на процес – нестандардни процеси CPMP/QWP/2054/03 и EMEA/CVMP/395/03, појаснуваат дека микроенкапсулацијата се класифицира како специјализиран процес или комплексен процес, кој опфаќа критични чекори (EMA, 2014). Следствено, за фармацевтски процес со производствен чекор микроенкапсулација, потребно е да се направи валидација на процесот. Валидационата стратегија и студија треба да ги валидира и испита сите критични производствени чекори, критични процесни параметри и да воспостави робустен процес. Друг истражувачки идентификуван недостиг е ограничениот број на истражувани енкапсулирачки материјали. Најчесто се истражувани: PLA и PLGA (Mazzara, и др., 2018; Park & Kim, 2004), хитозан и смеса на хитозан со друг материјал (Aziz, Jai, Raslan, & Subuki, 2016; Batubara, Rahayu, Mohamad, & Prasetyaningtyas, 2012), натриум алгинат (Celep, Demirkaya, & Solak, 2022; Chaturvedi, и др., 2019; Faidi, и др., 2019) и други.

Во овој докторски труд беа истражувани микрочестички и микрокапсули добиени по пат на испарување на растворувач од емулзија и јонотропско гелирање, соодветно, со примена на пристапот *квалитет според дизајн* (QbD). Се применија три

алатки од QbD пристапот. Преку **РНА** се процени **ризик** за енкапсулираните биоактивни супстанции, процесите на микроенкапсулација и влијанието на ексципиенси врз CQA на микрочестички и микрокапсули; **дизајн на експеримент (DoE)** за евалуација на поврзаноста помеѓу зависни и независни променливи на истражуваниот систем. Оттука се идентификуваа CPP во корелација со CQA и **дизајни на одзивни површини (RSDs)** со што се направи оптимизација на процесот и се идентификуваа оптимални услови на добивање на микрочестички и микрокапсули. Системите на микрочестички и микрокапсули се добија со ацетаминофен и етерично масло од портокал и енкапсулирачки супстанции од категоријата на полисахаридни полимери (хидроксипропил целулоза и натриум алгинат, соодветно). За испитување и карактеризација на добиените микрочестички и микрокапсули се применија неколку аналитички методи засновани на: спектроскопија, микроскопија, ласерска дифракција, термоаналитичка постапка и гравиметрија.

*Теоретски дел и
литература*

1 ТЕОРЕТСКИ ДЕЛ И ЛИТЕРАТУРА

1.1 Микрочестички

Со поимот „микрочестичка“ најчесто се опишуваат сферични микрочестички, чиј дијаметар е мерлив на микрометарска скала, а најчесто е во опсег од 1 μm до 1000 μm . Микрочестичките, во поглед на дистрибуција на енкапсулирани супстанции, може да се поделат во две категории: микрокапсули и микросфери. Разликата помеѓу двата вида на микрочестички е прикажана илустративно на слика 1-1.



Слика 1-1. Видови на микрочестички (Coelho, et al., 2010)

Од графичката илустрација (слика 1-1.) може да се согледа дека под поимот „микрокапсула“ се подразбира микрочестичка, во чие јадро е енкапсулирана супстанца, а јадрото е обвиеено со енкапсулирачка компонента. Од слика 1-1., визуелно може да се согледа дека јадрото може да биде во различни агрегатни состојби (цврста, течна и гас). Јадрото на микрокапсулата, исто така, може да биде составено од еден, или повеќе домени на микро- или нанониво, графички претставено на трета и четврта илустрација, од лево кон десно. Како што домените и поддомените на енкапсулираната супстанца во микрокапсулите стануваат прогресивно помали, така микрокапсулите стануваат микрочестички. Поткатегијата „микросфери“ се микрочестички, кои се составени од хомогена смеса на енкапсулирана компонента и енкапсулирачки материјал, а морфолошки се сферични микрочестички (Birnbau & Brannon-Peppas, 2004). Иако значењето на поткатегиите на микрочестички се јасни, сепак во литературата и од страна на истражувачите, неретко термините се користат наизменично.

Најважна карактеристика на микрочестичките со енкапсулирано API е ослободување на лекот, што е определено од механизмот според кој се одвива масениот транспорт на лекот од микрочестичката кон надворешната средина (во симулирани *in vitro* или *in vivo* услови). Имено, изборот и составот на материјалите, кои се употребуваат за добивање на микрочестичките го определува времетраењето и механизмот на растворливост. Полимерите, кои често се користат за добивање на микрочестички се класифицираат во две големи групи:

- природни полимери, кои опфаќаат група на протеини (колаген, албумин, желатин) и полисахариди (хитозан, алгинат, декстран, целулози)
- синтетски полимери, кои се делат во две подгрупи:
 - биоразградливи (PLA, PCL, PGE, PAGA, PVA, PAA, PGA и други);
 - неразградливи (PMMA, PHEMA, PA, и други).

Во категоријата на природни полимери се вбројува и поткатегијата на модифицирани природни материјали (скроб, модифицирани деривати на целулоза, гуми, протеини, масти и восоци). Молекуларни структурни формули на природни полимери,

синтетски полимери и модифицирани природни полимери, кои често се користат за носачи на лек се прикажани на слика 1-2., 1-3. и 1-4., соодветно.

Име на полимер	Структура на полимер	Име на полимер	Структура на полимер
Алгинска киселина		Колаген	
Декстран		Целулоза	
		Хитозан	

Слика 1-2. Структурни формули на често користени природни полимери во микроенкапсулација за системи за носачи на лек

Име на полимер	Структура на полимер	Име на полимер	Структура на полимер
Поли(млечна киселина)		Поли(алкил цианоакрилати)	
Поли(етилен гликол)		Поли(ε-капролактон)	
Поли(метил метакрилат)		Поли(винил алкохол)	

Слика 1-3. Структурни формули на најчесто користени синтетски полимери во микроенкапсулација за системи за носачи на лек

Име на полимер	Структура на полимер
Етил целулоза	
Хидроксипропил метил целулоза	

Слика 1-4. Структурни формули на модификувани природни полимери во микроенкапсулација за системи за носачи на лек

Синтетските полимери во однос на природните полимери имаат неколку предности при добивање на системи за носачи на лек. Кај синтетските полимери може полесно да се контролира нивната структура, што овозможува да се синтетизираат материјали кои се произведени според барањата и соодветни за посакуваната биолошка примена (Kelner & Schacht, 2005). Освен контролирање на полимерната структура, може да се контролира и хемискиот состав за да се прилагодат својствата на крајниот материјал и ориентација на специфични функционални групи за да стапуваат во интеракција со API.

Потенцијалната примена на микрочестичките во фармацевтската индустрија се должи на неколку клучни перспективни аспекти: маскирање на вкус и мирис на API (пример, ибупрофен има вкус на жарење при инхалација, или вкусување); физичка заштита на API од услови на опкружување (хемиски фактори како: рН, влага и оксидација и физички фактори како: светлина и топлина); синтеза на медикаментозни препарати со одложено, модифицирано и целно дејство; подобрена проточност; намалување на иницијална висока концентрација на лек во крвна плазма и одложено испарување (Burgess & Hickey, 2007).

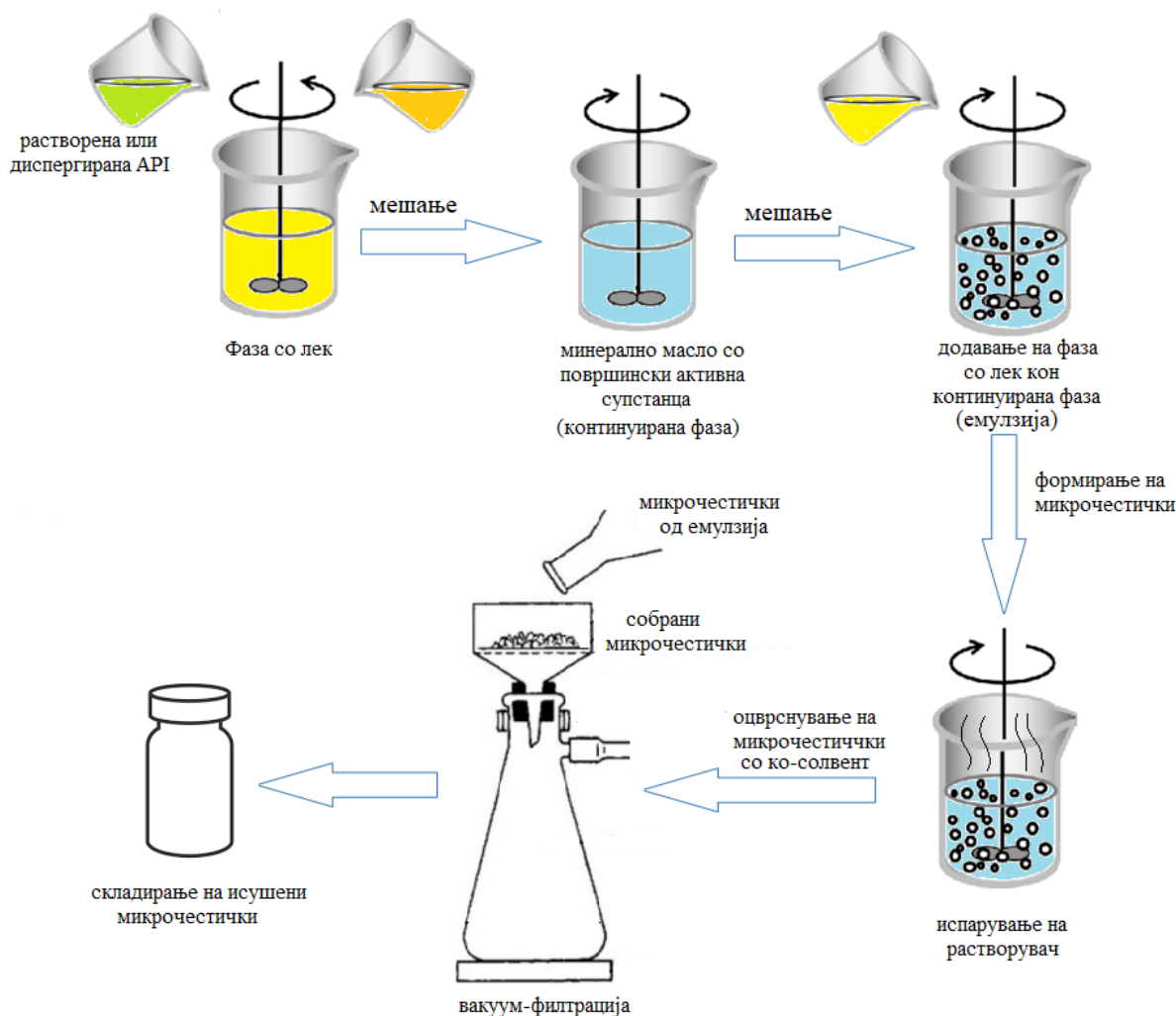
Микроенкапсулацијата се користи и како процес за енкапсулирање на биоактивни супстанции. Под поимот „биоактивни супстанции“ се подразбираат молекули, кои влијаат за подобрување на здравствената состојба во телото или можат да го променат метаболизмот (NCI, н.д.). Во овој докторски труд под терминот „биоактивни супстанции“ ќе се подразбираат заедно активни фармацевтски супстанции и етерични масла.

1.2 Постапки за микроенкапсулација

1.2.1 Постапка на испарување/екстракција на растворувач од емулзија

Постапката на испарување/екстракција на растворувач вклучува четири главни чекори: (1) растворање или диспергирање на API, најчесто, во органски растворувач во кој е растворен полимерот (фаза со лек); (2) емулгирање на фаза од чекор (1) во втора континуирана фаза, која не е мешлива со првата и формирање на полимерен слој околу честичките на API; (3) сепарационен процес „испарување на растворувач“ од дисперзната фаза така што капките се трансформираат во цврсти микросфери; (4) филтрирање, миење, собирање и сушење на микросферите. Графички, процесот на добивање на микросфери со постапка на испарување/екстракција на растворувач е прикажана на слика 1-5.

Постапката на испарување/екстракција на растворувач не се изведува при повисоки температури или пак со агенси за фазна сепарација, што ја прави погодна за термолабилни молекули. Со оваа постапка, во споредба со спреј-сушење, може да се произведат микрочестички со контролирана големина (Freitas, Hans, & Gander, 2005). Сепак, влезните суровини и условите за енкапсулација треба да се изберат внимателно за да се постигне висока ефикасност на енкапсулација, а низок удел на резидуален растворувач и добра екстракција на маслената фаза од површината на микрочестичките.



Слика 1-5 Шематски приказ на постапка на испарување на органски растворувач од емулзија

Изборот на соодветна постапка на испарување на растворувачот, примарно, зависи од хидрофилноста или хидрофобноста на лекот. За API, кои се нерастворливи или слабо-растворливи, најчесто се користи постапката масло-во-вода (o/w). Имено, оваа постапка е наједноставна, а сите останати постапки во категоријата на испарување на растворувач потекнуваат од нејзе. Во методот o/w, хидрофобен лек се раствора во растворувач во кој е додадена и матрицата. Сепак, оваа постапка не е соодветна за високо хидрофилни лекови, од две причини: (1) хидрофилниот лек може да не се раствори и (2) лекот може да дифундира во континуираната фаза за време на процесот на емулгирање, што е ризик за загуба на API, а оттука за ниска ефикасност на енкапсулација и ослободување на лекот. Подобен растворувач за техниката на микроенкапсулација со испарување на растворувач треба да ги задоволи следните барања: да го раствори избраниот полимер, да е слабо растворлив во континуираната фаза, да биде високо испарлив со ниска точка на вриење и да има што е можно пониска токсичност. Често користени растворувачи во литературата се: хлороформ (Maia, Santana, & Re, 2004), метилен хлорид (Berchane, Jebrail, Carson, Rice-Ficht, & Andrews, 2006), етил ацетат (Freitag, Dashevsky, Tillman, Hardee, & Bodmeier, 2000), етил формат (Sah, 2000) и ацетон (Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020).

Во континуираната фаза за формирање на стабилна емулзија се додава површински активна супстанца. Нејзината улога е да го намали површинскиот напон на континуираната фаза, коалесценција и агломерација на капките, и со тоа да овозможи стабилизација на емулзијата. Видот на површинско активна супстанца и нејзината концентрација се избира земајќи ја предвид поларноста на двете немешливи фази, посакуваната големина на микрочестички и нивната сферичност. Со соодветно избрана површинско активна супстанца треба да се добијат микросфери со правилна големина и тесна дистрибуција на големина на честички, што би овозможило предвидливо ослободување на лекот (Li, Rouaud, & Poncelet, 2008). Често употребувани површински активни супстанции се: span 80 (Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020; Patel & Patel, 2014), парцијално хидролизиран PVA (Hales, и др., 2017), Triton X-100 (Velmurugan, Ganeshan, Nishter, & Jonnalagadda, 2017) и Tween 80 (Rawat, Saraf, & Saraf, 2007).

Параметри и процесни параметри кои во литературата најчесто се менуваат за да се добијат микрочестички со посакувани својства се: вискозност на дисперзна фаза, волуменски удел на дисперзна фаза во континуирана фаза, количина на лек во дисперзна фаза, удел на сурфактант, брзина на мешање, температура и притисок (Li, Rouaud, & Poncelet, 2008). Зголемувањето на уделот на полимерот или неговата молекуларна маса во дисперзната фаза ја зголемува вискозноста на истата. Големината на микрочестичките се зголемува експоненцијално со зголемување на вискозноста. Повисока вискозност ја подобрува ефикасноста на енкапсулација на лек (Li, Rouaud, & Poncelet, 2008).

Постапката на испарување на растворувач не се преферира бидејќи API се губи за време на процесот на екстракција на растворувачот. Сепак, доколку уделот на полимер е висок, тогаш ефикасноста на енкапсулација ќе опаѓа. Образложение на овој феномен може да бидат следниве фактори: количината на API во растворувачот е ограничена и во тек на оцврстување на микрочестичките, количината на растворувач во дисперзната фаза се намалува така што API-то има тенденција да мигрира од дисперзната фаза (Li, Rouaud, & Poncelet, 2008). Последната причина се должи на емулгирање во водна фаза, а хидрофилните лекови, релативно брзо се делат од многу хидрофобен полимерен раствор во водна средина.

Откако API ќе се диспергира во полимерен раствор на органски испарлив растворувач, фазата се емулгира со површинско активна супстанца во немешлив диспергирачки медиум (вода или минерално масло). Испарувањето на органскиот испарлив растворувач се одвива најчесто како контролиран процес со менување на температура, притисок и механичко мешање. Брзината на испарување на органскиот растворувач од системот може да се забрза или со зголемување на температурата (Miyazaki, Onuki, Yakou, & Takayama, 2006) во континуираната фаза, или со редукција на притисокот (Chung, Huang, & Liu, 2001; Chung T.-W., Huang, Tsai, & Liu, 2002; Meng, Ma, Liu, Qiu, & Su, 2004). Сепак, процесот на испарување на растворувачот со примена на повисока температура резултира со намален принос и ефикасност на енкапсулација, поширока дистрибуција на големината на добиените честички и добивање на честички со неправилна морфологија (Freitas, Hans, & Gander, 2005).

Во истражувањето на Meng *et al.* (2004), времето на кристализација на микрочестичките било скратено од 240 минути на 40 минути со примена на намален

притисок (30 kPa). Редуцирањето на притисокот освен што резултирало со намалено време на кристализација, ефикасноста на енкапсулација се зголемила. Сепак, во литературата се достапни контрадикторни резултати. Ефикасноста на енкапсулација на лидокаин (Chung, Huang, & Liu, 2001) или албумин (Chung T.-W. , Huang, Tsai, & Liu, 2002) во PLA микросфери се намалувала во процес со намален притисок. Според авторите, овие разлики во добиените резултати се должат на различните методи за формирање на капки и нивната големина. Влијанието на редуциран притисок врз големината на микрочестичките не е јасно, поради недостаток на доволно податоци. Во литературата не се достапни насоки и јасни примери како да се избере оптимален притисок и температура за успешно и брзо производство на микрочестички. Сепак, вредностите за притисок и температура може првично да се проценат преку равенката на Clausius-Clapeyron (1):

$$P_{\text{vap}} = e^{\frac{-H_{\text{vap}}}{RT}} \quad (1)$$

кадешто H_{vap} е енталпија на испарување [Jmol^{-1}], T е температура [K], R е универзална гасна константа [$8,3145 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$] и P_{vap} е притисок на гасна фаза.

Процесот на мешање е најважниот параметар за контролирање на големината на микросферите, веднаш по физичко-хемиските карактеристики на појдовните материјали. Други инженерски аспекти кои имаат влијание врз големината на микросферите се: геометрија на реактор, соодносот помеѓу дијаметарот на импелерот и реакторот и број на импелери и нивната поставеност во системот (Маа & Hsu, 1996).

Постојат голем број на корелации кои ја предвидуваат големината и дистрибуцијата на големина на капки во емулзија со две немешливи течности (Kumar, Kumar, & Gandhi, 1993; Маа & Hsu, 1996). Корелациите земаат предвид два аспекти: физички аспекти на материјалите како густина на континуирана фаза и интерповршински напон и фактори поврзани со процес на мешање. Наједноставната и неретко користена корелација се темели на теоријата на Kolmogoroff и е претставена со равенка (2):

$$\frac{d_{\text{max}}}{D} = c_1 \left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5} \quad (2)$$

кадешто d_{max} е најголемата капка што може да опстане под турбулентен режим [m], D е дијаметар на мешалка [m], ρ_c е густината на континуирана фаза [kgm^{-3}], N е брзина на мешање [grms^{-1}], σ е интерповршински напон помеѓу дисперзна фаза и континуирана фаза [Nm^{-1}] и c_1 е константа.

Просечната големина, како што е дијаметарот на Sauter (d_{32}) може да се процени бидејќи е пропорционален со максималниот дијаметар на капка d_{max} (Hinze, 1955).

$$d_{32} = c_2 d_{\text{max}} \quad (3)$$

Од равенките (2) и (3) јасно е дека со зголемување на брзината се намалува просечната големина на микросферите, што е потврдено и низ различни истражувања (Yang, Chung, & Ng, 2001; Mateovic, Kriznar, Bogataj, & Mrhar, 2002).

По испарување, микрочестичките се сепарираат со процес на филтрација или центрифугирање. Предноста на оваа постапка е што е едноставна, флексибилна и лесна за процес на зголемување во индустриски големини, во споредба со постапките на фазна сепарација или коацервација. Исто така е возможно да се користат намалени количини на растворувач. Микроенкапсулација на хидрофилни API треба да се одвива во поларна диспергирачка фаза, како што е минерално масло. Определени истражувања покажале дека за растворувач со диелектрична константа ≥ 10 , како што се ацетон или метанол, тогаш како соодветен медиум за диспергирање се смета дека е течен парафин (Goto, Kawata, Nakamura, Maekawa, & Aoyama, 1986; Bogataj, Mrhar, Kristl, & Kozjek, 1991; Thies, 1992). Најчесто користен систем е ацетон/парафин. Сепак, компонентите се раствораат претходно во смеса на ацетонитрил/дихлорметан (Jelvehari, Dastmalch, & Nazila, 2012), вода, чист ацетон (Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020) или смеса на метанол и етанол (Jelvehari, Barar, Valizadeh, Shadrou, & Nokhodchi, 2011).

Во процесот на микроенкапсулација, биоактивните супстанции може да се инкорпорираат со неколку постапки, земајќи предвид дека фазата со лек може да биде раствор, дисперзија, суспензија или емулзија (Jelvehari & Montazam, 2012). Следствено со дисперзен метод се формира цврста дисперзија на фино-ситна API, со метод на ко-растворање се раствора API со ко-растворувач во раствор со полимерна матрица или се емулгира воден раствор во полимерниот раствор, пред да се емулгира во надворешната водена фаза (Hermann & Bodmeier, 1998). Инкорпорирањето на биоактивни супстанции во раствор на полимер (матрица) може да се постигне со различни технолошки операции: ултрасонификација (Hales, et al., 2017), микрофлуидизација (Maa & Hsu, 1999), статичко мешање со импелер (Jelvehari & Montazam, 2012), или мешање со хомогенизатор. Најчесто користена постапка е статичко мешање со импелер или магнет.

1.2.2 Метод на јонотропско гелирање

Јонотропското гелирање (графички прикажан на слика 1-б.) е феномен со кој се искористува способноста на полиелектролитите (пр. полисахариди) да реагираат со спротивно-наелектризирани молекули (пр. катјони) и да се одвива сол-гел транзиција, што резултира со формирање на структурирани физички материјали (филм, хидрогел, микрокапсули или наночестички). Позитивно наелектризираните полимерни вериги реагираат со негативно наелектризираните двовалентни или повеќевалентни јони. Електростатската реакција доведува до формирање на микрочестички со меѓусебно поврзани микро- или наномрежи. Структурата може да се постигне со примена на три различни методи: внатрешно, надворешно или инверзно гелирање (Augierma, et al., 2020). Како резултат на хемиската реакција може да се формира полуцврста структура на гел, којашто ќе има оптимални физичко-хемиски и фармаколошки карактеристики (Agnello, Palumbo, Pitarresi, Fiorica, & Giammona, 2018; Kulkarni, Nagathan, Biradar, & Naikawadi, 2013).

Во последниот период се бележи растечки интерес за хидрогелови добиени од полисахариди за енкапсулација на API. Оваа технолошка постапка овозможува висока ефикасност на енкапсулација на лек, доближувајќи се до 100 %, кога интеракциите помеѓу полимерот и лекот се оптимални (Hoo, Starostin, Paul, & Mecartney, 2008).

Технолошката постапка е економски прифатлива бидејќи не се потребни скапи реагенси или опрема за изведување и процесот е краткотраен. Сепак, добиените микрочестички се одликуваат со повисок индекс на полидисперзност. Вредностите се движат помеѓу 0,1 и 0,5 (Cánepa, et al., 2017; Masarudin, Cutts, Evison, Phillips, & Pigram, 2015). Хетерогеноста во големината на микрочестичките може да влијае на заробенитот лек, но може и да ги ограничи интеракциите помеѓу формулацијата и биолошките структури. Во литературниот преглед се утврди дека има ограничен број на истражувани полимери. Од технолошки аспект, предизвици се капењето на растворите во растворот за вмрежување при постојана брзина и можноста за контролирано мешање (Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020).

Неколку техники може да се применат за формирање на хидрогелови, кои имено се темелат на формирање на сферични или овални капсули составени од API и полимерни ексципиенси. Критични параметри со кои се определува големината и формата на капките се: вискозноста на иницијалната смеса, површинскиот напон, динамичките интеракции помеѓу капките и матрицата (ламинарен или турбулентен проток), како и концентрацијата на полимерот и неговата молекуларна маса (Gadzinski, et al., 2023).

Најчесто користен метод за јонотропско гелирање е надворешниот метод, кој е познат како контролирана дифузија. Растворот на полисахаридот се екструдира капка-по-капка во растворот за вмрежување. Матрицата се оформува со дифузија на средството за вмрежување од надворешната континуирана фаза кон внатрешната структура на полимерните капки. Во надворешниот оформен слој на хидрогелната капсула, процесот на сол-гел транзиција е многу брз, така што веднаш се формира гелна структура. Во следните чекори, спротивно-наелектризирани јони започнуваат да навлегуваат низ следните слоеви кон средината на честичката, формирајќи хетероген гелен профил. Во него, интеракциите помеѓу јоните и полимерните функционални групи се максимални на површината и воопшто не се присутни во средината (Pavelková, et al., 2017; Zhang, et al., 2006; Mikkelsen & Elgsaeter, 1995). Внатрешното гелирање е познато и како *in situ* гелирање. Во оваа постапка, нерастворлива сол на калциум (пр. CaCO_3 ; CaSO_4) се меша со полимерен раствор, а добиената смеса се екструдира во бања со киселина за вмрежување. Изменетите услови овозможуваат дисоцијација на калциумовата сол, а со тоа и формирање на гелна мрежа на полисахаридот. На овој начин, механизмот за гелирање е контролиран, а полимерот е униформно изложен на катјони, така што се формира униформна мрежа. Негативна страна на оваа постапка е тоа што се добиваат матрици со ниска густина и поголеми честички, поради што се повеќе пермеабилни, во споредба со надворешно гелирање. Ова резултира со ниска ефикасност на енкапсулација и побрз профил на ослободување на енкапсулираната супстанца. Според одредени истражувања се покажало дека иако киселината во бањата за гелирање ја подобрува растворливоста на калциумовите соли, таа стапува во интеракција и со полимерот. Овој технолошки предизвик може да се надмине со промена на рН-средината во гелирачкиот медиум и количината на Ca^{2+} во улога на донор (Pawar & Edgar, 2012; Mahmoud, El-Rasoul, Auda, & Ibrahim, 2013). На слика 1-6. е даден шематски приказ на надворешен и инверзен метод на јонотропско гелирање.

Друг пристап е инверзно гелирање (слика 1-6.), што се темели на додавање капка-по-капка на средството за вмрежување кон полимерниот раствор. Таков пристап,

најчесто, се користи во случај кај емулзии за подготовка на микрокапсули со заробено масло и полимер со мека обвивка. Физичко-хемиските својства на добиените микрокапсули се разликуваат и зависат од типот на емулзија од која се добиени (w/o или o/w) (Abang, Chan, & Poncelet, 2012; Martins, Renard, Poncelet, Davy, & Marquis, 2015).



Слика 1-6 Шематски приказ за добивање на нано- и микрочестички со јонотропско гелирање (Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020)

Основната постапка на јонотропско гелирање низ различни истражувања е модификувана со примена на: полиелектролитна комплексирачка техника (Patil, Kamalapur, Marapur, & Kadam, 2010), високо-напонско електростатско поле (Ma & Liu, 2010), внатрешно-емулзионо-јонотропско гелирање (Poncelet, Babak, Dulieu, & Picot, 1999; Sullad, Manjeshwar, & Aminabhavi, 2011), јонотропско гелирање пропратено со коацервација (Han, Guenier, & Salmier, 2008), хибридни гелсфери алгинат-PEG (Mahou & Wandrey, 2010), повеќекомпонентни полиелектролитни гелсфери (Pillay & Danckwerts, 2002) и јонотропско гелирање проследено со компресија (Choonara, Pillay, Khan, Singh, & du Toit, 2009).

Во основната постапка на јонотропско гелирање, фактори кои влијаат врз технолошкиот процес се: концентрација на полимер и средство за вмрежување, температура, рН на раствор за вмрежување, концентрација на API, концентрација на агенси за формирање гас и време на вмрежување.

Изборот на моновалентни, двовалентни или тровалентни катјони, како и нивната концентрација во улога на соодветен агенс за вмрежување влијае врз: брзината на гелирање (Bera, Mothe, Maiti, & Vanga, 2018), степенот на дериватизација (Agnello, Palumbo, Pitarresi, Fiorica, & Giammona, 2018), ефикасноста на енкапсулација на лекот (Singh & Kim, 2005), енкапсулирање на лек (Babu, Sathigari, Kumar, & Pandit, 2010), сферична морфологија (Boni, Prezotti, & Cury, 2016), мукоадхезивните својства (Narkar, Sher, & Pawar, 2010) и способноста за бабрење во водни средини (Adrover, et al., 2019). Изборот на јони не само што влијае врз брзината на гелирање, туку и на стабилноста на

самите микрокапсули, што е потврдено во истражувањето на Kulkarni *et al.* (2011). Со употреба на калциумови јони, споредбено со моновалентни натриумови јони се добил повисок процент на сферични честички, а јонската концентрација на растворот за вмрежување била иста (Vilela, Perrechil, Picone, Sato, & Cunha, 2015).

За енкапсулирање на етерично масло од цимет, каранфилче и мајчина душица, авторот Soliman и соработниците (2013) менувале три променливи: концентрација на полимер (натриум алгинат), концентрација на средство за вмрежување и време на вмрежување. Микрокапсулите ги добиле со постапка на емулгирање/екструзија и надворешно јонотропско гелирање. Во истражувањето на Norpakundilograt, Piboon, Graisuwan, Nuisin, & Kiatkamjornwong (2015) се евалуирало влијанието на различни концентрации на натриум алгинат, времето на вмрежување, концентрацијата на етерично масло од еукалиптус и концентрацијата на средството за вмрежување. За добивање на микрочестичките во нивната студија ја искористиле постапката на емулгирање o/w и вмрежување (јонотропско гелирање) со CaCl₂. Во трудот на Faidi *et al.* (2019) опишана е изменета постапка на *in situ* јонотропско гелирање со адсорпција на етерично масло од каранфилче на аморфен преципитиран SiO₂. Во нивното истражување не се менувани независните променливи на повеќе нивоа. Авторите Elkady, Tadros, & El-laithy (2020) примениле QbD пристап за добивање на микрочестички со јонотропско гелирање на риседронат натриум хеми-пентахидрат. Со Плакет-Бурман дизајнот го истражиле влијанието на следниве пет независни променливи: концентрација на површинско активна супстанца, брзина, времетраење и температура на хомогенизација и сооднос на API:полимер, врз две зависни променливи: ефикасност на енкапсулација и распределба на големина на честички.

Литературниот преглед покажа отсуство на истражување со примена на принципите на *квалитет според дизајн* пристап и испитување на меѓусебна поврзаност на повеќе независни променливи за енкапсулација на етерично масло. Влијанието на брзина на мешање во средството за вмрежување врз процесот на микроенкапсулација не е истражувано, односно променливата е константа низ истражувањата.

1.3 Енкапсулирачки и енкапсулирани супстанции

Анализата на објавени истражувања покажа дека авторите користеле различни полимери во улога на енкапсулирачки материјал. Биоразградливоста или биокомпатибилноста е многу важно својство за полимерите кои се употребуваат во фармацевтската индустрија. Под поимот „биоразградливост“ се подразбира дека компонентите ќе деградираат во безбедни компоненти кои или ќе бидат метаболизирани и исфрлени од организмот. Од друга страна под „биокомпатибилност“ се подразбира дека компонентата треба да биде физиолошки компатибилна и не би требало да предизвикува несакани дејства локално или системски по нејзината администрација (Li, Rouaud, & Poncellet, 2008).

Полимерите и кополимерите на млечна и гликолни киселини се најчесто користени за да се развие систем за носач на лек, бидејќи се оценети како безбедни и одобрени од страна на FDA за хумана употреба (Chulia, Deleuil, & Pourcelot, 1994).

Најчесто полимерите PLA и PLGA се употребувани за добивање на микросфери со намена за инјекции со долготрајно ослободување, поради долгогодишната историја за нивна безбедност (Gómez-Gaete, и др., 2017; Novindri, и др., 2016; Qi, и др., 2014). Успешноста на микросфери на основа на PLGA/PLA во улога на носење на протеини и пептиди може да се согледа и во пласираните производи на пазарот (Zhang, и др., 2020; FDA, 2023). Бионеразградливите полимери со добра биокомпатибилност се користени како носачи на лек. Во оваа категорија се вбројуваат ЕС (разградлива, но бионеразградлива) и PMMA (биокомпатибилен, но неразградлив полимер). ЕС може да се администрира орално за да се заштити лекот во гастро-интестинален тракт (Fatome, Courteille, Laval, & Roman, 1987), или да се администрира интрадуоденомски за одложена интестинална апсорпција (Takishima, Onishi, & Machida, 2002). Микросферите од PMMA се широко искористени како цементен материјал за коски за ослободување на антибиотици за коскена инфекција (Stallmann *et al.*, 2006) и тумори на коски (Mestiri, Puisieux, & Benoit, 1993). Од спроведениот литературен преглед може да се заклучи дека енкапсулирачките материјали се избираат во директна корелација со истражуваниот технолошки процес.

Табела 1.1. Микрочестични системи и постапки на микроенкапсулација

Биоактивна компонента	Полимер	Постапка	Референца
Natrexone	PLA	Двојна емулзија	(Sheikhoulou, и др., 2023)
Leuprolide acetate	PLGA/PLA	Емулгирање /испарување на органски растворувач	(Zhang, et al., 2020)
Lanreotide acetate	PLGA	Спреј-сушење	(Zhang, et al., 2020)
Exenatide	PLGA/сукроза	Коацервација	(Zhang, et al., 2020)
Pasireotide pamoate	PLGA	Емулзија/ испарување на органски растворувач	(Zhang, et al., 2020)
Cisplatin	PLGA	Емулгирање (o/w) /испарување на органски растворувач	(Garcia-Contreras, Abu-Izza, & Lu, 1997)
Lidocaine	PDLLA PLLA	Емулгирање (o/w) /испарување на органски растворувач	(Chung, Huang, & Liu, 2001)
Amoxicillin trihydrate	HPMC, HEC и HPMC	Емулзија/ испарување на органски растворувач	(Prasad, Patel, & Gothoskar, 2018)
Captopril	Eudragit® E100	Емулгирање/ испарување на органски растворувач	(Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020)
Hydrochlorothiazide	ЕС	Емулгирање/ испарување на органски растворувач	(Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020)
Nicorandil	Хитозан	Вмрежување во емулзија	(Patel & Patel, 2014)
Полифеноли од <i>Thymus serpyllum L.</i> воден екстракт	Хитозан	Вмрежување во емулзија	(Trifković, и др., 2015)
Епохарапин sodium	Eudragit® FS 30D и Eudragit® RS-PO	w/o/w двојна емулзија/испарување на органски растворувач	(Hales, и др., 2017)

Табела 1.1. Микрочестични системи и постапки на микроенкапсулација (продолжува)

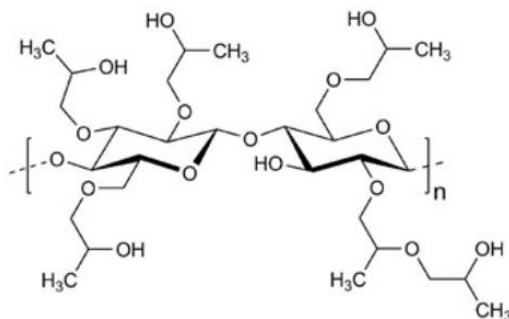
Биоактивна компонента	Полимер	Постапка	Референца
Говедски албумин серум (BSA)	PDLLA PDLLGA PDDLGA+PEG	w/o/w двојна емулзија/испарување на органски растворувач	(Yang, Chung, Bai, & Chan, 2000)
Етерично масло од сладок портокал	смеси од арапска гума, малтодекстрин и целулозни нановлакна	Спреј-сушење	(de Souza, и др., 2018)
Етерично масло од лаванда и портокал	Хитозан	Емулзиона полимеризација	(Velmurugan, Ganeshan, Nishter, & Jonnalagadda, 2017)
Етерично масло од: лаванда, каранфилче и мајчина душица	β -циклодекстрин хидрат	Емулгирање	(El-Molla & El-Ghorab, 2022)
Етерично масло од лимонска трева	Малтодекстрин	Сушење со замрзнување	(Wanderson da Silva, и др., 2021)
Маслиново масло	Изолат на соин протеин	Спреј-сушење со конвенционална емулзија	(Zhao & Tang, 2016)
Етерично масло од: каранфилче, цимет и мајчина душица	Натриум алгинат	Емулзија-екструзија	(Soliman E. , El-Moghazy, El-Din, & Massoud, 2013)
Етерично масло од каранфилче		Модифициран метод на емулзија	(Faidi, и др., 2019)
Етерично масло од еукалиптус		Јонотропска измена	(Noppakundilongrat , Piboon, Graisuwan, Nuisin, & Kiatkamjornwong, 2015)
Рибино масло	Желатина Хитозан + малтодекстрин	Спреј-сушење со конвенционална емулзија	(Pourashouri, Shabanpour, Razavi, Shabani, & Aubourg , 2014)

Од објавените истражувања може да се согледа дека микрочестичните системи може да се употребуваат за различни терапевтски индикации. Помеѓу нив се вбројуваат лекови за: третман на зависност од алкохол или опииди (naltrexone), анестетик (lidocaine), хемотерапевтик (cisplatin), антикоагуланс (enoxaparin sodium), антибиотици (amoxicillin trihydrate, ciprofloxacin), диуретик (hydrochlorothiazide), антихипертензив (captopril) и други категории на лекови. Од друга страна, истражувањата за енкапсулација на етерично масла, освен во прехранбената индустрија, се истражувани и поради нивните терапевтски својства. Етерично масло од каранфилче, цимет и мајчина душица се истражувани поради нивните антифунгални и антимикробни својства; лимонската трева поради нејзините антиоксидативни својства; етеричното масло од еукалиптус поради своите антибактериски својства и олеснување на респираторни симптоми. Истражувањата укажуваа дека микрочестичните форми може да се користат со различни терапевтски својства, потенцирајќи го нивниот потенцијал.

1.3.1 Физичко-хемиски својства на енкапсулирачки супстанции

Енкапсулирачкиот материјал се избира во корелација со технолошката постапка за микроенкапсулација. Во последната декада доминантно се преферираат биоразградливите полимери за развој на честички од нано- до микроголемина. Во нашето истражување се избраа два типа полимери од групата на полисахариди: хидроксипропил целулоза и натриум алгинат за микроенкапсулирање на ацетаминофен и естерино масло од портокал, соодветно.

Хидроксипропил целулозата е нејонски етер на целулоза. Овој дериват на целулоза се добива со реакција на алкална целулоза со пропилен оксид на зголемен притисок и повисока температура (Ashland, 2017). Пропилен оксидот може да биде супституиран во целулозата преку етерска врска на трите реактивни хидроксилни групи, што се присутни на секоја анхидроглукозна мономерна единица на целулозната верига формирајќи функционални групи $-OCH_2CH(OH)CH_3$. Според Ph.Eur. 0337, НРС се дефинира како парцијална О-(2-хидроксипропилирана) целулоза со содржина 53,4 % до 80,5 % на хидроксипропил групи (сува материја). Поради високата хидроксипропилација (~70 %), НРС е повеќе пластичен и релативно хидрофобен во споредба со други водорастворливи целулозни етери. На слика 1-7. е прикажана хемиска структура на хидроксипропил целулоза. Таа е целосно растворлива во вода и поларни органски растворувачи како метанол, етанол, изопропил алкохол и ацетон. Од друга страна, растворливоста на НРС во вода е температурно-зависна, односно е растворлива под „cloud-point“² (околу 45 °C).



Слика 1-7 Хемиска структурна формула на НРС (DS=2,5)

НРС е комерцијално достапна со различни квалитети на вискозност со просечна молекуларна маса во опсег од 20 kDa до 1500 kDa. Во фармацевтска индустрија, НРС најчесто се користи во следниве фармацевтско-технолошки операции: влажна гранулација (средство за врзување), филм-обложување, контролирано-ослободување на лек (полимерна матрица со повисоки вредности на молекуларна маса) и екструзија од растоп. Направени се обиди за истражување на подобноста на НРС во микроенкапсулација, но истражувани се полимерни смеси. Поради тоа, во нашето истражување се избра самостојна употреба на НРС во микроенкапсулација.

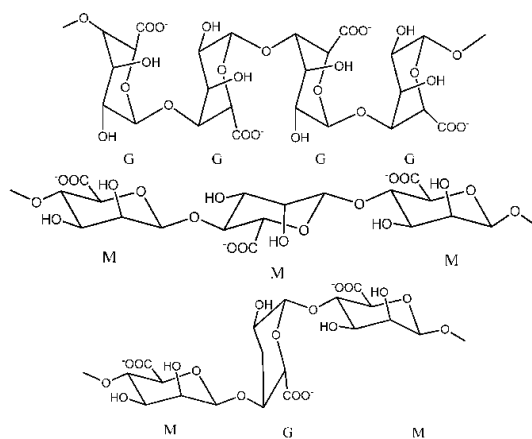
² Температура под која полимерот почнува фазно да се сепарира, односно се формираат две фази и станува заматен (опалесцентен)

Во Ph.Eur. 0337 се предвидени неколку функционални карактеристики за НРС во улога на матрица за таблети со продолжено ослободување: вискозност, степен на супституција, распределба на големина на честички и брзина на проток на прашок.

Натриум алгинат е еден од почесто истражуваните полимерни матрици како носач на биоактивни компоненти. Алгинатот е интересен избор за носач на етерично масло поради неговиот капацитет за гелирање, биокомпатибилност и ниска токсичност. Достапни се бројни истражувања за искористување на алгинатот и неговите својства, а и полимерот е лесно достапен со прифатлива цена (Lee & Mooney, 2012).

Натриум алгинатот е природен полисахарид, полианјонски кополимер, кој структурно е натриумова сол на алгинска киселина. Киселината е изградена од неколку сукцесивни групи на две уронски киселини: β -D-мануронска киселина (M) и α -L-глукокоронска киселина (G), кои се линеарно поврзани едни со други преку 1-4 гликозидни врски (Goh, Heng, & Chan, 2012; Sellime, et al., 2015; Sachen, Pushkar, Jha, & Bhattacharya, 2009; Ph.Eur. 0625, 2017). Полисахаридот не е растворлив во алкохол, хидроалкохолни раствори со удел на алкохол над 30 %, хлороформ и етер (Sachen, Pushkar, Jha, & Bhattacharya, 2009). Определени студии покажале дека растворливоста му е зависна од: рН на средината, молекуларна маса, јонска концентрација на соли во медиумот и природата на јоните присутни во структурата (Batista, de Moraes, Pintado, & de Moraes, 2019). Од друга страна, калциум алгинат не е растворлив во вода и органски растворувачи, но е растворлив во натриум цитрат (Chaturvedi, и др., 2019).

На слика 1-8. е прикажана хемиска структурна формула на натриум алгинат.

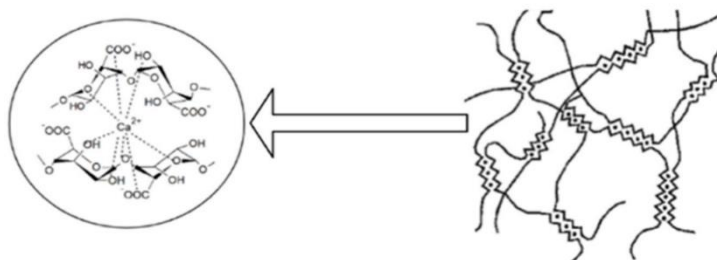


Слика 1-8. Хемиска структурна формула на натриум алгинат

Присуството јони на Na^+ лесно може да се заменат со двоваленти јони од средството за вмрежување (пр. Ca^{2+}) со што се формираат гелни структури. Физичко-хемиските својства на натриум алгинат зависат од неколку фактори: состав и распределба на двете групи на уронска киселина во структурата, молекуларната маса на полимерот, типот на функционални групи во структурата и ретикуларниот агенс (Simó, Fernández-Fernández, Vila-Crespo, Ruipérez, & Rodríguez-Nogales, 2017; Goh, Heng, & Chan, 2012). Комерцијално достапниот натриум алгинат има вредности за молекуларна маса во ранг од 32 000 Da до 400 000 Da и индекс на полидисперзност 1,5-3 (Mw/Mn).

Алгинатите преку јонска ретикулација со поливалентни катјони може да оформат три-димензионални гелови, кои имаат крута, ориентирана и цврста структура. Авторот

Agulhon, P. (2012) покажал дека ретикулацијата, која е формирана од алгинати и катјони на земноалкални метали е од електростатска природа, а од алгинат и катјони од преодни метали е ковалентна. Ова се должи на интеракцијата помеѓу слободни карбоксилни или хидроксилни групи на G-фракциите во алгинатската структура со двовалентни/поливалентни катјони под контролирани температурни услови (Agüero, Zaldivar-Silva, Peña, & Dias, 2017; Agulhon, Markova, Robitzer, Quignard, & Mineva, 2012). Афинитетот на поливалентни јони кон алгинат е различен и го следи следниов редослед: тровалентни катјони $> \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. Имено, Ca^{2+} јоните се преферираат за развој на микрочестичките, иако ја немаат највисоката моќ за интеракција. Тие се најбезбедни за хумана употреба, а по пат на ретикулација оформуваат соодветна гелна мрежа на Ca-алгинат (Uyen, Hamid, Tram, & Ahmad, 2020; Agüero, Zaldivar-Silva, Peña, & Dias, 2017). Во литературата, гелирањето е познато и како „оформена egg-box“ мрежа, што се формира кога Ca^{2+} јоните ги заменуваат Na^+ јоните во алгинатската структура. Така настанува вмрежување при што поставеноста на две алгинатски молекули е антипаралелна (Bennacef, Desobry-Banon, Probst, & Desobry, 2021), како што е шематски прикажано на слика 1-9.

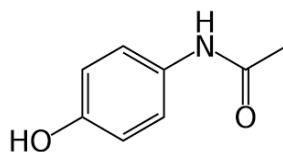


Слика 1-9. Формирање на тродимензионална мрежа на „egg-box“ мрежа со ретикулација на натриум алгинат со Ca^{2+} јони

1.3.2 Физичко-хемиски својства на енкапсулирани супстанции

За реализирање на поставените цели во овој докторски труд се избраа два модели на биоактивни компоненти една во цврста агрегатна состојба (ацетаминофен) и една во течна агрегатна состојба (етерично масло од портокал).

Ацетаминофен или парацетамол е еден од најчесто користените ОТС лекови со аналгетски и антипиретски својства (Bunchorntavakul & Reddy, 2013). Ацетаминофен може да се добие со редукција на *p*-нитрофенол со анхидрична оцетна киселина, ацетилација на *p*-аминофенол со анхидрид на оцетна киселина и кетен или од *p*-хидрокси ацетофенон хидразон (Willette, 2004). На слика 1-10. е прикажана хемиската структурна формула на ацетаминофен.



Слика 1-10. Хемиска структурна формула на ацетаминофен

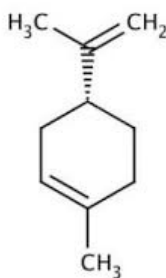
Тој е растворлив во 96 % етанол, многу малку растворлив во метилен хлорид и умерено растворлив во вода. Има температура на топење во ранг 168-172 °C и моларна маса 151,17 g mol⁻¹ (Ph.Eur. 0049, 2022).

Иако неговиот точен механизам на дејство е сè уште нејасен, историски е категоризиран во групата на NSAID бидејќи ги инхибира патиштата на циклооксигеназа (COX) (Ghanem , Pérez, Manautou, & Mottino, 2016). Одредени студии имаат покажано дека на ацетаминофенот му недостасуваат периферни анти-инфламаторни својства. Ацетаминофенот може да го инхибира COX патот во централниот нервен систем, но не и периферните ткива. Исто така, ацетаминофенот најверојатно не се врзува за активната страна на ензимите COX-1 и COX-2, туку ја намалува активноста на COX со различни механизми. Независно, редуцијата на активноста на COX патот се смета дека е преку инхибиција на синтеза на простагландите во централниот нервен систем, што доведува до аналгетски и антипиретски својства. Аналгетските својства може да се должат на стимулирачкото влијание на опаѓачките серотонергиски патишта во централниот нервен систем (Chandrasekharan, et al., 2002; Willette, 2004).

Користењето на дози на парацетамол над максималната дневна препорачана доза е поврзано и со откажување на црниот дроб, а понекогаш резултирало и со трансплатација на црн дроб или смрт кај пациентите (Chiew & Buckley , 2021). Механизмот на оштетување на црниот дроб е поради метаболитичките својства на ацетаминофенот (Wang, et al., 2017). Околу 60 % до 90 % од лекот метаболизира во црниот дроб во глукуронска киселина и сулфат-конјугирани метаболити.

Етеричното масло од портокал се добива без загревање преку соодветен механички третман од свежа кора на овошје од *Citrus x sinensis* (L.) Osbeck. Етеричното масло е транспарентно, светло жолто или портокалово, кое може да се замати при ладење. Се одликува со следниве физички својства: релативна густина (0,842-0,850), индекс на рефракција (1,470-1,476), оптичка ротација (од +9,4 ° до +9,9 °) и пероксидна вредност (max. 20) (Ph.Eur. 1811, 2022).

Етеричните масла се најважниот ароматски дел од растението и се составени од многу комплексна смеса на соединенија (терпени, алкохоли, кетони, феноли, киселини, алдехиди и естери). Монотерпените пинен, карвон, лимонен, линалол и мирцен се типични испарливи соединенија во портокалот. Земајќи ја предвид нивната хемиска структура, одредени соединенија имаат асиметрични јаглеродни атоми, така што покажуваат оптичка изомерија. D-лимонен е најчесто присутен јаглеводород во портокалот и цитрусите (>90 %). На слика 1-11. е прикажана неговата хемиска структурна формула.



Слика 1-11. Хемиска структурна формула на D-лимонен

Етеричното масло од портокал најчесто се користи во прехранбената индустрија и ароматерапијата. Во студии на клинички испитувања се покажало дека ароматерапијата може да се користи како комплементарна терапија кај пациенти со болки (Hekmatpou, Pourandish, Farahani, & Parvizrad, 2017).

1.4 Кинетички модели за ослободување на енкапсулирани супстанции

Ослободувањето на лек е многу важно својство на фармацевтската дозирана форма, што е предмет на истражување на биофармацијата и фармакокинетиката. Растворливоста на лекот е CQA, како предуслов за апсорпција на терапевтскиот агенс, што влијае врз брзината и времетраењето на биорасположливоста на лекот во човековиот организам. Најчесто, ослободувањето на лекот го следи кинетичкиот модел од нулти и прв ред. Од друга страна, системите со контролирано ослободување на лек им овозможуваат на фармацевтите и инженерите да работат во мултидисциплинарен тим за да дизајнираат систем за носач на лек со контролирано ослободување. Имено, за да се дизајнираат системи со претходно дефинирани профили на ослободување неопходно е точно да се знае механизмот на масен транспорт во процесот на ослободување на лек, а да се предвиди квантитативно кинетиката на ослободување на лекот. Во пракса може да се постигнат математички модели, кои ја опишуваат зависноста на ослободување на лекот во функција од време. Со помош на ваква развиена алатка може да се олесни предвидувањето на кинетика на ослободување, пред самите системи за носач на лек да бидат развиени.

Математички модели се важни за да се дизајнираат фармацевтски формулации, да се евалуираат процесите за ослободување на лек во *in vitro* и *in vivo* услови, но и да се развие оптимален дизајн за нови системи (Peppas & Narasimhan, 2014). Од математичките модели може да се стекнат сознанија за дадени физички одлики на истражуваниот систем, на пример коефициент на дифузија. Користењето на математички модели е од особено значење за да се разберат различни фактори, што влијаат врз брзината на растворливост и како може да влијаат врз ефикасноста или терапевтскиот режим на пациенти. Ослободувањето на лекот од дозирана форма со модификувано ослободување на лек може да биде контролирано од неколку механизми на масен транспорт: растворливост, дифузија, осмоза, бабрење и ерозија. Дифузијата на молекули на активна компонента е поврзана со структурата и морфологијата на полимерите (Langer & Peppas, 1983).

Клучни кинетички модели за евалуација на ослободениот лек се: кинетички модел од нулти и од прв ред, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg и Gompertz (Bruschi, 2015). Оттука, во оваа докторска дисертација за следење на кинетиката на ослободување на истражуваниите биоактивни компоненти од микрочестичките се избраа следниве кинетички модели: нулти ред, прв ред, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas и Weibull.

Кинетика по **нулти ред** го опишува ослободувањето на API од терапевтски систем при постојана брзина во определен временски период како функција од време.

Брзината на растворање на API од терапевтски систем во даден временски интервал во медиум за растворање може да се опише со равенка (4):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DS}{l} (C_s - C) \quad (4)$$

каде M [mg] е маса на растворена API за време t [min], dM/dt [mgmin⁻¹] е брзина на растворена маса, D [cm²s⁻¹] е коефициент на дифузија на растворена супстанца во раствор, S [cm²] е површина на која е изложен терапевтскиот систем, l [cm] е дебелина на дифузивен слој, C_s [mgmL⁻¹] е растворливост на цврста супстанца, и C [mgmL⁻¹] е концентрација на цврста супстанца во раствор при време t .

При растворање на активни супстанции од дозирани форми, кои ограничено се распаѓаат, односно, од аспект на феномени на пренос, нема промени во условите на рамнотежа, тогаш равенката (4) може да го преземе обликот на равенка (5):

$$f_i = K_0 t \quad (5)$$

каде f_i е удел на активна супстанца растворена за време t и K_0 е константа на вистинска вискозност во тек на растворливост. Од графички приказ на равенка (2), коефициентот на аголот соодветствува на K_0 . Ослободувањето на API, што го следи кинетичкиот модел од нулти ред е со константна брзина на ослободување и е независно од концентрацијата на API. Постојаната брзина на ослободување на API се должи на формирањето на стационарен концентрациски градиент низ мембраната.

Кинетичкиот модел од **прв ред** ја опишува апсорпцијата, и/или елиминацијата на различни активни супстанции. Овој кинетички модел ги претставува промените на концентрацијата во однос на време. Според Noyes и Whitney (1897), феноменот на растворање на цврста честичка во течен флуид укажува на површинска активност, така што равенката за кинетички модел од прв ред според нив го има следниот облик:

$$\frac{dc}{dt} = K(C_s - C) \quad (6)$$

кадешто, C [mgmL⁻¹] е концентрација на растворена супстанца во време t [min], C_s [mgmL⁻¹] е рамнотежна растворливост на работна процесна температура, а K е константа од прв-ред.

Равенката (6) може да се дополни со нова константа на пропорционалност – K_1 , а која врз основа на првиот Фиков закон може да укаже на правопрпорционална зависност со коефициентот на дифузија во медиумот за растворање и обратна пропорционална зависност од дебелината на дифузивен слој и волуменот на медиумот за растворање. Равенката (6), согласно предлог на Nixon-Crowell го преземала обликот (7):

$$\frac{dW}{dt} = KS(C_s - C) \quad (7)$$

каде, W [mg] е количина растворена API во време t [min], dW/dt [mgmin⁻¹] е сооднос на количина на растворена API која поминува во раствор во време t , S [cm²] е површина на растворливост, а K е константа на пропорционалност.

Со соодветни математички операции, подробно опишани во книгата *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (Bruschi, 2015), крајната равенка го добива обликот (8):

$$\log Q_1 = \log Q_0 + \frac{k_1 t}{2,303} \quad (8)$$

каде Q_1 [mg] е количина на ослободена API во време t [min], Q_0 [mg] е иницијална количина на ослободена API во време t и k_1 е константа од прв-ред.

Оваа равенка има линеарна функција, а графичкиот приказ на децимален логаритам на ослободена маса на лек е права со коефициент на агол $\frac{k_1}{2,303}$ и линеарен коефициент $\log Q_0$.

Трет кинетички модел е на **Higuchi**, кој ја опишува растворливоста на API од систем со матрикс. Од трите работни истражувања на Higuchi (1961; 1962; 1963) се поставиле основите за многу теоретски модели за да се опише ослободувањето на активни фармацевтски компоненти кои се или слабо-растворливи или многу-растворливи, а се инкорпорирани во цврсти и полуцврсти матрици (Higuchi T., 1961; Higuchi W., 1962; Higuchi T., 1963). Кинетичкиот модел на Higuchi е поврзан со честички на диспергирана API во хомогени матрици, кои се наоѓаат во медиум за растворање. За растворливост на компоненти со липофилна, хомогена и планарна матрица, првично, Higuchi ја предложил корелацијата со обликот на равенка (9):

$$f_1 = Q = \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (9)$$

кадешто Q [mg] е количина на ослободен лек во време t [min] на единица површина, C [mg] е иницијална количина на лек во дозирана форма, C_s [mgmL⁻¹] е растворливост на API во медиум за растворање, а D [cm²s⁻¹] е коефициент на дифузија во матриксот.

Во однос на хомогени и сферични; хетерогени и планарни; хетерогени и сферични системи, Higuchi предложил друг математички модел (10), што се темели на претпоставката дека нема важни промени во структурата на матрицата за време на контактот со вода. Моделот е применлив при ниски концентрации на API во матрицата, каде растворливоста и ослободувањето на лек се одвиваат преку порозната матрица:

$$f_1 = Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2C - \varepsilon C_s)C_s t} \quad (10)$$

кадешто Q [mg] е количина на ослободен лек во време t [min] на единица површина, ε е порозност на матрицата, τ е фактор на капиларна извитливост, C [mg] е иницијална количина на лек во дозирана форма, C_s [mgmL⁻¹] е растворливост на API во медиум за растворање, а D [cm²s⁻¹] е коефициент на дифузија во матриксот.

Сепак со математички операции, равенката (10) може да се поедностави во модел на Higuchi претставен со равенка (11), од која се утврдува дека количината на ослободен лек е пропорционална на квадратот од времето и е линеарна функција:

$$f_1 = Q = K_H \sqrt{t} \quad (11)$$

каде K_H е константа на ослободување според Higuchi.

За користење на моделот на Higuchi, треба да се следат неколку претпоставки (Siermann & Peppas, 2012; Park & Omidian, 2010): иницијалната концентрација на API во матрицата да е многу повисока отколку растворливоста на API; дифузијата е во една насока; висината на дозираната форма е многу поголема во однос на големината на API;

дифузивноста на API е константна, што е карактеристично за полимери, кои не бабрат значајно при контакт со вода (пр. етил целулоза) и се постигнати sink услови во медиумот за растворање и бабрење или растворливоста на матрицата се занемарливи.

Моделот на **Hixson-Crowell** се темели на наодот дека правилната површина на група честички е пропорционална на кубен корен од волуменот на честичките. Оваа зависност е претставена со равенката (12):

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_i} + K_{HC}t \quad (12)$$

каде што W_0 [mg] е почетна количина на API во систем, W_i [mg] е количина на API во систем во време t [min], а K_{HC} е константа на инкорпорација, што ги поврзува површината и волуменот.

Овој кинетички модел е применлив за дозирани форми како таблети, во кои растворливоста се одвива во рамнини паралелни со површината на дозираната форма. Површината од дозираната форма се намалува со тек на време, а геометрискиот облик останува константен. Во случај кога честичките се со неправилна морфологија, тогаш нивното однесување е различно, а равенка (12) го добива обликот на равенка (13):

$$\sqrt[3]{1 - f_i} = 1 - K_{\beta}t \quad (13)$$

Кадешто $f_i = 1 - (W_i/W_0)$ и го претставува уделот на растворена API за време t и K_{β} е константа на ослободување на API. Овој модел е применлив кога условите на рамнотежа не се менуваат, а површината на честичката се намалува пропорционално со тек на време. Кога овој модел е применлив, тогаш се претпоставува дека ослободувањето на лекот е ограничено со брзина на ослободување, а не преку дифузија, што е најкарактеристичен масен транспорт низ полимерна матрица.

Моделот на **Korsmeyer-Peppas (закон на моќ)** е сеопфатна равенка за да се опише ослободување на API од полимерни системи. Равенката (14) била развиена како семи-емпириски модел што воспоставува експоненцијална корелација помеѓу ослободувањето на API и времето (Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983; Ritger & Peppas, 1987):

$$f_1 = \frac{M_i}{M_{\infty}} = Kt^n \quad (14)$$

каде f_1 [mg] е количина на ослободен лек, M_{∞} [mg] е количина на API во рамнотежна состојба (понекогаш е многу блиска до количината на API содржана во дозирана форма на почетокот на процесот на ослободување), M_i [mg] е количина на ослободена API со тек на време t [min], K е константа на инкорпорирање на структурни промени и геометриски карактеристики на систем, а n е експонент на ослободување (корелира со механизам на ослободување на API) како функција од време t .

Овој математички модел бил развиен за ослободување на API од полимерна матрица, како што е хидрогел. Одредени модификации биле направени во основниот модел (14), така што тој може да се применува и за нагло ослободување на иницијална количина на API (анг. burst effect) (Kim & Fassih, 1997), претставено со равенка (15) и ослободување на API со латентно време (Kim & Fassih, 1997; Pillay & Fassih, 1999), кое го означува почетокот на ослободување на API од системот (16):

$$\frac{M_{(i-1)}}{M_{\infty}} = K(t - l)^n \quad (15)$$

каде M_{∞} [mg] е количина на API во рамнотежна состојба, M_i [mg] е количина на ослободена API во време t [min], K е константа на инкорпорирање на структурни промени и геометриски карактеристики на систем (константа на брзина на ослободување), n е експонент на ослободување (корелира со механизам на ослободување на API) како функција од време t и l е латентно време.

$$\frac{M_i}{M_{\infty}} = Kt^n + b \quad (16)$$

каде b е нагло ослободување на API (burst effect).

Моделот на моќ е корисна алатка за проучување на ослободување на API од полимерни системи, кога механизмот на ослободување не е познат или кога ослободувањето на API не е водено од еден масен феномен (Peppas & Narasimhan, 2014). Врз основа на вредноста на n експонентот, односно подобро прилагодување на профилот на ослободување на API во матрицот, може да се направи класификација во две групи, што директно зависи од набљудуваното однесување на системот:

- Фиков модел (случај I)
- Не-Фикови модели (случај II, супер случај II и аномален случај)

Во табела 1 се прикажани сумарно вредностите за експонентите за класификација на видот на модел. За да се определи вредноста на експонентот n , се препорачува да се користи дел од кривата на ослободена API до точка каде што $\frac{M_i}{M_{\infty}} < 0,60$.

Табела 1.2 Интерпретација на модели на ослободување на API од полимерни матрици со различна геометрија (Bruschi, 2015)

Модел на механизам на ослободување	Геометрија	Експонент на ослободување	Време во функција од n
Фикова дифузија	Планарна (тенок филм)	0,50	$t^{0,50}$
	Цилиндри	0,45	$t^{0,45}$
	Сфери	0,43	$t^{0,43}$
Аномален транспорт	Планарна (тенок филм)	$0,50 < n < 1,0$	$t^{0,50 < n < 1,0}$
	Цилиндри	$0,45 < n < 0,89$	$t^{0,45 < n < 0,89}$
	Сфери	$0,43 < n < 0,85$	$t^{0,43 < n < 0,85}$
Случај I на транспорт	Планарна (тенок филм)	1,0	t^a
	Цилиндри	0,89	$t^{0,89}$
	Сфери	0,85	$t^{0,85}$
Супер-случај II на транспорт	Планарна (тенок филм)	$n > 1$	$t^{n > 1}$
	Цилиндри	$n > 0,89$	$t^{n > 0,89}$
	Сфери	$n > 0,85$	$t^{n > 0,85}$

^a – нулти-ред на ослободување

Моделот на **Weibull** го опишува феноменот на ослободување на API и е придружен со конечно време. Се темели на функција, што е предложена од Weibull (1951) и Langenbucher (1972). Моделот на Weibull е прикажан со равенката (17) и е искажана во услови на удел на API (m) во раствор за време t :

$$m = 1 - \exp^{-(t-T_i)^{\frac{b}{a}}} \quad (17)$$

кадешто, параметарот на скала (a) ја дефинира временската скала на процесот, T_i [min] е локализирачки параметар, што го претставува латентното време на процесот на ослободување (најчесто е нула), а параметарот (b) на облик го карактеризира видот на крива: $b=1$ (експоненцијална), $b>1$ (сигмоидна, со влезна кривина ограничена со точка на флексија) и $b<1$ (параболична, прикажува висок почетен наклон и конзистентен експоненцијален карактер). Овој модел е корисен за споредување на профили на ослободување на API од матрици. Моделот нема кинетичка основа, односно е емпириски и дескриптивен модел, којшто не овозможува сознанија за интерференција помеѓу својствата за кинетиката на растворливост на API.

1.5 Пристап *квалитет според дизајн* и експериментален дизајн

Во последните години, интересот за концептот на QbD и негова примена во фармацевтската индустрија расте, бидејќи се смета како ветувачка алатка за да се разберат изворите на варијабилност во една формулација за готов производ и да се развие готов производ со подобрени својства користејќи ги техниките за проценка на ризик (Kan, Lu, Liu, Wang, & Zhao, 2014; Marto, et al., 2016; Shah, Khunt, Bhatt, Misra, & Padh, 2016). Влезните суровини во формулацијата на готовиот производ може да претставуваат извор на варијабилности во животниот-циклус на производот и неговото производство, ако не се контролирани (Korakianiti, 2009). Исходот од невостановена контрола врз процесот би резултирал со отстапување на готовиот производ од неговиот квалитет, што директно имплицира на можно непосакувано влијание врз безбедноста на пациентот и ефикасноста на самиот лек. Со имплементација на QbD концептот, се очекува позитивна промена во трошоците, контролиран процес и контрола врз варијабилностите, со што би се добивал готов производ со постојан квалитет и би се контролирал врз основа на контролната стратегија за животниот-циклус на лекот.

Концептот на QbD ги заменува конвенционалните емпириски пристапи во фармацевтски развој со пристап кој се заснова на евалуација на ризик. Со овој концепт се покриваат различни чекори: (1) дефинирање на профил на квалитет на целен производ (QTPP), (2) определување на критични атрибути на квалитет (CQA), (3) евалуација на ризик, (4) развој на експерименти со голем број на променливи користејќи дизајн на експеримент (DoE) со цел да се утврди корелација на CQA со CPP и да се утврди простор на дизајнот, (5) дизајнирање и имплементирање на контролна стратегија со цел да се осигура континуирана верификација за контрола на процесот и негово подобрување (Kan, Lu, Liu, Wang, & Zhao, 2014). Концептот на *квалитет според дизајн* и барањата од релевантните водичи се објаснети во следниве документи: ICH Q8 (R2) - Водич за фармацевтски развој (ICH Q8 (R2), 2009), ICH Q9 - Водич за управување со ризик во однос на квалитет, (ICH Q9, 2015), ICH Q10 - Водич за фармацевтски систем за квалитет (ICH Q10, 2008) и ICH Q11 - Водич за развој и производство на лековити супстанции (ICH Q11, 2011).

Профилот на квалитет на целен производ е првиот чекор во примена на QbD. Со него се воспоставуваат посакуваните својства и карактеристики на производот.

Поставувањето на QTPP ги опфаќа елементите: вид на фармацевтски дозирани форми, јачина, дизајн на фармацевтски дозирани форми, начин на администрација, фармакокинетика, критични атрибути на квалитет (идентификација на API, содржина на API во фармацевтски дозирани форми, растворливост, содржина на конзерванс, резидуални растворувачи, сродни супстанции, микробиолошки квалитет, униформност на дозирани единици, содржина на вода), стабилност, тип на примарно пакување, услови на складирање и прифатливост од пациент. Воспоставување на поврзаноста помеѓу CMA и CQA е од круцијално значење за формулацијата. Со разбирање на оваа корелација се овозможува да се препознае дали влијанието врз готовиот производ потекнува од квалитетот на суровините или пак од формулацијата. Идентификувањето на CMA може да ги опфати следните својства: морфологија и распределба на големина на честички, полиформизам, растворливост, хигроскопност, стабилност под влијание на надворешни услови (светлина, влага, температура и кислород), константа на дисоцијација, мембранска пермеабилност, вискозност и други функционални карактеристики, кои се опишани во соодветните монографии од Ph.Eur.

Процесните параметри во секоја од технолошките операции, од кои е сочинет фармацевтско-технолошкиот процес, се параметри, чија варијабилност може да има суштинско влијание врз CQA, а оттука и врз квалитетот, безбедноста и ефикасноста на производот. Евалуација на корелацијата помеѓу CPP и CQA опфаќа DoE со цел определување на дизајниран простор во кој ќе може да се варираат параметрите. Според ICH Q8 (R2) (2009), дизајнираниот простор е мултидимензионална комбинација и интеракција на атрибутите на материјалите и/или процесните параметри со кои се обезбедува квалитетот на готовиот производ. Дизајнираниот простор се добива со математичко моделирање со кое се воспоставуваат границите за производство на лек со дефинирани карактеристики за квалитет. Воспоставувањето на дизајнираниот простор може да биде на лабораториски проби, но и на индустриски развојни серии. Доколку дизајнираниот простор се воспостави на лабораториско ниво, тогаш е неопходно да се направи верификација на индустриско ниво. Врз основа на експерименталниот дизајн (DoE) се воспоставува дизајнираниот простор и корелациите на CMA, CPP и CQA. Експерименталниот дизајн овозможува да се генерира матрица на експерименти во најмал можен број. Фитувањето на добиените резултати се прави со соодветен математички модел за да се согледаат зависностите помеѓу влезните и излезните променливи. DoE за разлика од OFAT пристапот овозможува евалуација на повеќе фактори истовремено и анализа на влијанието помеѓу независните и зависните променливи. Во фармацевтската индустрија, DoE се употребува низ фармацевтскиот развој. Ова е посебно од бенефит за негенерички производи; во тек на оптимизација на формулација или процес на лабораториско или индустриско ниво; воспоставување на процес на индустриски големини.

Системите за носачи на лек во својата формулација имаат различни полимери, ексципиенси или пак неколку критични процесни параметри може да влијаат врз технолошкиот процес и перформансите на системите. Во таков случај, рационално е примена на математичко моделирање и креирање на дизајн на експеримент. Со DoE се овозможува оптимизација на процесот за добивање на микрочестички. Во литература се пријавени истражувања со примена на неколку методологии: факторски дизајн (Patel &

Patel, 2014), BBD (Prasad, Patel, & Gothoskar, 2018; Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020; Sutthapitaksakul, Thanawuth, Dass, & Sriamornsak, 2021), CCD (Hales, et al., 2017; Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020), D-оптимален дизајн (Palazzo, et al., 2013), Plackett-Burman (Li, et al., 2009; Deshmukh & Naik, 2016) и мешани дизајни.

Студијата за добивање на хитозански микросфери со никорандил е дизајнирана со 3^2 факторски дизајн. Во дизајнот се евалуирани два фактори (сооднос API:полимер и волумен на глутаралдехид) на три нивоа, а за зависни променливи се избрале: ефикасност на енкапсулација, ослободување на лек и распределба на големина на микрочестички (Patel & Patel, 2014). За анализа на одговорите, авторите Patel & Patel (2014) го употребиле статистичкиот модел опфаќајќи ги и интерактивните и полиномните членови. Во истражувањето на Hales *et al.* (2017) за добивање на микросфери со енокспарин натриум се употребил CCD со три фактори (концентрација на NaCl, сооднос на Eudragit[®] FS-30D/Eudragit[®] RS-PO и концентрација на PVA во надворешна фаза) и три нивоа за евалуација на влијанието на ризик-факторите врз микросферите со целно ослободување на лекот во дебело црево. Развој на моделите за предвидување се направил со регресиониот метод PLS.

BBD дизајнот е најчесто прифатен за оптимизација и формулациски развој на микросфери, бидејќи изведувањето на дизајнот и интерпретацијата на резултатите е полесна во однос на другите дизајни. Овој дизајн дозволува користење на три или повеќе компоненти проследени со оптимизација за да се добијат робустни формулации со посакувани карактеристики (Prasad, Patel, & Gothoskar, 2018). Микрочестички со хидрохлоротиазид, авторите Chikukwa, Walker, & Khamanga (2020) во својата студија ги добиле со примена на BBD, така што три фактори (концентрација на SSG, концентрација на Eudragit[®] E100 и брзина на хомогенизација) се истражувани на три нивоа. Вториот истражуван систем со каптоприл бил дизајниран со CCD со два фактори (концентрација на EC и брзина на хомогенизација). Фитувањето на моделите доминантно било со квадратен и 2FI модели, а анализата на влијанието на независните врз зависните фактори била направена со RSM. За добивање на мукоадхезивни микрокапсули со амоксицилин бил искористен, исто така, BBD со три фактори (концентрација на Eudragit[®] L100, EC, и HPMC) на две нивоа, додека за зависни променливи се избрале: ефикасност на енкапсулација, ослободување на лек и мукоадхезија (Prasad, Patel, & Gothoskar, 2018). Авторите Prasad, Patel, & Gothoskar (2018) со RSM го анализирале влијанието на факторите врз излезните одговори. Оптимизација на микрочестички со донепезил хидрохлорид за орално-дезинтегрирачки таблети била направена со BBD (Sutthapitaksakul, Thanawuth, Dass, & Sriamornsak, 2021). Експерименталниот дизајн вклучил три фактори (концентрација на полимер, време на мешање и волумен на надворешна водна фаза) на три нивоа во однос на три зависни променливи (големина на честички, просечно време на растворливост и CDSS во 5 минути). Микрокапсули со смеса на растителни етерични масла се добиени со оптимизација со BBD експериментален дизајн вклучувајќи четири фактори (pH-вредност, концентрација на CaCl₂, волумен на етерично масло и концентрација на хитозан) и три нивоа (Zhao, Gao, Jin, & Zhu, 2022). Фитувањето на податоците е направено со квадратен модел, додека за повеќекратна регресиона анализа на добиените податоци се применил методот на парцијални најмали квадрати.

Примената на Plackett-Burman дизајнот за добивање на микрочестички е поограничена, бидејќи со овој дизајн се прави скрининг и идентификација на независни променливи, кои имаат најизразено влијание врз формулацијата, а потоа истите се истражуваат подетално. Li и соработниците (2009) го примениле овој дизајн за добивање на микрочестички од скроб со w/w метод на емулгирање и вмрежување како носач на прехранбени биоактивни компоненти. Во студијата истражиле седум фактори на две нивоа, а заклучиле дека четири од нив имале значајно влијание врз големината на микрочестичките. Deshmukh и Naik (2016) исто така го примениле овој дизајн за евалуација на осум процесни и формулациски фактори, кои имаат најсуштинско влијание врз ефикасноста на енкапсулација. Анализата на дизајнот ја спровеле со RSM и статистички индикатори. Palazzo и соработниците (2013) примениле D-оптимален дизајн за развој на постапка на спреј-сушење за да добијат микрочестички со комплекс на офлоксацин-паладиум. Евалуирале пет независни променливи на две нивоа (високо и ниско) со три излезни одговори (содржина на лек, аеродинамичен дијаметар и дисперзност на дистрибуција на големина на честички), а фитувањето го направиле со општ квадратен полиномен модел. За оптимизација на условите на микроенкапсулација на етерично масло од цимет авторите Noghabi & Molaveisi (2019) го употребиле симплекс-центроидниот мешан дизајн со 16 точки. За зависни променливи биле избрани: ефикасноста на енкапсулација, ослободувањето на цинамалдехид, приносот на прашок и површината на цинамалдехид. За евалуација на повеќекратно-регресиони коефициенти искористиле кубни модели.

D-оптимален дизајн-матриците вообичаено не се ортогонални и влијанието на ефектот е корелиран. Овој тип на компјутерски-помогнати дизајни се практично корисни, во случај кога класичните дизајни (факториелни и фракциони) не се применливи. Критериумот за оптималност, којшто ќе се користи за генерирање на D-оптимални дизајни е детерминатата на матрицата за максимизирање $|X'X|$. Овој критериум резултира во минимизирање на генералната варијанса на параметарот за процесот, за претходно специфициран модел. Како резултат, оптималноста на даден D-оптимален дизајн е зависен модел. Односно, експериментот мора да специфицира модел за дизајнот, пред софтверот да генерира специфичен број на комбинации. Компјутерскиот алгоритам избира оптимален сет на број на дизајни за еден експеримент и специфичен модел. Најчесто избраниот оптимален сет е сочинет од сите можни комбинации од различни нивоа на фактори, кои се внесени како независни променливи. Софтверот генерира D-оптимален дизајн наместо стандарден класичен дизајн поради две клучни причини: 1) стандардните факториелни или фракциони дизајни бараат голем број на проби во однос на расположливите ресурси; 2) во процесниот простор има фактори кои не се изводливи, или се невозможни да се спроведат (NIST, н.д.; de Aguir, Bourguignon, Khots, Massart, & Phan-Thau-Luu, 1995).

За изведување на систематски оптимизации и дизајни на микрочестички, истражувачите најчесто ги користеле следниве два софтвери: Design-Expert (Stat-Ease Inc., MN) (Prasad, Patel, & Gothoskar, 2018; Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020; Sutthapitaksakul, Thanawuth, Dass, & Sriamornsak, 2021; Deshmukh & Naik, 2016; Palazzo, et al., 2013; Zhao, Gao, Jin, & Zhu, 2022) и Modde 10 (Umetrics, Sweden) (Hales, et al., 2017).

Последната фаза од фармацевтскиот развој со примена на QbD принципи е дефинирање на контролната стратегија. Таа ги вклучува: СМА на API и ексципиенси, односно спецификација на суровина, процесни контроли во тек на производство, следење на инструкции во мастер производствен протокол, хемиска анализа по спецификација за готов производ и фреквенција на следење (Pogány, 2008). Со следење на контролната стратегија во животниот-циклус на производот се очекува процесот за добивање на готов производ да биде во контрола, изворите на варијабилност да се идентификуваат полесно, да се намалат непланираните трошоци (пр. реанализи, одбиена индустриска серија), а оттука и да има позитивно влијание врз еколошкиот аспект за генерирање фармацевтски отпад.

Експериментален дел

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

2.1 Цел, предмет и хипотези на истражувањето

Земајќи ги предвид утврдените истражувачки празнини и добиените наоди од други истражувања, кои се изложени во поглавје 1 од оваа докторска дисертација, се поставија подолу наведените цел, предмет и хипотези за реализација на истражувањето.

Основна **цел** на оваа докторска дисертација е да се дизајнираат фармацевтско-технолошки процеси за добивање микрочестички и микрокапсули од полисахаридни матрици и енкапсулирани биоактивни компоненти во течна и цврста агрегатна состојба, проследено со нивна физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација. Во таа насока, за добивање на микрочестички и микрокапсули истражени се технолошките процеси на испарување на растворувач од емулзија и надворешно јонотропско гелирање за енкапсулирање на ацетаминофен и етерично масло од портокал, соодветно.

За реализација на основната цел, **предмет** на ова истражување е:

- i. Дефинирање на целен профил на квалитет и критични параметри на квалитет (QTPP) на микрочестички и микрокапсули;
- ii. Дефинирање на критични атрибути на квалитет на микрочестички и микрокапсули;
- iii. Идентификување на критични процесни параметри и критични атрибути на квалитет во процес на добивање на микрочестички и микрокапсули преку ризик анализа;
- iv. Евалуација на влијание на СМА врз СQA на целиот производ преку ризик анализа;
- v. Воспоставување на поврзаност помеѓу CPP и CQA на добиените системи;
- vi. Избор на соодветен полимер со примена на конвенционален пристап преку *one factor at a time (OFAT)* експерименти;
- vii. Дизајн на процес преку неконвенционален пристап интегрирајќи формулациски и процесни променливи во иста дизајн-матрица;
- viii. Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на добиените системи;
- ix. Кинетичка студија на *in vitro* ослободување на енкапсулирана супстанца;
- x. Оптимизација на процесите на микроенкапсулација преку студија на експериментален дизајн;

Во насока на остварување на работните задачи на истражувањето, се постави следнава хипотетска рамка:

Главна хипотеза: Примената на QbD пристапот ќе овозможи иницијален развој, дизајн и оптимизација на технолошките процеси за микроенкапсулација, за да се добијат микрочестички и микрокапсули со целна ефикасност на енкапсулација и профил на контролирано ослободување.

Помошни хипотези:

1. Постои правопрпорционална зависност помеѓу уделот на полимер и ефикасноста на енкапсулација (во двата истражувани процеси);

2. Повисок удел на полимер ќе резултира со побавно ослободување на енкапсулираната супстанца (во двата истражувани процеси);
3. Постои обратнопропорционална зависност помеѓу времето на вмрежување и ефикасноста на енкапсулација во процесот на јонотропско гелирање;
4. Постои правопрпорционална зависност помеѓу брзината на мешање на емулзија и ефикасноста на енкапсулација во процесот на испарување на растворувач од емулзија;
5. Понизок удел на полимер и поинтензивно мешање во процесот на испарување на растворувач од емулзија ќе резултира со потесна дистрибуција на големина на честички;
6. Постои обратнопропорционална зависност помеѓу брзината на мешање во тек на вмрежување и ефикасноста на енкапсулација во процесот на јонотропско гелирање;
7. Постои обратнопропорционална зависност помеѓу времето на вмрежување и брзината на ослободување на биоактивната компонента во процесот на јонотропско гелирање;
8. Постои правопрпорционална зависност помеѓу концентрацијата на средството за вмрежување и ефикасноста на енкапсулација во процесот на јонотропско гелирање;
9. Постои обратнопропорционална зависност помеѓу концентрацијата на средството за вмрежување и брзината на ослободување на енкапсулирана супстанца во процесот на јонотропско гелирање;

Од концептот на истражувањето со биоактивна супстанца ацетаминофен, очекуван научен и практичен придонес е во областа на напредна фармацевтско-процесна технологија и пристапот *квалитет според дизајн* за развој и дизајн на процес за микроенкапсулација за добивање носачи на биоактивни компоненти со контролиран профил на ослободување, соодветно. Оттука, апликативниот придонес се очекува во подобрување на: органолептичките својства на API со горчлив или иритирачки вкус предизвикани од APIs вградени во конвенционални цврсти дозирани форми. Од практичен придонес, микрочестичките може да се третираат како интермедиерни форми, кои би се вградиле во готов производ со примена на конвенционални фармацевтско-процесни постапки (пр.: суво мешање и капсулирање, подготовка на орални суспензии и слично).

Од концептот на истражувањето со биоактивната супстанца етерично масло од портокал очекуван е научен придонес во индустријата за фармацевтско-нутритивни препарати и практичен придонес во областа на пристапот *квалитет според дизајн* за микроенкапсулација на етерични масла преку процесот на јонотропско гелирање. Примената на оваа технолошка постапка може да овозможи намалена испарливост на етеричното масло, како и маскирање на неговиот интензивен мирис и горчлив вкус во однос на органолептичките својства. Исто така, примената на оваа постапка може да придонесе кон подобрена оксидативната стабилност и антиоксидативна активност.

Енкапсулирањето на маслото во биополимерната обвивка би овозможило добивање на диететски суплемент со додадена вредност. Комерцијализацијата на

определени препарати како диететски суплементи со етерично масло во прашкаста форма би ја охрабриле оваа насока на истражување. Исто така, во подем на истражување е и дизајн и функционализирање на текстил со терапевтски својства и добивање на специјални текстили. Медицинскиот текстил со импрегнирани и имобилизирани микрокапсули би имал функционални својства со локално терапевтско дејство, во зависност од енкапсулираното етерично масло (пр. *еукалиптус* со аналгетско, антибактериско, антивирусно, антифунгално дејство; *портокал* потпомога во намалување на воспаление, промовира релаксација и ја подобрува циркулацијата; *оригано* со антибактериско, антивирусно и антифунгално дејство, како и антиоксидативно, антиинфламаторно, антидијабетично и како супресор на канцерогени агенси).

Практичниот придонес за примена на QbD пристап во областа на микроенкапсулација, пред сè, може да го забрза фармацевтскиот развој на микрочестичките и микрокапсулите како интермедиерни форми (полупроизвод), во насока на развој на готов фармацевтски производ преку имплементација на конвенционални фармацевтски процеси. Сепак, како предизвик остануваат економската исплатливост на процесите, технолошкиот трансфер од лабораториски на индустриски услови, стабилноста на микрочестичките и микрокапсулите и предизвиците од Регулаторните Агенции за регистрирање на лекови, кои се добиени со комплексна фармацевтско-технолошка (микроенкапсулација).

2.2 Примена на *квалитет според дизајн* пристап во развој на микрочестички и микрокапсули

Развојот на микрочестички и микрокапсули се одвиваше во неколку фази, за кои се искористија следниве алатки од QbD пристапот: ризик анализа, дизајн на експерименти и методологија на одзивни површини:

- Дефинирање на QTPP врз основа анализа на објавени истражувања во областа и посакувани својства на краен микрочестичен производ;
- Идентификување и евалуација на влијание на CMAs на биоактивни компоненти и полимери врз CQAs на целниот производ и влијание на CPPs врз CQAs на целниот производ преку PNA ризик анализи;
- Идентификување на CQAs на микрочестички и микрокапсули;
- Оптимизација на процес на добивање на микрочестички и микрокапсули преку студија на експериментален дизајн и методологија на одзивни површини;
- Анализа на влијание на процесни и формулациски променливи врз CQAs;

Во тек на евалуација на ризиците и за *квалитет според дизајн* пристап се применија препораки од ICH Q9 (2015) и ICH Q8 (R2) (2009) за евалуација на ризик за квалитет и фармацевтскиот развој, соодветно.

2.2.1 Дефинирање на QTPP и CQAs за микрочестички и микрокапсули

Во табела 2.1 и 2.2 е прикажан QTPP за микрочестички и микрокапсули, соодветно.

Табела 2.1. Целен профил на квалитет на производ за микрочестички со ацетаминофен

QTPP елементи	Цел	Образложение
Терапевтска индикација	Аналгетско, антипиретско и системско дејство	Ублажување на благи или умерени болки, хронична терапија за артритис, намалување на телесна температура предизвикана од настинка, грип и сл.
Дозирани форма	Микрочестички во гастрорезистентна капсула	Во согласно со Ph.Eur. монографија за гранули и капсули
Начин на администрирање	Перорално	Фармацевтски барање за фармацевтска дозирана форма со перорален пат на администрирање со контролирано ослободување на лек
Јачина на дозирана форма	4 000 mg/на ден за возрасен	Еквивалентно претставување како регистриран лек за продажба со иста API во цврста дозирана форма
Фармакокинетика	По орална администрација, се апсорбира во тенкото црево преку пасивна дифузија. Полувреме во крвна плазма е 1.5-2.5 часа при препорачани дози.	<i>In vitro</i> симулација на систем на клеточни култури, или <i>In vivo</i> биостудија на животни и/или луѓе
Атрибути на квалитет на микрочестички	Изглед Распределба на големина на микрочестички Идентификација Ефикасност на енкапсулација Енкапсулиран ацетаминофен Униформност на дозирани единици Контролирано ослободување на лек Сродни и деградациони продукти* Резидуални растворувачи* Микробиолошки квалитет*	Врз основа на достапни литературни објавени истражувања за микрочестички и Ph.Eur. монографија за цврсти дозирани форми.
Примарно пакување	Избрана соодветно во тек на развој и студии на стабилност	Да се постигне посакуван рок на употреба, да се одржи интегритет на продуктот во тек на транспорт и во тек на рутинско администрирање
Стабилност	Стабилен продукт во рок на употреба при препорачани услови на чување	Во согласност со ICH 2001 – Q1 A (R2) тестирање на стабилност на нови лековити супстанции и продукти CPMP/ICH/2736/99
Услови на складирање	Услови на складирање докажани со студии на стабилност	Поткрепени со резултати од студии на стабилност

*Овие критични атрибути на квалитет нема да бидат евалуирани во истражувањето, но се критични елементи од QTPP и се евалуирани во ризик анализата

Табела 2.2. Целен профил на квалитет на производ за микрокапсули со енкапсулирано етерично масло

QTPP елементи	Цел	Образложение
Терапевтска индикација	Аналгетско, анксиолитичко и системско дејство	Ублажување на болки, Релаксирачки и редуцирање на вознемиреност
Дозирана форма	Микрокапсули во капсула	Во согласно со Ph.Eur. монографија за гранули и капсули и USP монографија за диететски суплементи
Начин на администрација	Перорално	Фармацевтски барање за фармацевтска дозирана форма со перорален пат на администрација. Со контролирано ослободување на етерично масло
Фармакокинетика	-	<i>In vitro</i> симулација на систем на клеточни култури, или <i>In vivo</i> биостудија на животни и/или луѓе
Јачина на дозирана форма	80 mg	Претставување како регистриран граничен препарат за продажба со етерично масло во цврста дозирана форма
Атрибути на квалитет на микрокапсули	Изглед	Врз основа на достапни литературни објавени истражувања за микрокапсули со етерично масло, Ph.Eur. монографија за цврсти дозирани форми и USP монографија за диететски суплементи
	Распределба на големина на микрокапсули	
	Идентификација	
	Ефикасност на енкапсулација	
	Содржина на d-лимонен*	
	Распадливост	
	Профил на контролирано ослободување	
Оксидативна нестабилност*		
Антиоксидативна активност*		
Микробиолошки квалитет*		
Примарно пакување	Избрана соодветно во тек на развој и студии на стабилност	Да се постигне посакуван рок на употреба, да се одржи интегритет на продуктот во тек на транспорт и во тек на рутинско администрација
Стабилност	Стабилен продукт во рок на употреба при препорачани услови на чување	Во согласност со ICH 2001 – Q1 A (R2) тестирање на стабилност на нови лековити супстанции и продукти CPMR/ICH/2736/99
Услови на складирање	Услови на складирање докажани со студии на стабилност	Поткрепени со резултати од студии на стабилност

*Овие критични атрибути на квалитет нема да бидат евалуирани во истражувањето, но се критични елементи од QTPP и се евалуирани во ризик анализата

Од направениот QTPP профил може да се утврди дека во оваа докторска дисертација, истражувањето е целно насочено кон добивање на микрочестички и

микрокапсули со: висока ефикасност на енкапсулација, минимум ослободување на биоактивна супстанца ($\leq 10\%$ во период од два часа) во симулирани средини на желудник (pH 1,2) и дванаесетпалачно црево (pH 4,5) и максимално ослободување на лек во симулирана средина на тенко црево (pH 6,8 – 7,4), големина на честички со $d_{50} \leq 1000 \mu\text{m}$ и потесна дистрибуција.

Спецификациските точки на ослободување на ацетаминофен се поставија земајќи ја предвид USP монографијата за ацетаминофен таблети и капсули со продолжено дејство на делување (USP, 2022).

Во рамките на оваа докторска дисертација не се испитувани органските онечистувања и резидуалните растворувачи од API и во добиените микрочестички како CQA, согласно утврдениот QTPP, поради ограниченост на расположливи ресурси. Дизајн и оптимизација на формулацијата и процесите за микроенкапсулација беа направени преку DoE и ризик анализа, во кои беа евалуирани три клучни CQAs: ефикасност на енкапсулација, процент на енкапсулирана биоактивна компонента и нејзино ослободување.

2.2.2 Поставување на ризик анализа

Согласно ICH Q9 (2015), се направи проценка на ризикот. Ризик анализата се спроведе со цел да се идентификуваат CQAs, кои би имале најголемо влијание врз крајниот квалитет на продуктот, или да се идентификува причина за недостаток на продуктот. Во оваа насока се изработи анализа преку PNA за биоактивната супстанца, формулацијата (полимерите) и процесите.

2.2.3 Дизајн на процеси за микроенкапсулација на биоактивни супстанции

Во табела 2.3 и 2.4 се прикажани зависните и независните променливи за оптимизација преку DoE за микрочестички и микрокапсули, соодветно. Во истражување за моделирање и оптимизација на процесот на микроенкапсулација се искористи математичкиот модел D-оптимален дизајн со примена на софтверот Modde Pro 12.1. Дизајн-матрицата за микрочестичките опфати вкупно 17 проби, од кои 11 се единечни проби, 1 е централна проба и 3 се репликати.

Табела 2.3 Зависни и независни променливи за оптимизација на микрочестички

Независни променливи (фактори)	Ранг		
	Ниско	Високо	Нивоа на менување
Удел на полимер [w/w]	1:1	1:4	3
Брзина на мешање [rpm]	700	1100	3
Зависни променливи (одговори)	Ниско	Високо	Цел
Ефикасност на енкапсулација [%]	50	100	максимизирање
Ослободен лек во 15 минута [%]	45	65	во опсег
Ослободен лек во 240 минута [%]	85	-	максимизирање
Енкапсулиран лек [%]	15	-	максимизирање

Дизајн-матрицата за микрокапсулите опфати вкупно 23 проби, од кои 18 се единечни проби, 3 се централни проби и 2 се репликати.

Табела 2.4 Зависни и независни променливи за оптимизација на микрокапсули

Независни променливи (фактори)	Ранг		
	Ниско	Високо	Нивоа на менување
Удел на полимер [w/v]	1,5	2	2
Брзина на мешање [rpm]	300	600	2
Време на вмрежување [min]	10	60	3
Удел на средство за вмрежување [w/v]	1	2	2
Зависни променливи (одговори)	Ниско	Високо	Цел
Ефикасност на енкапсулација [%]	75	115	максимизирање
Енкапсулирано масло [%]	60	-	максимизирање
Ослободување на етерично масло на 90 минута [%]	80	-	максимизирање
Ослободување на етерично масло на 30 минута [%]	30	50	во опсег

2.3 Материјали и методи

2.3.1 Материјали

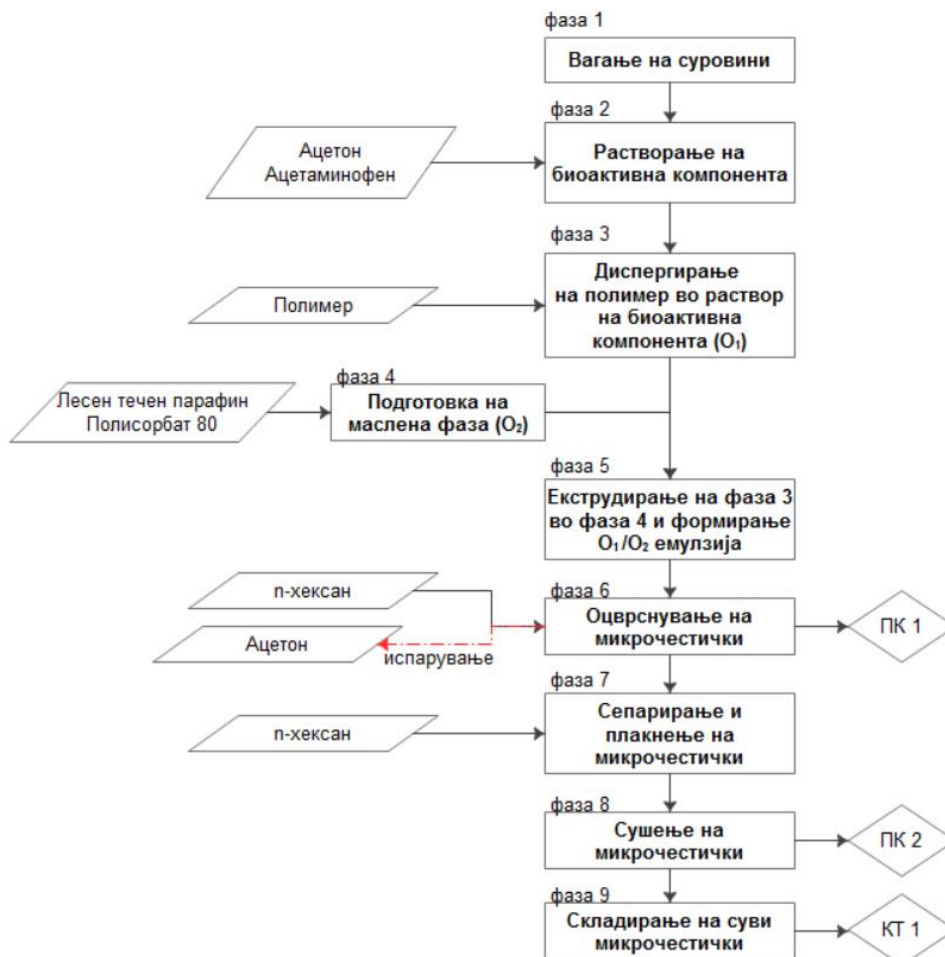
За реализација на поставената цел во оваа докторска дисертација се искористија следните биоактивни супстанции: ацетаминофен и етерично масло од портокал. Полимерите хидроксипропил целулоза и натриум алгинат (Sigma Aldrich, Германија) се применија соодветно за енкапсулирање на ацетаминофенот и етеричното масло. Во постапката на испарување на растворувач од емулзија се употреби лесен течен парафин (Алкалоид АД, Скопје) и површинско активна супстанца полисорбат 80 (Sigma Aldrich, Германија). Како растворувач се употреби ацетон (Алкалоид АД, Скопје), а како неполарен растворувач се употреби n-хексан (Алкалоид АД, Скопје). Во постапката на јонотропско гелирање како средство за вмрежување се употреби воден раствор на CaCl₂·H₂O (Алкалоид АД, Скопје). Останатите хемикалии и реагенси како: натриум хидроксид, калиум дихидроген фосфат, метанол, 96 % етанол и натриум цитрат (Алкалоид АД, Скопје) се со pro analysis квалитет. Се искористија следните комерцијални препарати: Paracetamol 500 mg таблети (KRKA, Словенија), Acetaminophen 650 mg двослојни таблети со продолжено ослободување (Johnson&Johnson Consumer Inc, USA) и Acetaminophen 500 mg филм-обложени таблети (Walgreens, USA). Пречистена вода се користеше од сопствен систем за мембранско пречистување на вода при Технолошко-металуршки факултет во Скопје.

2.3.2 Методи на добивање на микрочестички и микрокапсули

2.3.2.1 Метод на испарување на растворувач од емулзија

Микрочестичките се добија со примена на методот „испарување на растворувач од емулзија“, а за таа цел се подготви о₁/о₂ емулзија. Постапката е прикажана на процесната шема под слика 2-1. Во ацетон се раствори API, а кон истиот раствор

постепено се додаваше и раствараше полимерот. Хидрирањето на полимерот се одвиваше до добивање на транспарентен полимерен раствор под континуиран режим на мешање. Кон течниот лесен парафин (сса. 100 mL) се додаде површинско активна супстанца.



Слика 2-1. Процесна шема на постапка на испарување на растворувач од емулзија

Полимер-АР1 растворот се екструдираше бавно со вронета игла во маслена фаза, во времетраење 10-20 минути под континуиран режим на мешање. По два часа мешање на емулзијата, се додаде сса. 15 mL n-хексан за оцврстување на полимерните микрочестички. Мешањето беше продолжено за период од уште два часа под истите услови. Добиените микрочестички се сепарираа со декантирање и вакуум-филтрација. Сепарираните микрочестички се плакнеа повеќекратно со n-хексан за да се отстрани парафинското масло од нивната површина. Добиените исплакнати микрочестички се сушеа на амбиентални услови во период од 24 часа. Двете предвидени процесни контроли ПК1 и ПК2 (процена контрола 1 и 2) се однесуваат на проверка на просторно-температурните услови (23 ± 2 °C) во фазата на оцврстување на микрочестичките и фазата сушење. Исушените микрочестички беа складирани на услови со нормална температура и притисок и заштитени од влага до понатамошна употреба. КТ1 (контролен тест 1) се однесува на физичко-хемиски тестови за проверка на квалитетот на добиените микрочестички дефиниран со QTPP (Табела 2.1).

Процентот на принос на добиени честички се определени преку равенка (18):

$$\text{принос [\%]} = \frac{W_p}{W_t} \times 100\% \tag{18}$$

W_p – практично измерена маса на суви микрочестички [g],

W_t – практично измерена збирна маса на сите влезни сировини [g]

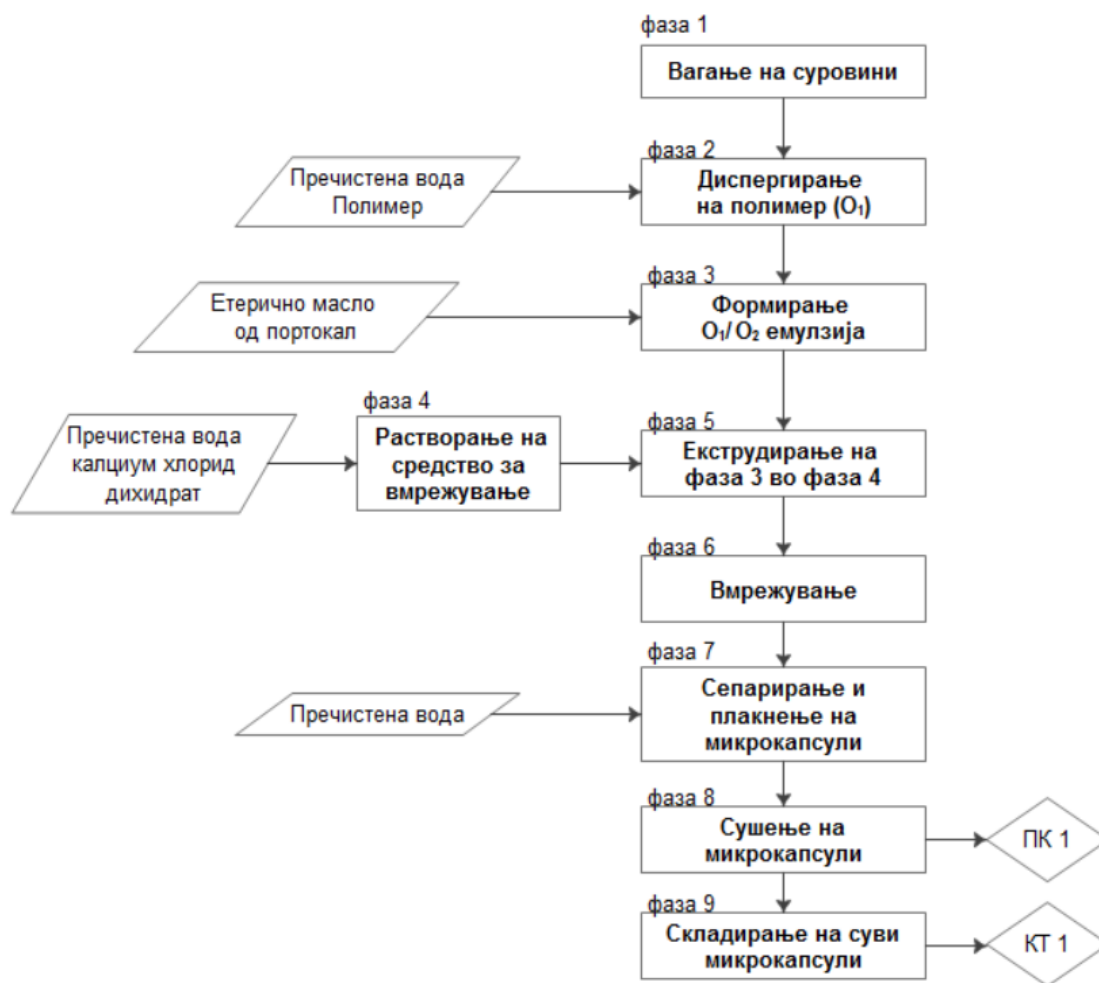
Пробите се подготвија согласно дизајн-матрицата (табела 2.5) во однос на удел на полимер и брзина на мешање на емулзија.

Табела 2.5 Дизајн-матрица за микрочестички со ацетаминофен

Проба	Ac-12	Ac-11	Ac-10	Ac-14	Ac-21	Ac-15	Ac-20	Ac-19	Ac-18	Ac-16	Ac-17
Сооднос API:Pol	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4
Брзина [rpm]	1100	1100	1100	1100	900	900	900	700	700	700	700

2.3.2.2 Метод на надворешно јонотропско гелирање

Микрокапсулите се добија со постапка на надворешно јонотропско гелирање. Постапката е шематски прикажана на процесната шема под слика 2-2.



Слика 2-2. Процесна шема на постапка на надворешно јонотропско гелирање

Натриум алгинат беше растворен во пречистена вода така што се добиваа полимерни водни раствори со соодветна концентрација. Полимерните раствори се оставија да деаерираат на амбиентални услови во период од два часа. Потоа, полимерниот раствор и етеричното масло од портокал со константен волумен (2,5 mL) беа измешени со брзина од 300 rpm во период од 15 минути на магнетна мешалка. По принцип на капење, оформената емулзија постепено се екструдираше со шприц и игла (26G) на висина од сса. 10-15 cm кон раствор за вмрежување $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_{(\text{aq})}$. Реакцијата на вмрежување на полимерните капки настануваше веднаш, така што се оформуваа гелни „egg-box“ микрокапсули. По завршено вмрежување, гелните микрокапсули се сепарираа со постапки на декантирање и филтрација. Плакнењето на микрокапсулите се направи со пречистена вода. Сушењето се одвиваше на амбиентални услови во период од 48 часа. ПК1 (процена контрола 1) се однесува на проверка на просторно-температурните услови (23 ± 2 °C) во фазата на сушење. Приносот на добиени суви микрокапсули се пресмета согласно равенка (18). КТ1 (контролен тест 1) се однесува на физичко-хемиски тестови за проверка на квалитетот на добиените микрочестички дефиниран со QTPP (Табела 2.2). Пробите се подготвија согласно дизајн-матрицата (табела 2.6) во однос на независните променливи.

Табела 2.6 Дизајн-матрица за микрокапсули со етерично масло

Проба	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Проба	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
OL-16	1.5	10	1	300	OL-20	2	10	1	600
OL-1	2	10	1	300	OL-8	1.5	60	1	600
OL-17	1.5	60	1	300	OL-22	2	60	1	600
OL-2	2	60	1	300	OL-9	2	30	1	600
OL-3	1.5	30	1	300	OL-10	1.5	10	2	600
OL-4	1.5	10	2	300	OL-11	2	10	2	600
OL-19	2	10	2	300	OL-12	1.5	60	2	600
OL-5	1.5	60	2	300	OL-23	2	60	2	600
OL-21	2	60	2	300	OL-18	1.5	30	2	600
OL-6	2	30	2	300	OL-13	2	30	2	600
OL-7	1.5	10	1	600	OL-14	2	30	2	600

X₁ – удел на натриум алгинат; X₂ – време на вмрежување; X₃ – концентрација на $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_{(\text{aq})}$;
X₄ – брзина на мешање во тек на вмрежување

2.3.3 Методи на карактеризација на микрочестички и микрокапсули

2.3.3.1 Морфолошка анализа со примена на оптичка микроскопија

Морфологијата на добиените микрочестички и микрокапсули се евалуираше со поларизирачки микроскоп Zeiss Axioscope 5 опремен со камера Zeiss AxioCam 208 во боја со извор на рефлектирачка светлина со оптичко зголемување 2.5x-50x.

2.3.3.2 Определување на дистрибуција на големина на честички

Големината на микрочестичките и микрокапсулите се измери со ласерска дифракција (Mastersizer 3000) со Hydro MV единица. Мерењата се направени во

разредена маслена суспензија на микрочестички во трипликат и изразени како $d_{0.9}$, $d_{0.5}$ и $d_{0.1}$ ³. Распон е мерка за ширина на дистрибуцијата на големина на честички во дисперзија, што може да се пресмета согласно равенката (19) (Elversson, Millqvist-Fureby, Alderborn, & Elofsson, 2003):

$$\text{Распон} = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}} \quad (19)$$

2.3.3.3 Фуриеова трансформна инфрацрвена спектроскопија (FT-IR)

FT-IR спектрите на примероците се снимајќи во подрачје $4000 - 550 \text{ cm}^{-1}$ користејќи ATR модул со ZnSe кристал (Varian 660 FT-IR спектрометар, Varian Inc). Спектрите се претставени како просек од 16 скенови на спектар и резолуција од 4 cm^{-1} .

2.3.3.4 Диференцијално скенирачка калориметрија (DSC)

Мерењата се направија со примена на инструмент Netzsch DSC 204 F1 Phoenix во алуминиумски мали садови со перфориран капак (маса на примерок 2-5 mg). Мерењата се изведоа во сува азотна средина со брзина на загревање 10 Kmin^{-1} . Микрочестичките и микрокапсулите се анализираа во температурен интервал од собна температура до $200 \text{ }^\circ\text{C}$ и интервал од $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ до $230 \text{ }^\circ\text{C}$, соодветно.

2.3.3.5 Термогравиметриска анализа (TG/DTG)

TG/DTG кривите се снимајќи на инструмент Netzsch TG 209 F1 Iris во температурен ранг $25-400 \text{ }^\circ\text{C}$ во отворени керамичко-алуминиумски мали садови (маса на примерок $\sim 4 \text{ mg}$) под динамична азотна атмосфера (30 mLmin^{-1}) и брзина на загревање од 10 Kmin^{-1} .

2.3.3.6 Ултра-виолетова спектрофотометрија (UV-Vis)

UV-Vis спектроскопијата се примени за квантитативна анализа за ефикасност на енкапсулација и ослободување на енкапсулирана супстанца. Спектрите се снимајќи со UV-Vis спектрофотометар (Pharos 600, Merck) во подрачјето $200-400 \text{ nm}$. Аналитичките постапки се објаснети во поглавја 2.3.3.7 и 2.3.3.8.

2.3.3.7 Определување на ефикасност на енкапсулација

Согласно опишаните работни инструментални услови во поглавје 2.3.3.6., се определи ефикасноста на енкапсулација за двата микрочестични системи.

Микрочестичките со ацетаминофен беа растворени во смеса на метанол и вода со сооднос 45:55 (v/v) и финална концентрација на микрочестички $0,02 \text{ mgmL}^{-1}$. Изборот на

³ 10%, 50% и 90% од честичките во испитуваниот примерок имаат дијаметар помал од бројната вредност за $D_v(10)$, $D_v(50)$ и $D_v(90)$

растворувачот се направи преку монографиите за парацетамол готов-производ (USP, 2022; USP-NF, Acetaminophen Tablets, 2021) и модификација на соодносот на двата растворувачи. Пробните раствори се измерија во трипликат на $\lambda_{\max} = 245 \pm 2$ nm.

Публикуваната постапка од авторите Soliman, El-Moghazy, El-Din, & Massoud (2013) за определување на ефикасност на енкапсулација се модифицира во нашето истражување. Микрокапсулите беа растворени во 48 mL раствор на 5,5 mM натрим цитрат + 0,5 % (w/v) Tween 80. Откако микрокапсулите потполно се растворија, се додаде 2 mL 96 % етанол. Пробните раствори се измерија во трипликат на $\lambda_{\max} = 327 \pm 2$ nm.

Ефикасност на енкапсулација и енкапсулирана биоактивна супстанца се пресмета согласно равенка (20) и (21), соодветно.

$$\text{Ефикасност на енкапсулација [\%]} = \frac{W_1}{W_2} \quad (20)$$

кадешто, W_1 е практично определена маса на биоактивна супстанца во аналит [mg], а W_2 е теоретски определена маса на биоактивна супстанца во аналит [mg].

$$\text{Енкапсулирана биоактивна супстанца [\%]} = \frac{W_1}{W_3} \quad (21)$$

кадешто, W_1 е практично определена маса на биоактивна супстанца во аналит [mg], а W_3 е маса на примерок во проба [mg].

2.3.3.8 *In vitro* метод за определување на растворливост

Со оваа студија се истражи влијанието на структурните карактеристики на полисахаридни матрици врз кинетиката на ослободување на биоактивните компоненти. Определувањето на ослободена биоактивна компонента се направи со примена на спектрофотометриски метод.

In vitro ослободување на енкапсулираните биоактивни компоненти се изведе со употреба на магнетна мешалка при температура $37 \pm 0,5$ °C и брзина на мешање 50 rpm, согласно фармакопејски барања (Ph.Eur. 2.9.3). Ослободената биоактивна компонента во дадената временска точка се определи согласно равенка (22):

$$\text{Ослободен лек [\%]} = c \cdot V_m \cdot DF \quad (22)$$

кадешто c е концентрација [mgmL^{-1}], V_m е волумен на медиум [mL], DF е фактор на разредување.

Како медиум за тестирање на растворливоста на микрочестичките се избра фосфатен пуферски медиум pH 6,8 (Ph.Eur. 5.17.1), со почетна концентрација на микрочестички $0,2 \text{ mgmL}^{-1}$. Волумен од 2 mL од медиумот за растворање се пипетираше на претходно дефинирани временски точки и заменет со свеж медиум. Примероците се мереа во трипликат на $\lambda_{\max} = 243 \pm 2$ nm.

Како медиум тестирање на растворливоста на микрокапсули со етерично масло од портокал се избра смеса на фосфатен пуферски медиум pH 7,4 и 96 % етанол во сооднос 9:1 (v/v). Овој медиум за растворливост е претходно истражен (Faidi, и др., 2019). Иницијалната концентрација на микрокапсулите беше $0,2 \text{ mgmL}^{-1}$. Волумен од 5 mL од медиумот за растворање се пипетираше на претходно дефинирани временски

точки и заменет со свеж медиум. Примероците се измерија во трипликат на $\lambda_{\max} = 327 \pm 2 \text{ nm}$.

Комерцијално достапни препарати со парацетамол со конвенционално и продолжено дејство на ослободување беа испитувани во медиум за растворливост - фосфатен пуферски медиум рН 6,8 и медиум рН 1,2, согласно Ph.Eur. 5.17.1.

*Резултати и
дискусија*

3 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1 Дефинирање CQAs на микрочестички и микрокапсули

Врз основа на дефинираниот QTPP се евалуирани параметрите за квалитет со особен осврт кон перспективните CQAs, кои би биле под најизразено влијание од формулациските и процесните променливи (табела 3.1) и би имале можно влијание врз квалитетот, ефикасноста и безбедноста на фармацевтската дозирана форма врз пациентот.

Табела 3.1. Критични атрибути на квалитет на микрочестички

Атрибут на квалитет	Цел	Дали е CQA?	Образложение
Изглед, боја и мирис	Бели до скоро бели полимерни гранули без мирис	Не	Физичките атрибути не се директно поврзани со безбедноста врз пациентот, а прифатливоста од страна пациентот е обезбедена преку крајниот готов фармацевтски препарат (гастрорезистентна капсула наполнета со микрочестички). Производствениот процес може да има влијание врз изгледот (агломерација) на микрочестичките како интермедиерна форма.
Распределба на големина на микрочестички	Во ранг $\leq 1000 \mu\text{m}$ и тесна дистрибуција на микрочестичките	Да	Големината на микрочестичките е важна за дозирањето (капсулирање) и варијација на маса на полна капсула. Ниската вредност за распон укажува на тесна дистрибуција на честички, од што се очекува подобра проточност.
Идентификација	Позитивна за ацетаминофен	Да	Иако идентификацијата на API е критична за ефикасноста и безбедноста на фармацевтската форма, овој CQA би се контролирал преку фармацевтскиот систем за квалитет.
Ефикасност на енкапсулација	Минимум 75 %	Да	Ефикасноста на енкапсулација е директно поврзана со концентрацијата на API во матрицата, т.е. со содржината на API.
Униформност на дозирани единици	$AV \leq 15,0 \%$	Не	Униформноста на дозирани единици не е CQA за високодозирани препарати. Треба да се следи во тек на развојот, бидејќи зависи од униформноста на ефикасност на енкапсулација во полимерната матрица и распределбата на големина на микрочестички.
Растворливост	45-65 % за 15 минути 60-85 % за 60 минути $\geq 85 \%$ за 240 минути	Да	Биорасположливоста на лекот е определена од профилот на ослободување на лекот од микрочестичките.

Табела 3.1. Критични атрибути на квалитет на микрочестички (продолжува)

Атрибут на квалитет	Цел	Дали е СQA?	Образложение
Онечистувања	4-Aminophenol 0,15 % Било кое онечистување: 0,15 % Вкупно онечистувања: 0,60 %	Да	Иако деградационите продукти се контролирани преку спецификациите на API, сепак формулацијата и технолошкиот процес може да влијаат врз нивниот профилот, следствено и врз безбедноста на пациентот. Лимитите на индивидуалните сродни и деградациони продукти треба да се во согласност со ICH Q3B.
Резидуални растворувачи	Ацетон ≤ 5000 ppm Хексан ≤ 290 ppm	Да	Во согласност со ICH Q3C-R8 бидејќи може да влијаат врз безбедноста на пациентот поради дозволените дневни изложувања.
Микробиолошки квалитет	Вкупен број аеробни микроби Не повеќе од 10^2 CFU/mL ⁻¹ Вкупен број квасци/мувли Не повеќе од 10^1 CFU/mL ⁻¹ <i>Escherichia Coli</i> Отсуство/mL	Да	Во согласност со Ph.Eur. 2.6.12 и 2.6.13

Табела 3.2. Критични атрибути на квалитет на микрокапсули

Атрибут на квалитет	Цел	Дали е СQA?	Образложение
Изглед, боја и мирис	Бледо-жолтеникави полимерни микрокапсули со неизразен мирис на портокал	Не	Физичките атрибути не се директно поврзани со безбедноста врз пациентот, а прифатливоста од страна пациентот е обезбедена преку крајниот готов фармацевтски препарат (капсула наполнета со микрокапсули). Производствениот процес може да има влијание врз изгледот на микрокапсулите како интермедиерна форма.
Распределба на големина на честички	Во ранг ≤ 1000 μ m и тесна дистрибуција на микрокапсули	Да	Големината на микрокапсулите е важна за дозирањето (капсулирање) и варијација на маса на полна капсула. Ниската вредност за распон укажува на тесна дистрибуција на микрокапсулите, од што се очекува подобра проточност.
Идентификација	Позитивна за етерично масло од портокал	Да	Иако идентификацијата на етерично масло е критична за ефикасноста и безбедноста на хербален диететски суплемент, поради ризик од токсичност којшто може да произлезе од неправилна идентификација (или неправилно етикетање) на видот на етерично масло.

Табела 3.2. Критични атрибути на квалитет на микрокапсули (продолжува)

Атрибут на квалитет	Цел	Дали е СQA?	Образложение
Ефикасност на енкапсулација	Минимум 85%	Да	Ефикасноста на енкапсулација е директно поврзана со концентрацијата на етерично масло во матрицата, т.е. со содржината на етерично масло.
Распадливост	Отсуство на видно распаѓање на микрокапсулите во pH 1,2 и pH 4,5 во рок од 60 и 30 минути соодветно	Да	Атрибутот влијае врз растворливоста на етеричното масло и специфично локациско растворање на етеричното масло во тенкото црево.
Растворливост	30-50 % за 30 минути ≥ 80 % за 90 минути	Да	Биорасположливоста на биоактивната компонента е определена од профилот на ослободување од микрокапсулите.
Содржина на вода	Надворешно јонотропско гелирање во воден раствор	Не	Водата е употребена за подготовка на воден раствор за вмрежување во тек на технолошкиот процес.
Микробиолошки квалитет	Вкупен број аеробни микроби Не повеќе од 10 ² CFU/mL ⁻¹ Вкупен број квасци/мувли Не повеќе од 10 ¹ CFU/mL ⁻¹ <i>Clostridium</i> Отсуство/ mL <i>Salmonella</i> Отсуство/ mL <i>Staphylococcus aureus</i> Отсуство/ mL <i>Escherichia Coli</i> Отсуство/ mL	Да	Во согласност со Ph.Eur. 2.6.12 и 2.6.13

3.2 Ризик анализа за влијание на СМА и СQAs врз готов производ

Во насока на идентификација на влијанието на критичните атрибути на биоактивна супстанца (Табели 3.3 и 3.4) врз критичните атрибути на квалитет на микрочестичките и микрокапсулите, критичните атрибути на полимери во формулација (Табели 3.5 и 3.6) како и влијанието на процесните фази врз критичните атрибути на квалитет (табела 3.7 и 3.8) се направија ризик анализи. Иницијалната ризик анализа се изведе на три нивоа (висок, среден и низок ризик).

Низок	Општо прифатлив ризик. Нема потреба од понатамошна истрага.
Среден	Ризикот е прифатлив. Би се работело со понатамошна истрага или образложение за да се намали ризикот.
Висок	Ризикот е неприфатлив. Ќе се направи понатамошна истрага за да се намали ризикот.

Табела 3.3 РНА ризик анализа за ацетамнофен

Атрибути на квалитет на АРІ	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Растворливост	Распределба на големина на микрочестички	L	Растворливоста на активната супстанца нема влијание врз: распределбата на големината на микрочестичките, униформноста на дозирани единици, сродни и деградациони продукти. Оттука, ризикот е класифициран како низок ризик.
	Униформност на дозирани единици		
	Сродни и деградациони продукти*		
	Ефикасност на енкапсулација	M	Извршена е енкапсулација на активната супстанца користејќи ја технолошката постапка испарување на растворувач од емулзија. Изборот на растворувач, како и соодносот помеѓу растворувачот и АРІ имаат директно влијание врз ефикасноста на енкапсулација. Од таа причина ризикот е класифициран како среден ризик.
	Профил на контролирано ослободување на лек	M	Ацетамнофенот е класифициран како BCS класа III – ниско пермеабилан и високо растворлив. Растворливоста на ацетамнофенот влијае врз тоа колку брзо ќе се ослободи од микрочестичките. Поради тоа ризикот е класифициран како среден ризик.
Резидуални растворувачи*	L	Растворливоста на АРІ има влијание врз изборот на растворувач, но конкретно ацетонот е класифициран како растворувач со низок токсичен потенцијал. Ризикот е класифициран како низок.	
Полиморфизам	Распределба на големина на микрочестички	L	Според достапните научни трудови, ацетамнофенот има три полиморфни форми од кои: една термодинамички стабилна полиморфна форма (моноклинична форма, означена како Форма I), една метастабилна форма (Форма II) и нестабилна форма (Форма III). Формата I е единствената комерцијално достапна полиморфна форма на ацетамнофен, оттука полиморфизмот на АРІ нема влијание врз CQA's и ризикот е класифициран како низок ризик.
	Ефикасност на енкапсулација		
	Униформност на дозирани единици		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Сродни и деградациони продукти*		
	Резидуални растворувачи*		

Табела 3.3 РНА ризик анализа за ацетамнофен (продолжува)

Атрибути на квалитет на АРІ	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Профил на онечистувања	Распределба на големина на микрочестички	L	4-Аминофенолот како примарно онечистување на ацетамнофенот нема влијание врз распределбата на големината на микрочестичките, униформноста на дозирани единици, профил на контролирано ослободување на лек и резидуални растворувачи. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Униформност на дозирани единици		
	Ефикасност на енкапсулација		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Резидуални растворувачи*		
	Сродни и деградациони продукти*	M	4-Аминофенолот претставува примарно онечистување на ацетамнофенот и има влијание врз сродните и деградационите продукти на АРІ. Од таа причина ризикот е класифициран како среден ризик.
Распределба на големина на честички на ацетамнофен	Распределба на големина на микрочестички	M	Големината на честичките на ацетамнофенот може да има влијание врз распределбата на големината на микрочестичките во процесот на оцврстување на микрочестичките, оттука ризикот е класифициран како среден ризик.
	Ефикасност на енкапсулација	L	Големината на честичките на ацетамнофенот нема влијание врз: ефикасноста на енкапсулација, униформноста на дозирани единици, профил на контролирано ослободување на лек, сродни и деградациони продукти и резидуални растворувачи. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Униформност на дозирани единици		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Сродни и деградациони продукти*		
Резидуални растворувачи*			

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.4 PHA ризик анализа за етерично масло од портокал

Атрибути на квалитет на етерично масло	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Густина	Распределба на големина на микрочестички	L	Густина на етеричното масло од портокал нема влијание врз: распределбата на големината на микрочестичките, распадливиоста, профил на контролирано ослободување на етерично масло. Оттука, ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распадливиост		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Ефикасност на енкапсулација	M	Густина на етеричното масло има влијание врз соодносот помеѓу маслото и полимерот, поради тоа и врз степенот на енкапсулација. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Микробиолошки квалитет*	L	Густина на етеричното масло нема влијание врз микробиолошкиот квалитет на микрокапсулите. Ризикот е класифициран како низок ризик.
Вискозност	Ефикасност на енкапсулација	M	Вискозноста на етерично масло има влијание врз ефикасноста на енкапсулација на маслото во полимерниот матрикс. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Распределба на големина на микрочестички	L	Вискозноста нема влијание врз: распадливиоста, профил на контролирано ослободување на етерично масло, сродни и деградациони продукти и резидуални растворувачи. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распадливиост		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Микробиолошки квалитет*	L	Вискозноста нема влијание врз микробиолошкиот квалитет на микрокапсулите. Ризикот е класифициран како низок ризик.
Хемиски состав	Распределба на големина на микрокапсули	L	Хемискиот состав на етерично масло нема влијание врз: распределба на големина на микрокапсули, ефикасност на енкапсулација, распадливиост, профил на контролирано ослободување и микробиолошки квалитет. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Ефикасност на енкапсулација		
	Распадливиост		
	Профил на контролирано ослободување на лек		
	Микробиолошки квалитет*		

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.5 РНА ризик анализа за ексципиенси во формулација на микрочестички

Ексципиент	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Хидрокси-пропил целулоза	Распределба на големина на микрочестички	L	Користениот ексципиент нема влијание врз распределбата на големината на честичките, изгледот на микрочестичките, присуството на резидуални растворувачи и униформноста на дозирани единици. Поради тоа ризикот е класифициран како низок ризик.
	Униформност на дозирани единици		
	Резидуални растворувачи*		
	Ефикасност на енкапсулација	M	Ексципиентот НРС има влијание врз формирањето на полимерен матрикс, а со тоа и врз ефикасноста на енкапсулација на API во матриксот. Ризикот е среден.
	Профил на контролирано ослободување на лек	M	Полимерниот матрикс има влијание врз степенот на ослободувањето на API, оттука НРС има влијание врз профилот на ослободување и ризикот е класифициран како среден ризик.
	Сродни и деградациони продукти*	M	Постои можност НРС да стапи во интеракција со API и да настанат деградациони продукти, поради тоа ризикот е како среден ризик.
Микробиолошки квалитет*	L	Користениот ексципиент нема влијание врз микробиолошкиот квалитет на микрочестичките. Ризикот е класифициран како низок ризик.	

Табела 3.6 РНА ризик анализа за ексципиенси во формулација на микрокапсули

Ексципиент	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Натриум алгинат	Изглед на микрокапсули	L	Користениот ексципиент нема влијание врз изглед и распределбата на големината на честичките. Од оваа причина ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули		
	Ефикасност на енкапсулација	M	Ексципиентот натриум алгинат има влијание врз формирањето на полимерен матрикс, а со тоа и врз ефикасноста на енкапсулација на стерично масло во матриксот. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Распадливост	M	Полимерниот матрикс има влијание врз распадивоста и степенот на ослободувањето на стерично масло, односно има влијание врз профилот на ослободување. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Профил на контролирано ослободување на лек		
Микробиолошки квалитет*	L	Полимерниот матрикс нема директно влијание врз микробиолошкиот квалитет на микрокапсулите. Ризикот е класифициран како низок.	

Табела 3.7 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрочестички

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Растворање на биоактивна супстанца	Изглед	L	Растворањето на биоактивна супстанца – API нема директно влијание врз изгледот и распределбата на големина на микрочестички. Ризикот е класифициран како низок.
	Распределба на големина на микрочестички	L	
	Ефикасност на енкапсулација	M	Несоодветен режим на мешање и време може да резултираат со нерастворена API на дното од садот за подготовка, што понатаму може да има негативно влијание врз содржината на API и ефикасноста на енкапсулација. Ризикот е класифициран како среден.
	Униформност на дозирани единици	M	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	Растворањето на биоактивна супстанца – API нема директно влијание врз профилот на контролирано ослободување, сродни и деградациони продукти, резидуални растворувачи и микробиолошки квалитет. Ризикот е класифициран како низок.
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	L	
	Микробиолошки квалитет*	L	
Диспергирање на полимер во раствор на биоактивна компонента	Изглед	L	Овие критични атрибути на квалитет не се директно засегнати од процесните параметри во овој процесен чекор. Ризикот е проценет низок.
	Распределба на големина на микрочестички	L	
	Ефикасност на енкапсулација	M	Несоодветна брзина и време на мешање може да резултира со нецелосна хидратација на полимерот. Доколку режимот на мешање не е доволно турбулентен за да ги деагломерира формираните полимерни нехидрирани грутки, тогаш може да влијае врз вискозноста на полимерен раствор, неговата концентрација и капацитет за енкапсулирање. Ризикот е класифициран како среден.
	Униформност на дозирани единици	M	
	Профил на контролирано ослободување на лек	M	Овие критични атрибути на квалитет не се директно засегнати од процесните параметри во овој процесен чекор. Ризикот е проценет низок.
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	L	
	Микробиолошки квалитет*	L	

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.7 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрочестички (продолжува)

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Подготовка на маслена фаза	Изглед	L	Овие критични атрибути на квалитет не се засегнати од процесните параметри во овој процесен чекор. Ризикот е класифициран како низок.
	Распределба на големина на микрочестички	L	
	Ефикасност на енкапсулација	L	
	Униформност на дозирани единици*	L	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	L	
	Микробиолошки квалитет*	L	
Екструдирање на емулзија и формирање на емулзија	Изглед	M	Брзината на екструдирање, дијаметарот на помошната опрема за екструдирање влијаат врз меките микрочестички во нивниот изглед и големина. Преголема брзина на екстудирање може да резултира со агломерација на меките микрочестички со неправилна геометрија и да резултира со широка дистрибуција на големина. Ризикот е класифициран како среден.
	Распределба на големина на микрочестички	M	
	Ефикасност на енкапсулација	L	Брзината на екстудирање и дијаметар на опремата за екстудирање на маслена фаза 1 нема директно влијание врз ефикасноста на енкапсулација. Ризикот е низок.
	Униформност на дозирани единици*	M	Невиедначената брзина на екстудирање може да резултира со формирање на микрочестички со широка дистрибуција, што може да влијание врз униформноста на дозирани единици да биде повисока. Ризикот е класифициран како среден.
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	Процесните параметри од овој процесен чекор (брзина на екстудирање) и дизајн на системот (дијаметар на помошна опрема за екстудирање) немаат директно влијание врз овие критични атрибути на квалитет. Ризикот е низок.
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	L	
	Микробиолошки квалитет*	L	

Табела 3.7 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрочестички (продолжува)

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Оцврснување на микрочестички	Изглед	М	Несоодветен режим на мешање и дизајн на систем за мешање може да имаат влијание врз изгледот на микрочестичките, агрегација на микрочестичките на сидот од садот за припрема или пропелерската мешалка. Широката дистрибуција на микрочестичките поради несоодветен и неоптимизиран режим на мешање може да влијаат врз униформноста на дозирани единици. Режимот на мешање влијае врз ефикасноста на енкапсулација, така што турбулентниот режим овозможува побрзо испарување на ацетонот и оцврснување на микрочестичките. Ризикот е среден.
	Распределба на големина на микрочестички	М	
	Ефикасност на енкапсулација	М	
	Униформност на дозирани единици*	М	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	Влијанието на времето на мешање (испарување на ацетон), брзина на мешање и дизајнот на системот за мешање немаат директно влијание врз овие критични атрибути на квалитет. Ризикот е класифициран како низок.
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	L	
	Микробиолошки квалитет*	L	
Сепарирање и плакнење на микрочестички	Изглед	L	Влијанието на процесните параметри, вакуум на филтрација, време на плакнење и количина на средство за плакнење (отстранување на траги од течен парафин) немаат директно влијание врз овие критични атрибути на квалитет. Ризикот е класифициран како низок.
	Распределба на големина на микрочестички	L	
	Ефикасност на енкапсулација	L	
	Униформност на дозирани единици*	L	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	М	Несоодветно оптимизирана количина на средство за плакнење на добиените микрочестички од траги од течен парафин може да резултира со хексан како резидуален растворувач надвор од спецификациски граници. Ризикот е среден.
	Микробиолошки квалитет*	L	Плакнењето на микрочестичките со хексан и сепарирањето нема директно влијание врз микробиолошкиот квалитет. Ризикот е низок.

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.7 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрочестички (продолжува)

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Сушење на микрочестички	Изглед	L	Оваа процесна фаза нема директно влијание врз изгледот и распределбата на големина на микрочестички. Ризикот е класифициран како низок.
	Распределба на големина на микрочестички	L	
	Ефикасност на енкапсулација	L	Ацетаминофенот не е склон кон испарување, а добиените микрочестички се во цврста агрегатна состојба, така што оваа процесна фаза нема директно влијание врз ефикасноста на енкапсулација и униформност на дозирани единици. Ризикот е класифициран како низок.
	Униформност на дозирани единици*	L	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	Оваа процесна фаза нема директно влијание врз профилот на контролирано ослободување на лек и сродни и деградациони продукти на микрочестичките. Ризикот е класифициран како низок.
	Сродни и деградациони продукти*	L	
	Резидуални растворувачи*	M	Оваа фаза има директно влијание врз резидуален хексан, којшто се користи во последната фаза за плакнење на микрочестичките и отстранување на остатоци од течен парафин. Несоодветно сушење може да резултира со отстапување на резидуален хексан од спецификациските лимити. Оттука ризикот е класифициран како среден ризик.
	Микробиолошки квалитет*	M	Исплакнатите микрочестички треба да се добро исушени за да се минимизира ризикот од микробиолошки раст (контаминација). Оттука ризикот е класифициран како среден ризик.

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.8 PHA ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрокапсули

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Диспергирање на полимер	Изглед на микрокапсули	L	Изглед на микрокапсули и распределба на големина на микрокапсули не се директно врзани со процесот на хидрирање на полимер. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули	L	
	Ефикасност на енкапсулација	M	Овој чекор може да има влијание врз процентот на ефикасност на енкапсулација, бидејќи недоволно изхидрирана количина полимер може да резултира со пониска ефикасност на енкапсулација, бидејќи не се хидрирани полимерните честички поради несоодветен режим на мешање за соодветно диспергирање. Овој процесен чекор може да има влијание врз распадливоста и профилот на контролирано ослободување на етерично масло, бидејќи уделот на полимерот и соодветно неговата изхидрираност влијаат врз достапноста на катјонски локации за оформување на алгинатски матрикс, а оттука и врз неговата цврстина и пермеабилност во медиуми. Ризикот е среден.
	Распадливост*	M	
	Профил на контролирано ослободување на етерично масло	M	
Микробиолошки квалитет*	L	Микробиолошкиот квалитет на микрокапсули не е директно врзан со процесот на хидрирање на полимер. Ризикот е класифициран како низок ризик.	
Формирање на емулзија	Изглед на микрокапсули	L	Изглед на микрокапсули и распределба на големина на микрокапсули се директно врзани со овој процесен чекор. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули	L	
	Ефикасност на енкапсулација	M	Несоодветен режим на мешање може да резултира со нехомогено диспергирање и емулгирање на етерично масло, односно негово сегрегирање на површината од полимерниот раствор. Кога не е соодветно диспергирано етеричното масло во полимерната матрица, постои ризик за негативно влијание врз ефикасноста на енкапсулација, и пониски вредности од спецификациски воспоставените. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Распадливост*	L	Распадливост, профил на контролирано ослободување на етерично масло и микробиолошкиот квалитет на микрокапсули не се директно врзани со овој процесен чекор. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Профил на контролирано ослободување на етерично масло	L	
Микробиолошки квалитет	L		

Табела 3.8 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрокапсули (продолжува)

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Екструзија на емулзија	Изглед на микрокапсули	M	Екструдирањето на емулзијата влијае директно врз изгледот на микрокапсулите и нивната распределба на големина. Брзината и висината на екструдирање и дијаметарот на помошната опрема за екструдирање влијаат директно врз изгледот на добиените микрокапсули како и нивната големина. Ризикот е среден.
	Распределба на големина на микрокапсули	M	
	Ефикасност на енкапсулација	L	
	Распадливост*	L	
	Профил на контролирано ослободување на етерично масло	L	
	Микробиолошки квалитет	L	
Вмрежување	Изглед на микрокапсули	L	Изгледот на микрокапсули не е директно врзан со процесот на вмрежување. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули	M	Концентрацијата на средството за вмрежување влијае врз бројноста на слободно катјони кои може да формираат поразгранета мрежа, а оттука да корелира со зголемена големина на микрокапсулите. Ризикот е среден.
	Ефикасност на енкапсулација	M	Изборот на соодветен гелирачки агенс (дво- или тривалентен катјон) влијае врз ефикасноста на енкапсулација и брзината на реакцијата на вмрежување. Електропозитивноста на катјони има суштинска улога во јонотропско гелирање. Времето на вмрежување и концентрацијата на гелирачкиот агенс имаат суштинско влијание врз повисока ефикасност на енкапсулација. Брзината на мешање во тек на вмрежување нема суштинска улога. Ризикот е среден.
	Распадливост*	M	Концентрацијата на средството за вмрежување, избраниот агенс за вмрежување, валентноста на гелирачкиот агенс и времето на вмрежување влијаат врз густината на оформениот алгинатски матрикс, оттука и врз цврстината и пермеабилноста во медиуми и распадливоста на микрокапсулите. Ризикот е среден.
	Профил на контролирано ослободување на лек	M	
	Микробиолошки квалитет*	L	Микробиолошкиот квалитет на микрокапсули не е директно врзан со процесот на вмрежување. Ризикот е низок.

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

Табела 3.8 РНА ризик анализа за влијание на производствени чекори врз CQAs за микрокапсули (продолжува)

Производствен чекор	Критични атрибути на квалитет на производ	Ниво на ризик	Образложение
Сепарирање и плакнење на добиени микрокапсули	Изглед на микрокапсули	L	Идентификација, изглед на микрокапсули и распределба на големина на микрокапсули не се директно врзани со процесот на сепарирање и плакнење на добиените микрокапсули. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули	L	
	Ефикасност на енкапсулација	M	
	Распадливост*	L	
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	
	Микробиолошки квалитет*	M	
Сушење	Изглед на микрокапсули	M	Процесот на сушење може да влијае врз распределбата на големина на честички, површинската рапавост и изгледот на микрокапсулите. Оттука ризикот е класифициран како среден ризик.
	Распределба на големина на микрокапсули		
	Ефикасност на енкапсулација	M	Процесот на сушење се одвива на амбиентални услови (температура и притисок). Етеричното масло е склоно на испарување, поради тоа е важно да се изберат и одржат контролирана температура во тек на сушење за да нема технолошка загуба на биоактивната компонента. Ризикот е класифициран како среден ризик.
	Распадливост*	L	Униформност на дозирани единици, сродни и деградациони продукти и профил на контролирано ослободување на етерично масло не се директно врзани со процесот на сушење. Ризикот е класифициран како низок ризик.
	Профил на контролирано ослободување на лек	L	
	Микробиолошки квалитет*	M	Хидрираните микрокапсули треба да се добро исушени за да се минимизира ризикот за микробиолошки раст (контаминација). Оттука ризикот е класифициран како среден ризик.

*Овие критични атрибути на квалитет се разгледувани во рамки на ризик анализата, бидејќи се критични елементи од QTPP, но не се предмет на истражување во оваа докторска дисертација

3.3 Принос на микрочестички и микрокапсули

Подобноста на истражуваните технолошки постапки првично се проценени преку технолошките приноси, кои гравиметриски се пресметаа, за двата истражувани системи, а резултатите се прикажани во табела 3.9 и 3.10.

Табела 3.9 Принос на микрочестички

Проба	Ac-10	Ac-11	Ac-12	Ac-14	Ac-15	Ac-16	Ac-17	Ac-18	Ac-19	Ac-20	Ac-21
Принос [%]	67,3	91,9	89,8	87,3	77,3	70,8	83,1	85,8	97,7	70,4	51,9

Приносот на микрочестички добиени со постапка на испарување на растворувач од емулзија може да се забележи дека се во ранг од 51,9 % до 97,7 %. Не може да се утврди корелација помеѓу зголемување на уделот на полимер во формулацијата и приносот. Геометрискиот сооднос на системот за мешање беше константен. Забележана беше технолошка загуба на микрочестичките во фазата оцврстување, во која меките микрочестички агломираат на рабовите од статичката мешалка. Ова се должи на дизајнот, изработката и површинската рапавост на челикот од кој е изработена употребената мешалка. При зголемена брзина на мешање се забележа налепување на микрочестички на внатрешниот ѕид од садот за мешање. Ова се должи на турбулентен режим на мешање, последователно и на распределба на енергија во системот. Екструдираниите микрочестички иницијално се меки и под турбулентен режим на мешање се насочуваат кон ѕидот на садот каде со тек на време се одвива отпарување на ацетонот од микрочестичката и истата може да оцврсне на ѕидот од садот за мешање. Трет фактор на загуба е остаток на полимер-лек раствор во садот за подготовка и помошната опрема за екстудирање во втората маслена фаза.

Табела 3.10 Принос на микрокапсули

Проба	OL-1	OL-2	OL-3	OL-4	OL-5	OL-6	OL-7	OL-8
Принос [%]	68,2	78,5	79,1	76,5	65,5	72,3	72,8	78,2
Проба	OL-9	OL-10	OL-11	OL-12	OL-13	OL-14	OL-15	OL-16
Принос [%]	71,9	70,7	69,5	70,5	73,2	74,4	76,3	83,7
Проба	OL-17	OL-18	OL-19	OL-20	OL-21	OL-22	OL-23	
Принос [%]	79,6	77,4	82,5	77,5	81,2	69,4	70,3	

Од добиените резултати може да се забележи дека приносите на микрокапсули добиени со јонотропско гелирање се во ранг од 65,5 % до 83,7 %. Во споредба со претходно истражениот процес, основен извор за технолошка загуба е во фазата екстудирање на емулзијата во водениот раствор на средството за вмрежување. Емулзијата заостанува на ѕидовите од садот за подготовка и на помошниот прибор.

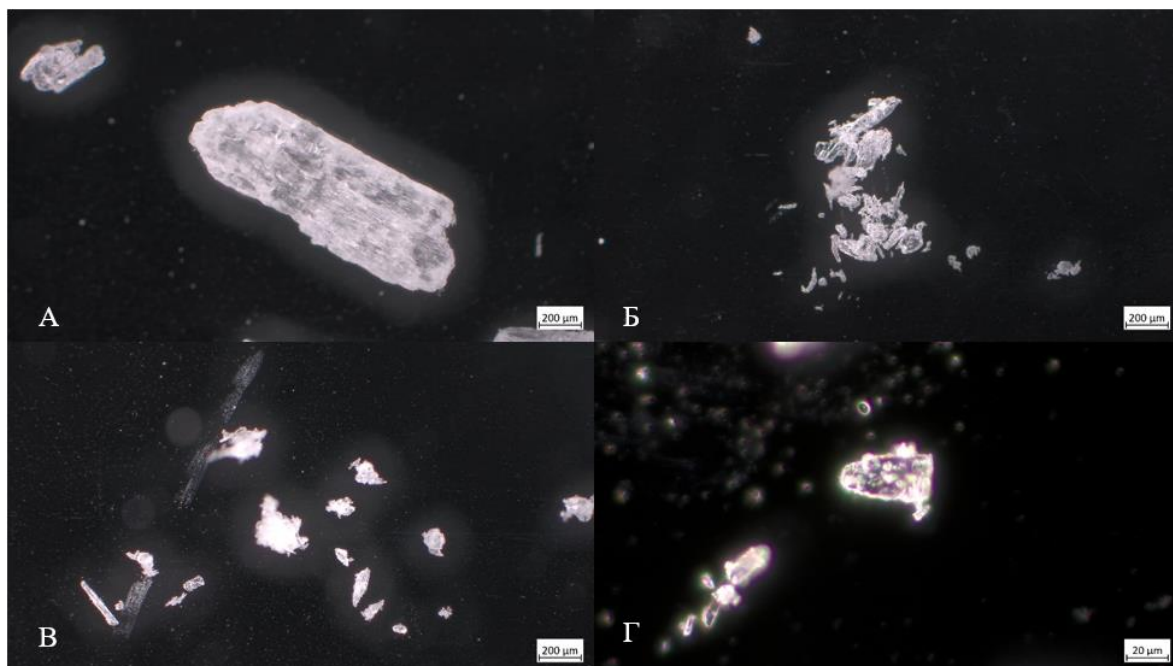
Приносот е економски и еколошки важен фактор во фармацевтската и диететската индустрија. Поради тоа, идентификација на изворите за намален или непосакуван принос е суштински. Помеѓу двата истражувани процеси, може да се

заклучи дека првичен избор би бил јонотропско гелирање. Во поглед на постапката за испарување на растворувач од емулзија, приносот може да се подобри со правилно дизајнирана мешалка, како и соодветен волумен на помошната опрема за екструдирање.

3.4 Карактеризација на микрочестички и микрокапсули

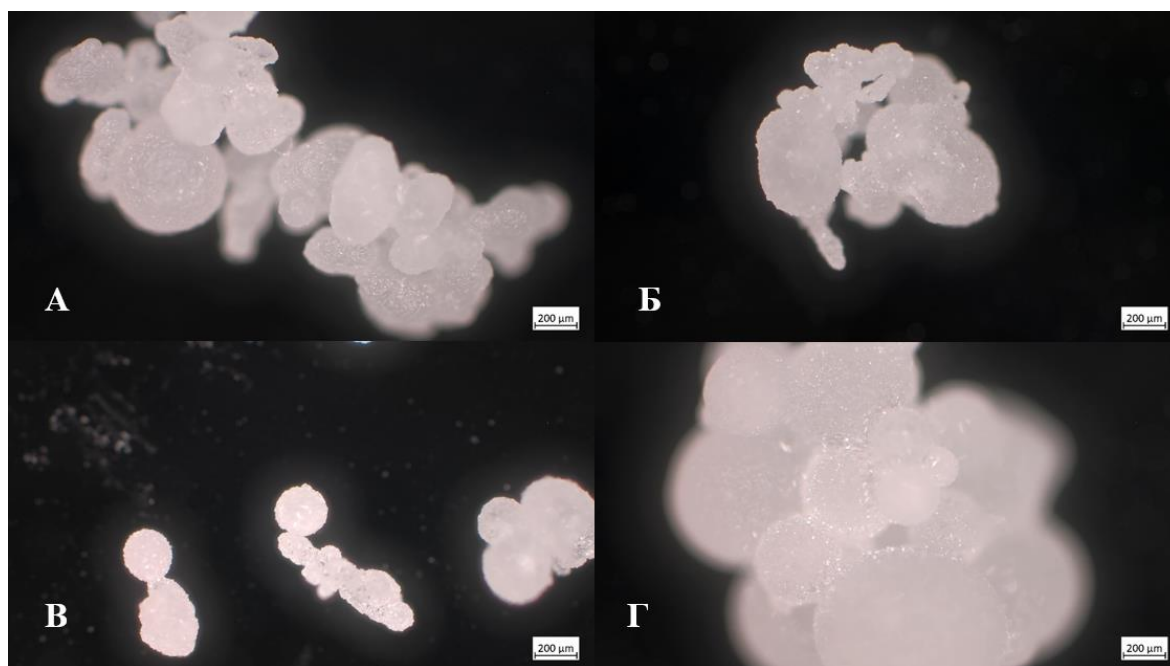
3.4.1 Морфолошка анализа на микрочестички и микрокапсули

Морфологијата на истражуваните полимери и API е прикажана на слика 3-1. Може да се согледа дека морфологијата на почетните суровини е доминантно стапчесто-игличеста со рапава површина, а суровините се одликуваат со полидисперзност. На слика 3-2. е прикажана морфологијата на добиените микрочестички.



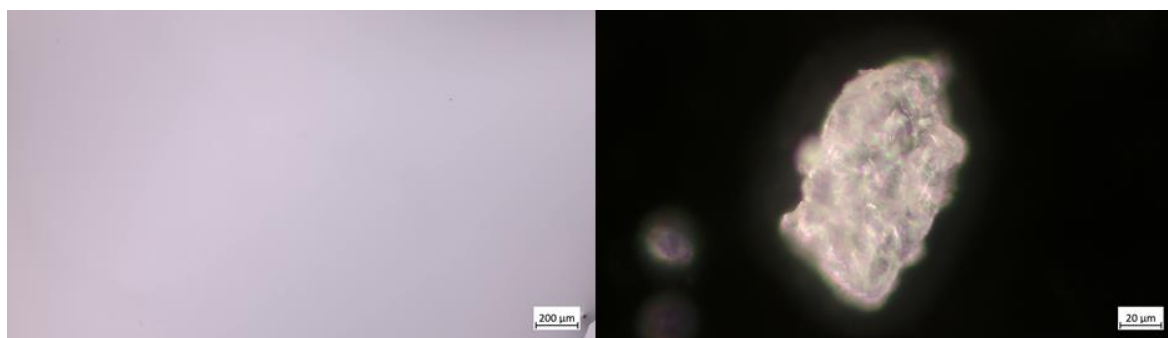
Слика 3-1. Микрофотографии од оптичка микроскопија А) хидроксипропил целулоза со пониска M_r (5x); Б) хидроксипропил целулоза со повисока M_r (5x); В) ацетаминофен (5x); Г) ацетаминофен (50x)

Сферична морфологија на микрочестичките е забележлива при најголем удел на полимер и највисока брзина на мешање во тек на испарување на растворувачот од емулзијата и оцврстување на микрочестичките. Од друга страна, неправилна морфологија е забележлива при најниската брзина на мешање во тек на испарување на растворувачот и пониски удели на полимер. Од микрофотографиите на репрезентативните проби може да се забележи присуство на микрочестички со различна големина и нивна агломерација. Не е согледана значајна разлика во површинската порозност и рапавоста на површинската морфологија. Во однос на морфологијата на почетните суровини може да се утврди дека е значително изменета морфологијата со добивање на микрочестичките. Од стапчесто-игличеста морфологија и транспарентни честички се добиени скоро бели до бели микрочестички со сферична или квази-сферична морфологија со полимерен изглед.



Слика 3-2. Микрофотографии од оптичка микроскопија (5x) А) Ас-21 со удел на АРІ: полимер=1:1 и брзина на мешање во тек на испарување на растворувач 900 грт; Б) Ас-18 со удел на АРІ: полимер=1:2 и брзина на мешање во тек на испарување на растворувач 900 грт; В) Ас-16 со удел на АРІ: полимер=1:3 и брзина на мешање во тек на испарување на растворувач 700 грт; Г) Ас-14 со удел на АРІ: полимер=1:4 и брзина на мешање во тек на испарување на растворувач 700 грт

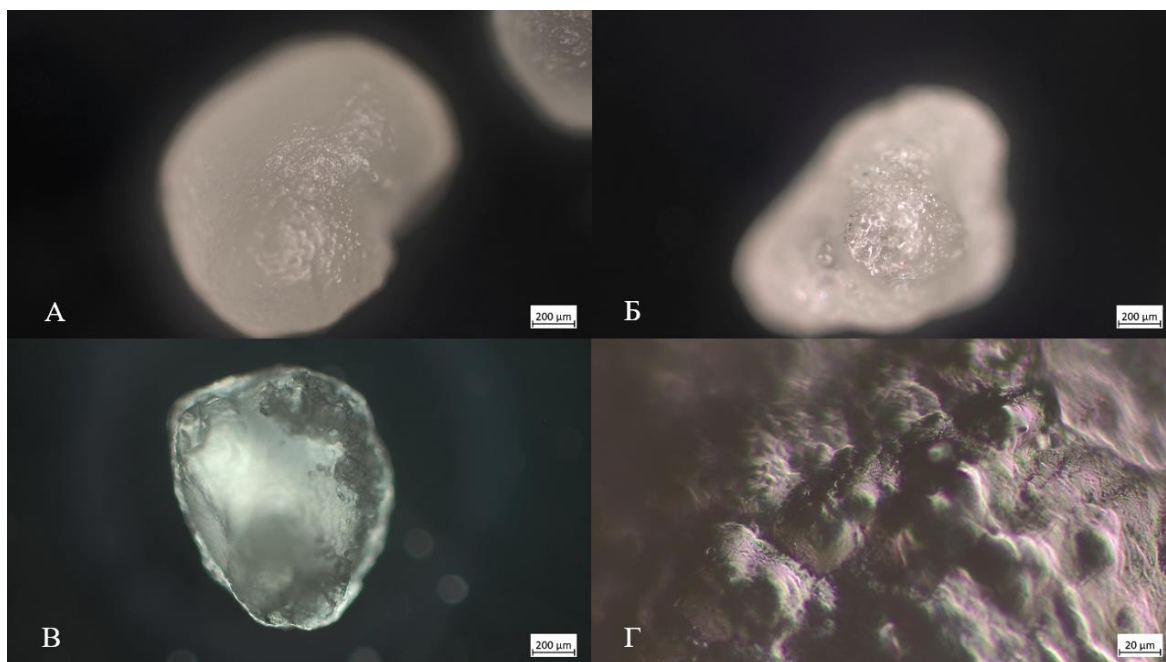
Морфологијата на етерично масло и искористениот полимер е прикажана на слика 3-3. Може да се согледа дека морфологијата на натриум алгинат е неправилна, со изразена релјефна површинска структура.



Слика 3-3. Микрофотографии од оптичка микроскопија на етерично масло од портокал (лево) и натриум алгинатски честички (десно) (5x)

Микрофотографии од алгинатските микрокапсули со етерично масло од портокал се прикажани на слика 3-4. Микрокапсулите се крупни, со овално-неправилна морфологија (Слика 3-4. А и Б) и порозно-рапава површина (Слика 3-4. Г), што е поизразено кај микрокапсулите (Слика 3-4 Б) добиени при повисока концентрација на CaCl_2 . Слични наоди се утврдени од микрофотографиите на алгинатските микрокапсули со еукалиптус (Noprakundilokrat, Piboon, Graisuwan, Nuisin, & Kiatkamjornwong, 2015). Авторите го објасниле овој феномен како право пропорционална зависност помеѓу

уделот на концентрацијата на CaCl_2 и густината на вмрежување, што резултира со пукање на сидот на микрокапсулите и дифундирање на енкапсулираното етерично масло. Во други истражувања е пријавено дека микрокапсулите со помала димензија се посферични, помазни и помалку порозни, во споредба со покрупни микрокапсули. Порозната површина може да доведе до масен транспорт по пат на дифузија на диспергираната фаза кон континуираната фаза (пр. во тек на фазата на вмрежување или плакнењето на микрокапсулите) и да резултира со пониски вредности за ефикасност на енкапсулација (El-Kamel, Al-Gohary, & Hosny, 2003; Liu, и др., 2010).



Слика 3-4. Микрофотографии на микрокапсули А) OL-3 при 1,5 % удел на натриум алгинат, 30 минути на вмрежување при брзина на мешање од 300 грт и концентрација на средство за вмрежување од 1 % (5x); Б) OL-11 при 2 % удел на натриум алгинат, 10 минути на вмрежување при брзина на мешање од 600 грт и концентрација на средство за вмрежување од 2 % (5x); В) OL-5 при 2 % удел на натриум алгинат, 45 минути на вмрежување при брзина на мешање од 600 грт и концентрација на средство за вмрежување од 1,85 % (5x); Г) Површинска морфологија на микрокапсули, проба OL-3 (50x)

3.4.2 Распределба на големина на микрочестички и микрокапсули

Резултатите од распределбата на големината на микрочестички и микрокапсули се сумирани во табела 3.11. и 3.12., соодветно. Сличноста во вредностите на распонот укажува дека дистрибуцијата на големина на микрочестичките и микрокапсулите не се менува со промена на независните променливи.

Табела 3.11. Големина на микрочестички

	Ac-14	Ac-16	Ac-18	Ac-21
D_{50} [μm]	495	528	596	760
Распон	1,3	1,0	1,3	1,0

Не е забележлива зависност помеѓу брзината на мешање на емулзијата во тек на испарување на растворувачот и големината на микрочестичките (Ac-18 vs. Ac-16). Врз основа на вредноста за d_{50} може да се утврди дека големината на микрочестичките се намалува со зголемување на уделот на полимерот (Ac-14 > Ac-16 > Ac-18 > Ac-21).

Табела 3.12. Големина на микрокапсули

	OL-3	OL-4	OL-9	OL-11	OL-15
D_{50} [μm]	1893	1135	1168	1443	1270
Распон	0.7	0.8	0.6	1.2	1.1

Врз основа на вредноста за d_{50} може да се утврди дека со помал удел на полимер се добиени помали микрокапсули (OL-4 vs. OL-11). Од друга страна, при споредба на резултатите за d_{50} кај пробите OL-3 vs. OL-9 може да се утврди обратнопропорционална зависност помеѓу уделот на полимер и големината на микрокапсули. Согледаната зависност може да се должи и на подолго време на вмрежување при помала концентрација на CaCl_2 во однос на согледаната правопрпорционална зависност кај пробите OL-4 vs. OL-11. При повисока концентрација на полимер може да се забележи правопрпорционален тренд помеѓу концентрацијата на средството за вмрежување и големината на микрокапсули.

3.4.3 Фуриеова трансформна инфрацрвена спектроскопска анализа на микрочестички и микрокапсули

FT-IR анализата се изведе за да се определат интеракциите помеѓу биоактивните компоненти и енкапсулирачките супстанции. FT-IR спектарот на НРС, ацетаминофен и другите употребени ексципиенси во технолошката постапка е прикажан на слика 3-5а и 3.5б. Клучните ленти во соодветните слики се асигнирани.

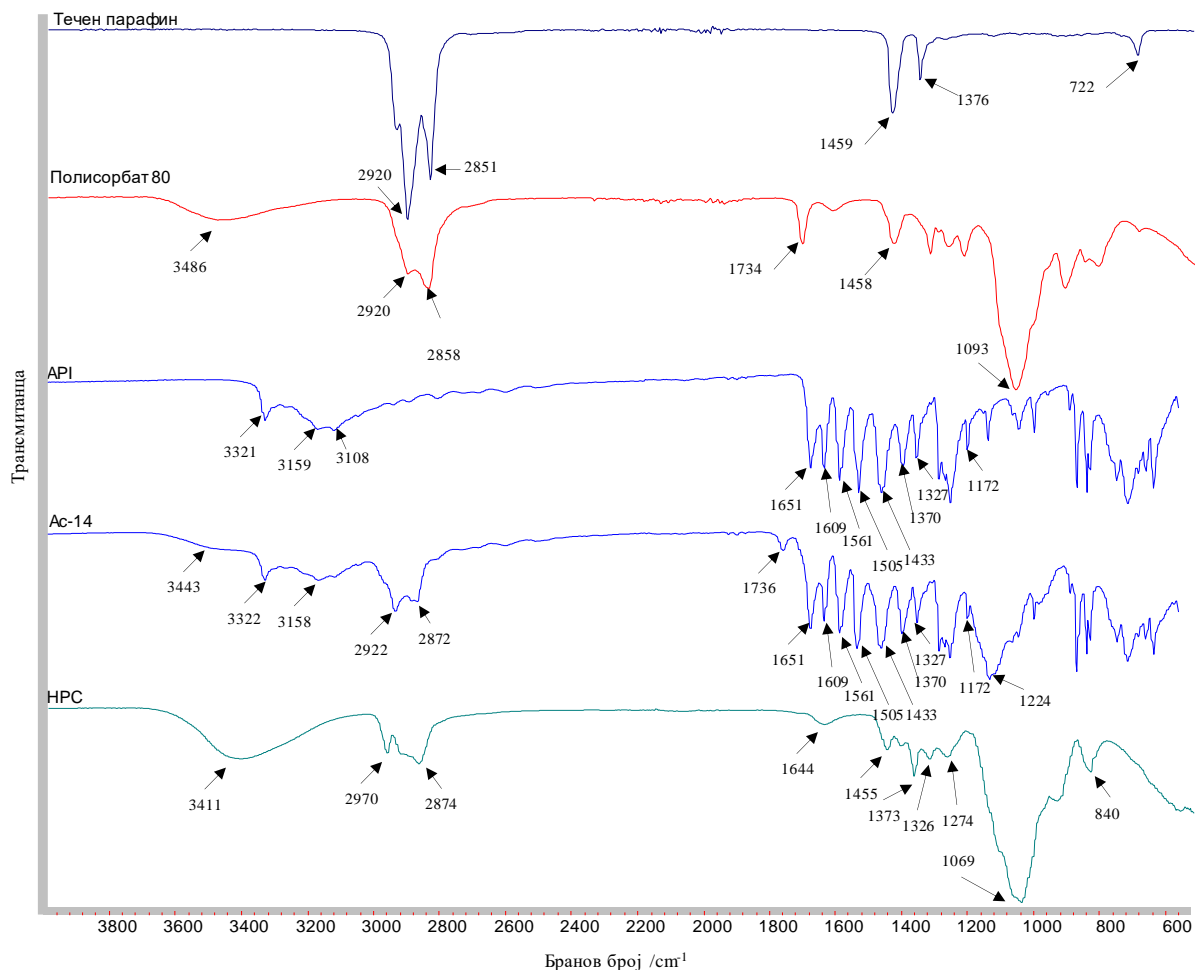
На FT-IR спектарот на лесен течен парафин може да се препознаат лентите на асиметрично и симетрично валентни C-H врски од CH_2 група и деформациона C-H врска на свиткување од CH_2 група на 2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} и 1459 cm^{-1} , соодветно. Апсорпционите ленти, кои потекнуваат од симетричното деформационо виткање на C-H врска од CH_3 група и од деформациона CH_2 на клацкање на 1376 cm^{-1} и на 722 cm^{-1} , соодветно, ја потврдуваат линеарната заситена алифатска структура на лесен течен парафин (Pouchert, 1981).

Од FT-IR спектарот на ацетаминофен може да се согледа карактеристичната лента на фенолен алкохол на 3321 cm^{-1} , C=O што припаѓа на амидна група на 1651 cm^{-1} , скелетни вибрации на C=C врска од бензенов прстен на 1609 cm^{-1} и N-H (амид) на 1561 cm^{-1} (Zarata, и др., 2021).

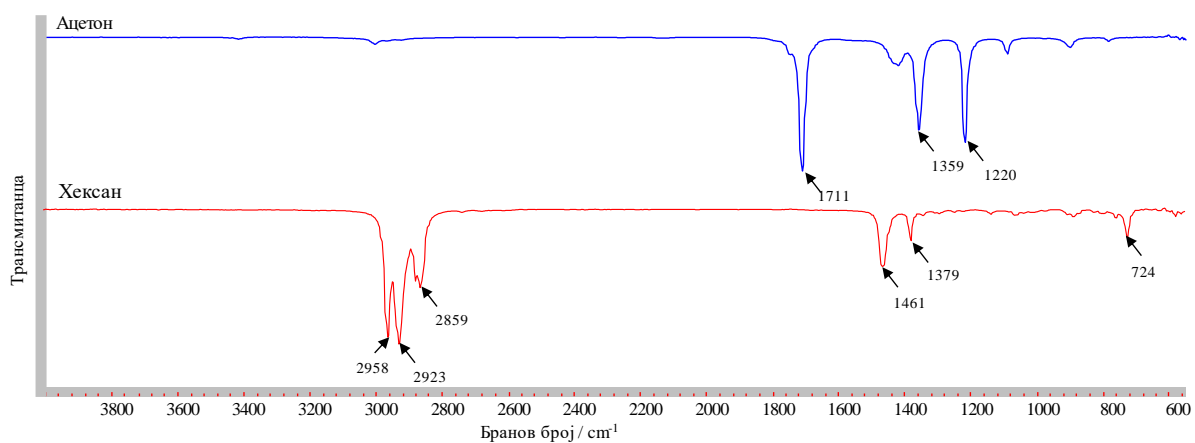
На FT-IR спектарот на НРС, се забележува широка лента на 3411 cm^{-1} , што е карактеристична за O-H група во пиранозната единица од НРС. Пиковите на 2970 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} и 2874 cm^{-1} ги претставуваат асиметрично валентните C-H врски од CH_3 групата и CH_2 врска, соодветно и симетрично валентни C-H врски од CH_3 групата. Острите пикови на 1373 cm^{-1} и 1069 cm^{-1} потекнуваат од симетрични деформации на свиткување на C-H врска од CH_3 групата и C-O-C истегнување, соодветно. Пикот на

1644 cm^{-1} и 1643 cm^{-1} од НРС и од Tween 80 спектар, соодветно, е асоциран со адсорбирана вода (Alemdar & Mohini, 2008). Забележливо е отсуство на овој пик во спектарот на микрочестичките.

FT-IR спектарот на Tween 80 покажува широк и силен O-H пик на 3486 cm^{-1} , лентите на 2920 cm^{-1} и 2858 cm^{-1} потекнуваат од асиметрични и симетрични валетни C-H₂, додека на 1734 cm^{-1} , 1458 cm^{-1} и 1093 cm^{-1} од C=O истегнување, од C-H виткање од C-H₂ врска и C-O-C асиметрични (Bide, Fasharoyeh, & Shokrollahzadeh, 2021).



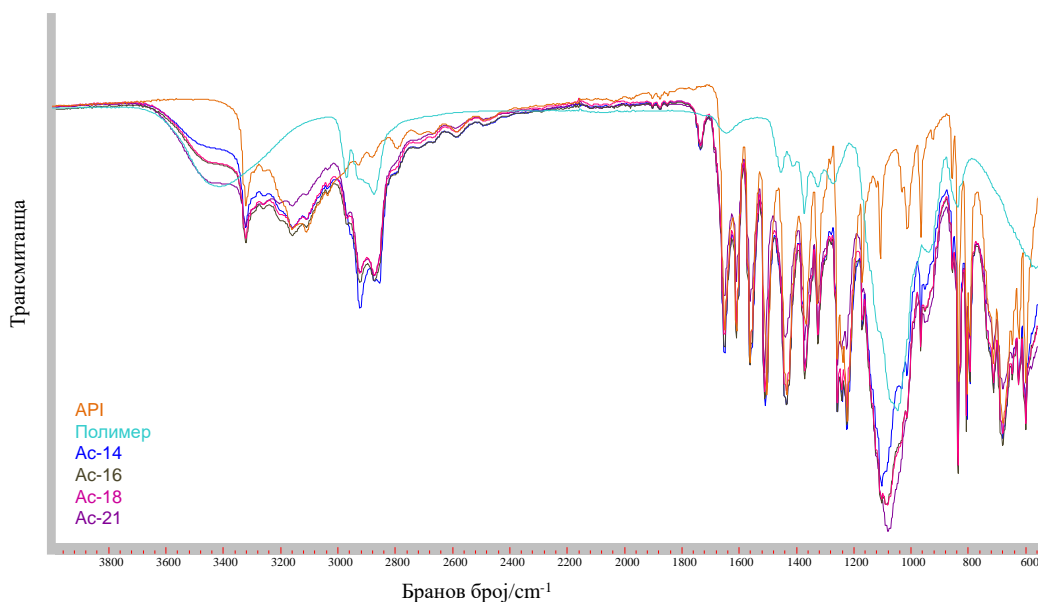
Слика 3-5а. FT-IR спектар на API, НРС, ексципиенси и микрочестички



Слика 3-5б. FT-IR спектар на органски растворувачи користени за добивање на микрочестички

Кај спектарот од неполарниот растворувач може да се препознаат лентите коишто се слични со идентификуваните апсорпциони ленти во FT-IR спектарот од лесниот течен парафин. Пиковите на 2958 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} и 2851 cm^{-1} , ги претставуваат лентите од асиметрично валентните C-H врски од CH_3 групата и CH_2 врска, симетрично валентни C-H врски од CH_2 група, соодветно. Лентата на 1461 cm^{-1} потекнува од деформациона C-H врска на свиткување од CH_2 група. Апсорпционите ленти, кои потекнуваат од симетричното деформационо виткање на C-H врска од CH_3 група и од деформациона CH_2 на клацкање на 1379 cm^{-1} и на 724 cm^{-1} , соодветно, ја потврдуваат линеарната заситена алифатска структура на n-хексан. Од спектарот на поларниот растворувач се препознава карактеристичната остра лента на карбонилната група C=O на 1711 cm^{-1} . Додека лентите на 1359 cm^{-1} и на 1220 cm^{-1} потекнуваат од симетричното деформационо виткање на C-H врска од CH_3 група.

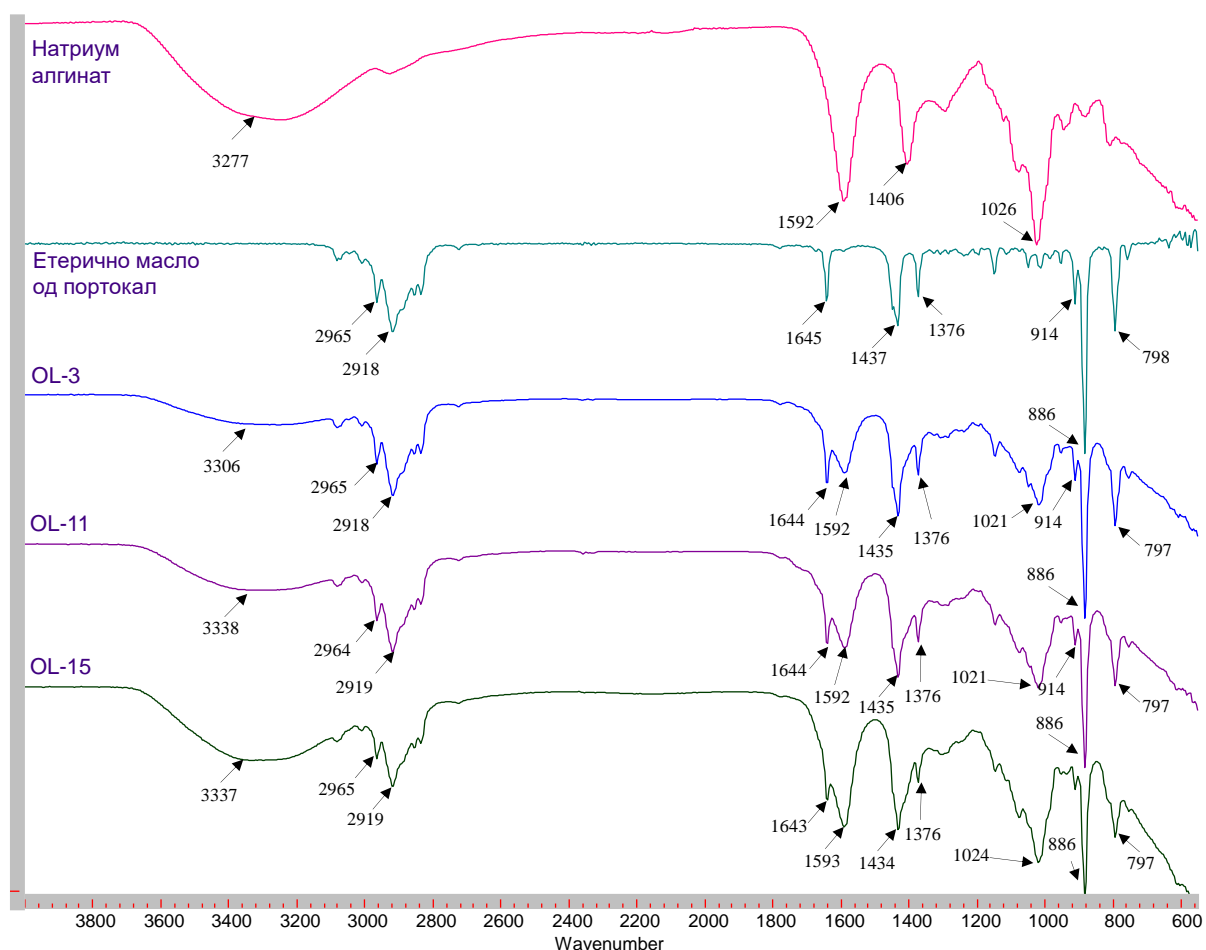
Од FT-IR спектрите на микрочестичките (слика 3-6) може да се согледа дека нема значителни поместувања во карактеристичните ленти за ацетаминофен, што укажува на компатабилност помеѓу компонентите. Нова апсорпциона лента на 1735 cm^{-1} (C=O истегнување) во FT-IR спектарот на микрочестичките потекнува од остатоци од употребениот емулгатор. Забележливо е градиентно зголемување на интензитетот во карактеристичните ленти за ацетаминофен во микрочестичките (Ac-14 > Ac-16 > Ac-18 > Ac-21) на: 1735 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} и 1560 cm^{-1} , кои потекнуваат од карбонилна валентна група, карбонилна група на амидна врска и N-H (амид), соодветно. Согледаниот тренд од FT-IR спектарот корелира со трендот на добиените вредности за ефикасност на енкапсулација и го потврдува енкапсулирањето на ацетаминофен во полимерната матрица.



Слика 3-6. FT-IR спектар на API, полимер и микрочестички

FT-IR спектарот на натриум алгинат (слика 3-7.) покажа карактеристичен широк пик во регион $3650 - 3000\text{ cm}^{-1}$ поради O-H валентна врска. Апсорпционите ленти на:

2929 cm^{-1} , 1592 cm^{-1} , 1406 cm^{-1} , 1297 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} и 1026 cm^{-1} потекнуваат од асиметрично валентни С-Н врски од CH_2 групата, симетрично истегнување на С-О врска од карбоксилатен јон, симетрично истегнување на -COO врска, О-С-С врска, валентно истегнување на етерска врска и од С-О врска, соодветно. Овие карактеристични ленти за натриум алгинат се публикувани и од други автори (Faidi, и др., 2019; Hosseini, и др., 2013; Celер, Demirkaya, & Solak, 2022). Спектарот на чисто етерично масло од портокал покажа карактеристични апсорпциони ленти на 2965 cm^{-1} и 2918 cm^{-1} кои потекнуваат од симетрично и асиметрично валентни С-Н врски од CH_3 и CH_2 група. Со анализа на карактеристичните ленти на лимонен, којшто е главен конституент на маслото, се утврди изразено интензивна лента на 1645 cm^{-1} , којашто потекнува од истегнување на валентна лента на $\text{C}=\text{C}$ од ендоциклична и егзоциклична позиција на лимонен (de Oliveira & Vieira, 2020). Лентите на асиметрична и симетрична деформација на свиткување на CH_3 се на 1437 cm^{-1} и 1376 cm^{-1} , соодветно, додека на 759 cm^{-1} потекнува од деформацијата на клацкање на CH_2 групата. Лентите на 957 cm^{-1} , 914 cm^{-1} и 886 cm^{-1} потекнуваат од $\text{C}=\text{C}$ во лимоненот. Во спектарот на етеричното масло од портокал се забележливи и естерски ленти на 1155 cm^{-1} и 1117 cm^{-1} , кои потекнуваат од други конституенти.



Слика 3-7. FT-IR спектар на натриум алгинат, етерично масло и микрокапсули

На FT-IR спектарот на алгинатската микрокапсула се забележува карактеристична суперпозиција на лентите од вибрационите модови на натриум алгинат

и етерично масло од портокал. Интензитетот на лентите е зависен од уделот на компонентите во самата микрокапсула и може да се согледа дека е намален во однос на индивидуалните FT-IR спектри. Не е забележливо поместување на лентите, што укажува на компатабилност помеѓу двете компоненти.

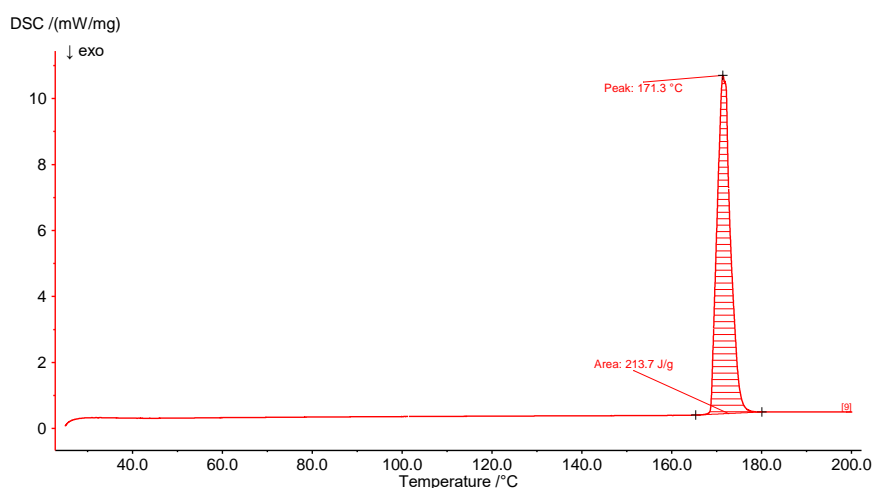
3.4.4 Термички својства на микрочестички и микрокапсули

Испитувањата на термичките својства на чист ацетаминофен, полимери и избрани проби се направија со примена на DSC и TGA техниките. Добиените термодинамички податоци се сумирани во табела 3.13.

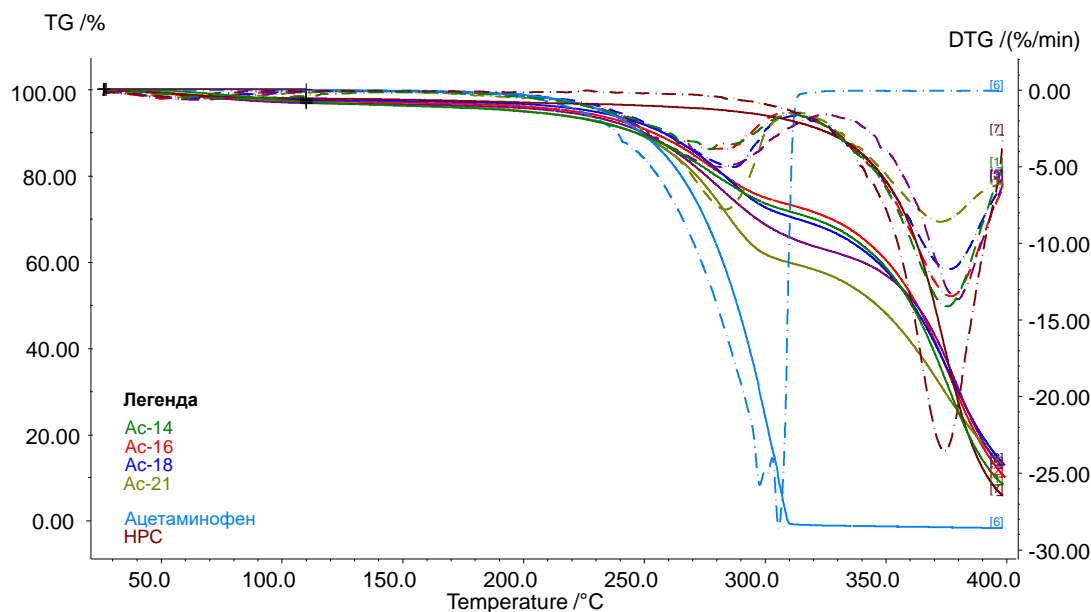
Табела 3.13. Параметри добиени од TGA и DSC анализа за чист ацетаминофен, полимер и проби

Име на проба	Полимер [w/w]	Брзина на мешање [rpm]	T _d ; Загуба на маса [°C ; %]	Максимум на пик [°C]
Ацетаминофен	-	-	110 °C; 0,13 % 310 °C; 100 %	171,3
НРС 1	-	-	400 °C; 94,13 %	68,0
НРС 2	-	-	400 °C; 94,13 %	74,9
Ас-14	1:4	1100	110 °C; 2,92 % 400 °C; 91,67 %	85,1 138,5
Ас-16	1:3	700	110 °C; 2,62 % 400 °C; 89,92 %	66,1 130,5
Ас-18	1:2	700	110 °C; 2,35 % 400 °C; 87,01 %	71,1 134,7
Ас-21	1:1	900	110 °C; 3,03 % 400 °C; 87,49 %	72,9 142,1

На слика 3-8. е прикажан DSC термограм за чист ацетаминофен, додека на слика 3-9. на TGA/DTG термограмот компаративно се прикажани: чист ацетаминофен, употребените полимери и репрезентативните проби.



Слика 3-8. DSC термограм на чист ацетаминофен



Слика 3-9. TGA/DTG термограм на чист ацетаминофен, полимер и микрочестички со ацетаминофен

DSC анализата на чист ацетаминофен покажува ендотермен пик, што се должи на топење на самата супстанца на 171 °C ($\Delta H=213,7 \text{ Jg}^{-1}$). Определената точка на топење на 171 °C е конзистентна со литературните податоци (168-172 °C) (National Center for Biotechnology Information, 2023; Ph.Eur. 0049, 2022; Klimová & Leitner, 2012). Во литературата, во која термичката анализа е направена до 400 °C, се забележува и втор ендотермен пик, кој се должи на термичка разградба на ~364 °C ($\Delta H=465,4 \text{ Jg}^{-1}$) (Jendrzejewska, Goryczka, Pietrasik, Klimontko, & Jampilek, 2020).

TGA/DTG кривата на чист ацетаминофен покажува стабилност до температура од 172 °C, што е конзистентен наод со истражувањато на (Jendrzejewska, Goryczka, Pietrasik, Klimontko, & Jampilek, 2020). Не е забележлива загуба на маса, што ја потврдува безводната природа на ацетаминофен и дополнително ја потврдува термичката стабилност на молекулата до оваа температура. Пикот на 172 °C се должи на топење на ацетаминофен. На ~365 °C може да се забележи загуба на маса поради распаѓање на ацетаминофен. На оваа температура оформената јаглеродна материја во главната фаза на распаѓање (172 °C) подлегнува на дополнително распаѓање на гасовити продукти. Чистотата на ацетаминофен се пресмета преку van't Hoff-ова равенка (23):

$$T_m = T_0 - \frac{RT_0^2 X}{\Delta H_f} \quad (23)$$

кадешто T_m е температура на примерок [K], T_0 е температура на топење на чист ацетаминофен [K], R е универзална гасна константа [$\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$], ΔH_f е топлина на фузија [Jmol^{-1}], X е моларен удел на онечистувања.

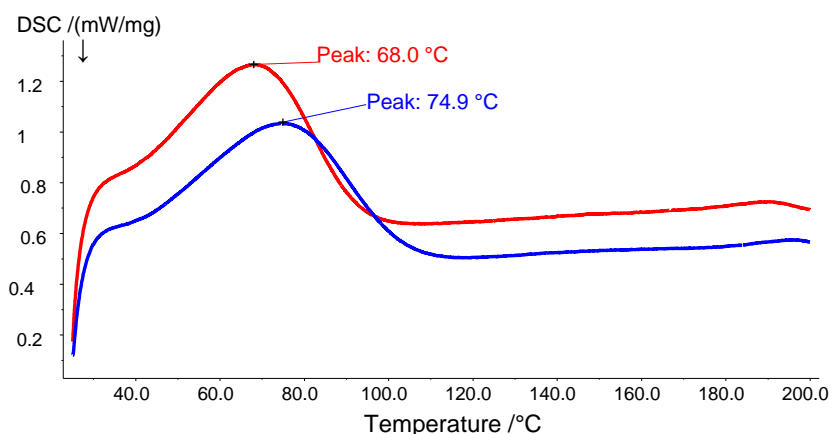
Податоците достапни од NIST базата на податоци се искористија за пресметка на чистотата на ацетаминофен (NIST WebBook Chemie SRD 69, 2023). Определениот моларен удел на онечистувања во мерењата на истражуваната API изнесува 0,065 и се одликува со повисока чистота (0,085 vs. 0,065) во споредба со истражувањато на авторот

Jendrzejewska *et al.* (2020). Степенот на кристалност се определи врз основа на равенката (24) (Crompton, 1993; Giordano, et al., 2002) и за истражуваната API изнесува 97 %.

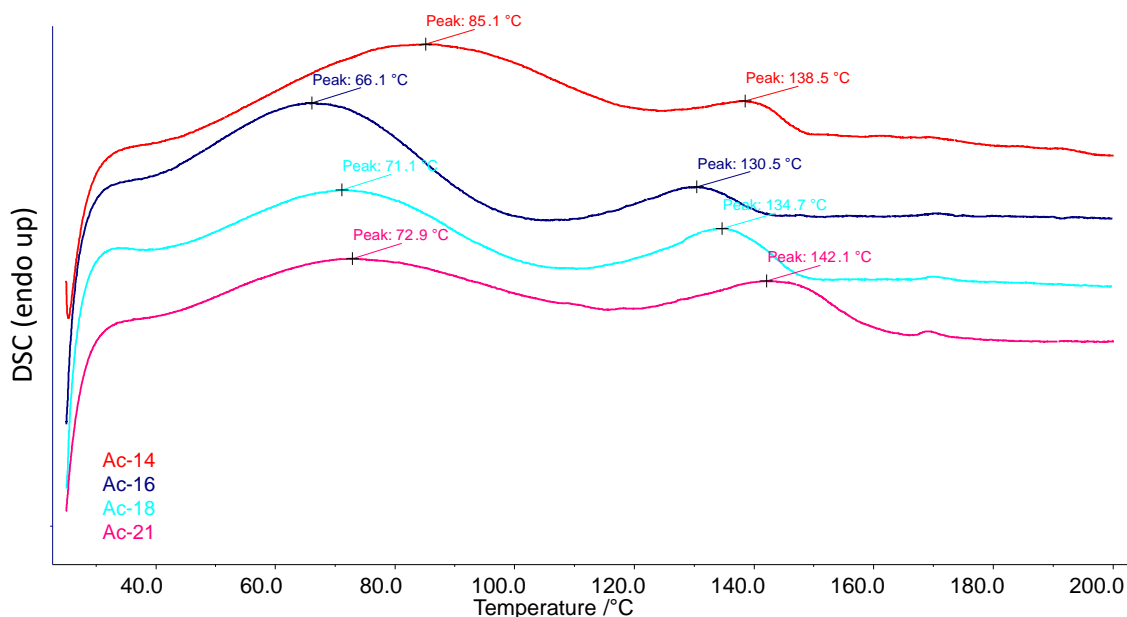
$$\omega_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^\circ} \quad (24)$$

кадешто ΔH_f топлина на фузија на тестирана супстанца [Jmol^{-1}], ΔH_f° топлина на фузија на целосна кристална супстанца ($\omega_c = 100\%$) [Jmol^{-1}].

Од TGA/DTG термограмот (слика 3-9.), може да се утврди дека ацетаминофенот и полимерот имаат еден главен регион на деградација. Кај API започнува од $171\text{ }^\circ\text{C}$ до $310\text{ }^\circ\text{C}$, додека кај полимерот е на температура од околу $300\text{ }^\circ\text{C}$. DSC анализата на чисти полимери од слика 3-10. покажува присуство на широк ендотермен пик. Полимерот со повисока молекуларна маса се одликува со ендотермен пик на пониска температура $\sim 68\text{ }^\circ\text{C}$ во однос на полимерот со пониска молекуларна маса. Согласно достапната литература, HPC омекнува во температурниот ранг $100\text{-}150\text{ }^\circ\text{C}$, додека T_g е во ранг $0\text{-}120\text{ }^\circ\text{C}$, но може да покаже дуална T_g поради β -транзиција (Ashland, 2023).



Слика 3-10. DSC термограм на HPC со пониска M_r (сина линија) и HPC со повисока M_r (црвена линија)



Слика 3-11. DSC термограм на микрочестички со ацетаминофен

Од DSC термограмот на микрочестички (слика 3-11) се забележуваат две широки ендотерми со послаб интензитет. Првиот ендотерм, кој се јавува на пониска температура, се детектира во температурен ранг 66-85 °C. Овој пик потекнува од полимерот НРС, а може да се должи и на остатоци од резидуални растворувачи употребени во процесот за добивање на микрочестички.

Вториот ендотермен пик кој се јавува на повисока температура се должи на топење на API и се случува во температурен ранг 131-146 °C. Добиените температурни вредности не се конзистентни со податоците за чиста API. Забележителните поместувања на ендотермниот пик во корелација со чист ацетаминофен (171 °C) се очекувани и го потврдуваат присуството на поголем удел на ексципиенси.

Земајќи предвид дека температурниот ранг во кој омекнува НРС е 100-150 °C, а експериментално добиената температура на топење на ацетаминофен е конзистентна со литературните податоци, може да се заклучи дека уделот на полимерот (0,2-0,5 %) има доминантно влијание врз поместувањето на ендотермниот пик кон пониски вредности. Термичката стабилност на микрочестичките е до 200 °C.

Ендотермниот пик на ацетаминофен во микрочестичките е значително понизок во однос на чиста API. Ова би можело да сугерира на парцијална солубилизација на API и НРС во чекорот загревање (Palmieri, Cantalamessa, Di Martino, Nasuti, & Martelli, 2002; Капауџа, et al., 2011). Забележаното намалување на T_m , исто така може да се поврзе со интеркацијата лек-полимер (Mididoddi & Repka, 2007). Имено, отсуството на остар карактеристичен ендотермен пик на топење на ацетаминофен во термограмите на микрочестичките укажува дека енкапсулацијата на API во полимерната матрица е постигната (Chikukwa, Walker, & Khamanga, 2020). Повисоката брзина на мешање во тек на испарување на растворувачот од емулзијата укажува дека температурите се повисоки во однос на пробите кои се добиени при пониска брзина на мешање (Ac-14 vs. Ac-16 и Ac-18). Понизок удел на полимер во истражуваните системи на микрочестички корелира со повисоки температури на топење во однос на повисок удел на полимер.

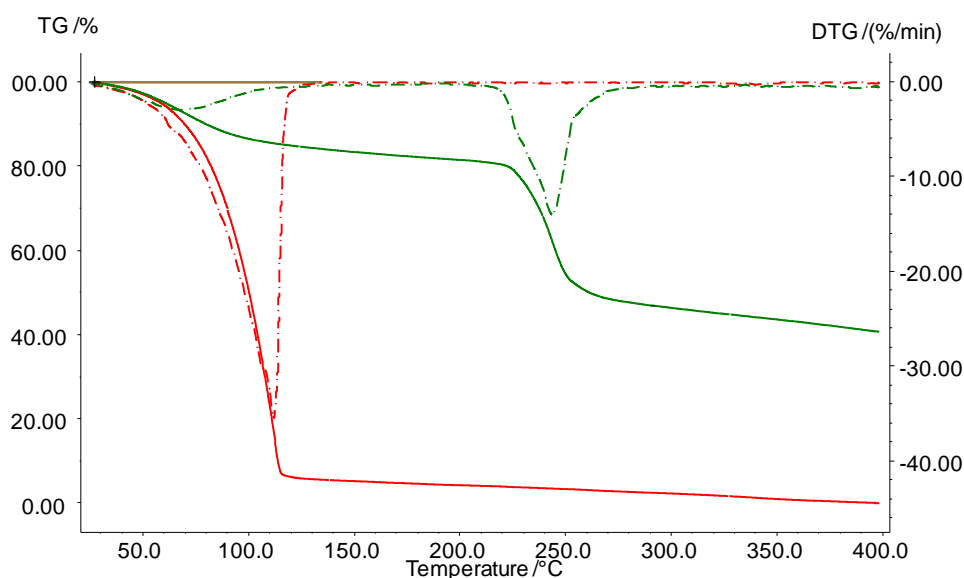
Од TGA/DTG кривите (слика 3-9.) може да се согледа дека кај микрочестичките се забележливи три чекори на загуба на маса. Првиот чекор на загуба на маса е до 110 °C, што се должи на испарување на врзаната влага и присуство на резидуални растворувачи и одлично корелира со првиот ендотерм детектиран на DSC кривите од микрочестичките. Следните два чекори го отсликуваат главниот регион на термичка деградација; првиот чекор е приближно во ранг 210 °C до 310 °C, додека вториот чекор на термичка деградација е во ранг од 325 °C до 400 °C. Од интензитетите на термичка разградба на приближно 365 °C може квантитативно да се согледа дека корелираат со ефикасноста на енкапсулација на ацетаминофен во полимерната матрица.

За микрокапсулите, добиените термодинамички податоци се прикажани во табела 3.14. На слика 3-12. и 3-13. се прикажани DSC и TGA/DTG термограмите за етерично масло и натриум алгинат, соодветно. TGA/DTG термограмот за етерично масло од портокал е типично едностепен процес на испарување и брза загуба на маса во функција од време и температура. Не е забележливо плато, кое би укажувало на термичка стабилност, така што загубата на маса започнува на приближна амбиентална температура сè до 154 °C. Во истражувањето на Martins, Sbaiete, Benites & Maciel (2011), загубата на маса кај етерично масло од портокал се одвивала до 118 °C.

Табела 3.14. Параметри добиени од TGA и DSC анализа за етерично масло, полимер и проби

Име на проба	T _d ; Загуба на маса [°C ; %]	Максимум на пик [°C]
Етерично масло од портокал	135 °C; 94,50 %	154,1
Натриум алгинат	135 °C; 16,05 % 290 °C; 37,13 %	86,2
OL-3	110 °C; 10,85 % 290 °C; 74,18 %	82,2
OL-11	110 °C; 10,10 % 290 °C; 73,05 %	78,3
OL-15	110 °C; 9,45 % 290 °C; 72,94 %	76,5

За реакцијата да се смета дека е процес на испарување, важно е дека загубата на маса во функција од време или температура е процес од нулти ред. DTG кривата е важен индикатор за определување на ред на реакција. Според авторот Nazra *et al.* (2002), една DTG крива се карактеризира дека е од нулти кинетички ред, така што се забележува нагло враќање на кривата од максималната точка до основната линија. Етеричното масло од портокал го следи ова однесување, т.е. нулти-кинетички ред (слика 3-12).

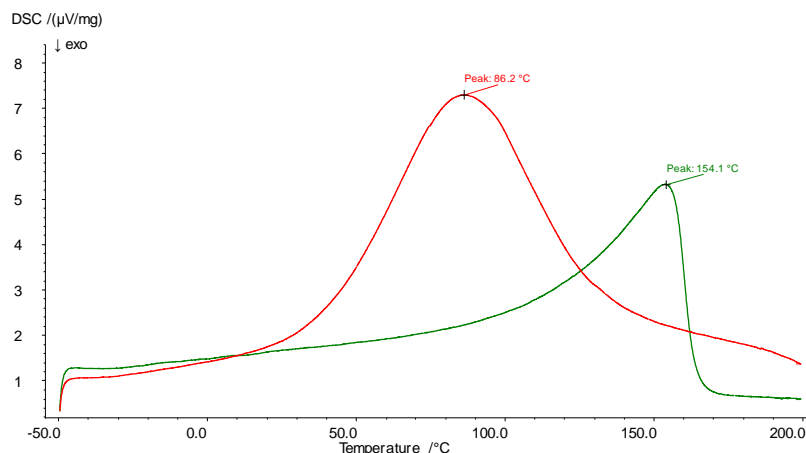


Слика 3-12. TGA/DTG термограм на етерично масло од портокал (црвена линија) и натриум алгинат (зелена линија)

TGA профилот на натриум алгинат покажува двостепена загуба на маса. Иницијалната загуба на маса е 16,05 % во ранг 30-135 °C, што се должи на испарување на влага, и е конзистентно со други истражувања. Втората загуба на маса е 37,13 % во ранг 220-290 °C, што се должи на комплексноста на процесот и доведува до распаѓање на пробата, резултирајќи со формирање на H₂O, CH₄ и CO₂. Слични наоди се добиени и во други истражувања (Salisu, et al., 2016).

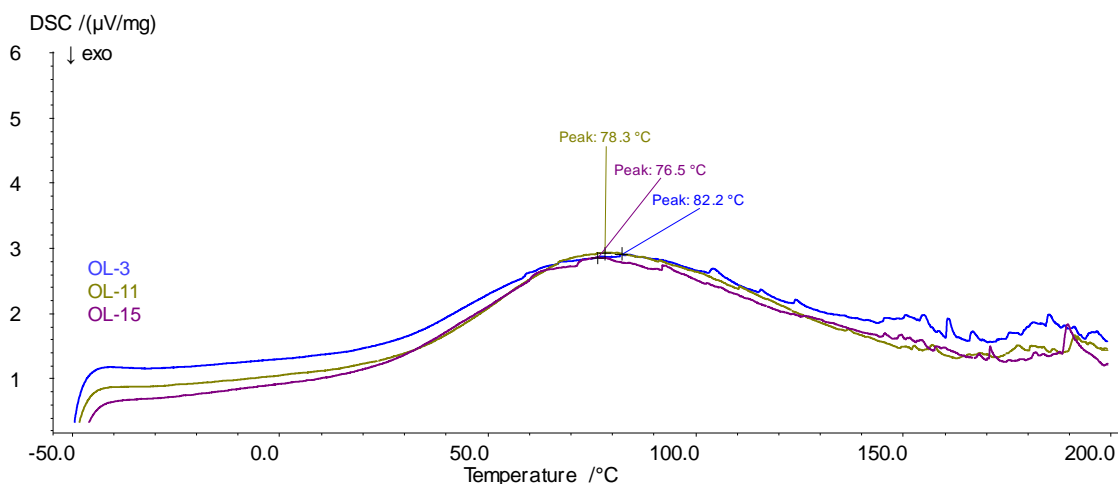
DSC профилот (слика 3-13.) на етеричното масло и натриум алгинатот покажаа ендотермни пикови на 154,1 °C и 86,2 °C. Двата ендотермни пикови се должат на

реакција на испарување, со тоа што на 154,1 °C испарува етеричното масло, а кај натриум алгинат испарува апсорбираната влага.



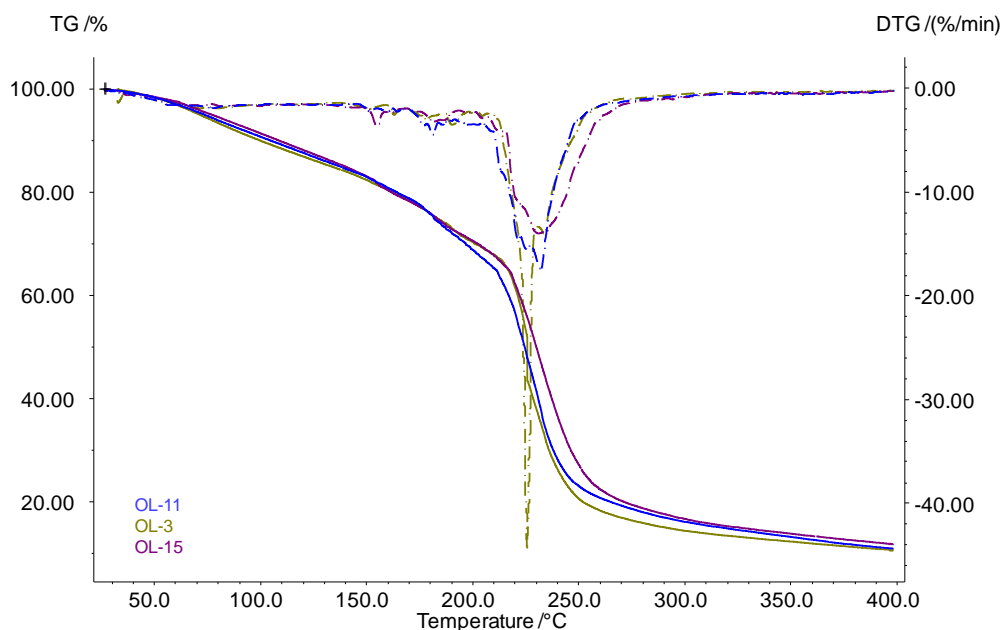
Слика 3-13. DSC термограм на етерично масло од портокал (зелена линија) и натриум алгинат (црвена линија)

На сликите 3-14. и 3-15. се претставени DSC и TGA/DTG термограмите од репрезентативните проби, соодветно. Од DSC термограмот може да се утврди еден ендотермен пик, којшто корелира со загубата на влага од натриум алгинат. Кривите се карактеризираат со „назабен“ облик којшто најверојатно се должи на постепено испарување на етеричното масло од микрокапсулите.



Слика 3-14. DSC термограм на проби со етерично масло од портокал и натриум алгинат

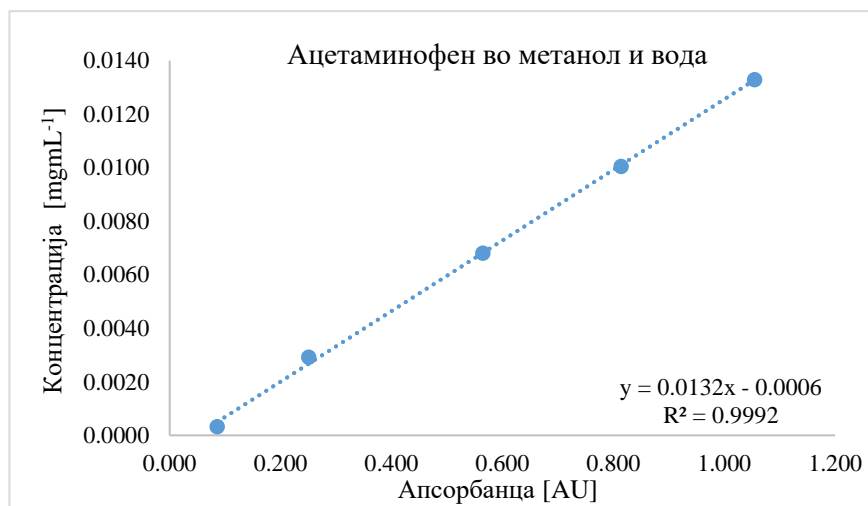
Од TGA/DTG кривите на микрокапсулите може да се согледаат два региони на термичка деструкција. Првиот чекор на загуба на маса е до 110 °C, што се должи на испарување на врзаната влага. Вториот чекор го отсликува главниот регион на термичка деградација, којшто е во ранг 110-400 °C и одлично корелира со DSC ендотермниот пик од натриум алгинат.



Слика 3-15. TGA/DTG термограм на проби со етерично масло од портокал и натриум алгинат

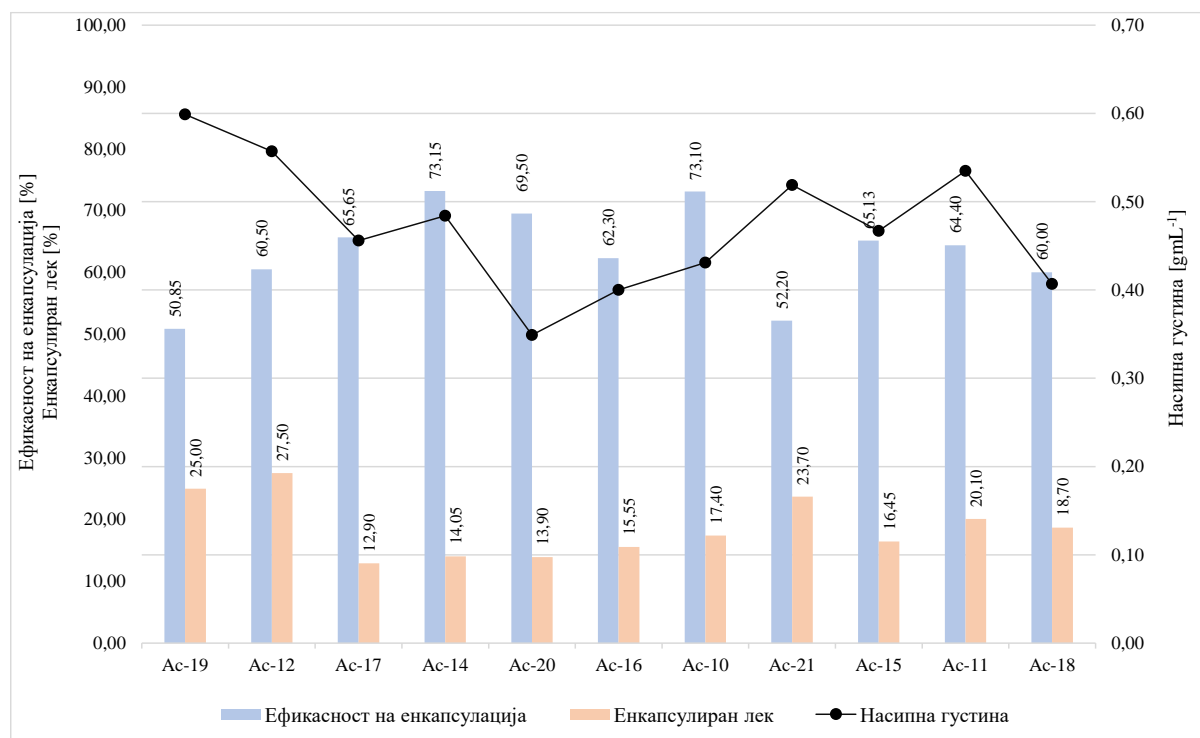
3.4.5 Ефикасност на енкапсулација на микрочестички и микрокапсули

Квантификувањето на ефикасност на енкапсулација се изведе со калибрациона крива (слика 3-16.). За таа цел се изработи серија на стандардни раствори во концентрациски ранг 0,0003 – 0,0133 mgmL⁻¹ од основен стандарден раствор во растворувач метанол и пречистена вода (45:55, v/v) со концентрација c=1,620 mgmL⁻¹.



Слика 3-16. Калибрациона крива за определување на ефикасност на енкапсулација во микрочестички во растворувач метанол и пречистена вода (45:55, v/v)

Резултатите за ефикасност на енкапсулација, енкапсулуран лек и насипна густина за микрочестички се сумирани во графикон прикажан на слика 3-17.



Слика 3-17. Графички приказ за добиените вредности за ефикасност на енкапсулација, енкапсулиран лек и насипна густина кај микрочестички со ацетаминофен

Насипната густина варираше во ранг од $0,400 \text{ gmL}^{-1}$ до $0,599 \text{ gmL}^{-1}$. Најниска вредност ($0,349 \text{ gmL}^{-1}$) се забележа за проба Ac-20, а највисока вредност ($0,599 \text{ gmL}^{-1}$) за проба Ac-19. Не се утврди корелација помеѓу зголемување на уделот на полимерната матрица и насипната густина.

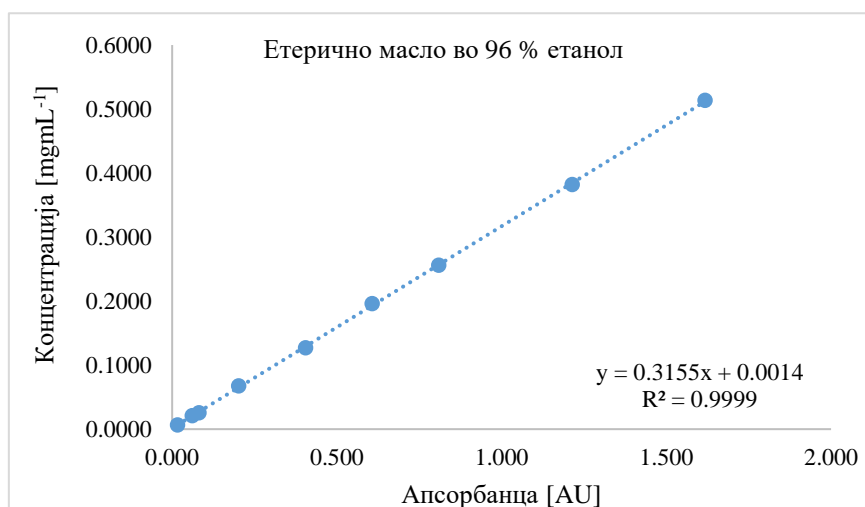
Максимална ефикасност на енкапсулација (73,15 %) е добиена за проба Ac-14, додека најниска вредност (50,85 %) е добиена за проба Ac-19. Добиените резултати укажуваат на право пропорционална зависност помеѓу зголемување на уделот на полимерот и ефикасноста на енкапсулација, а обратно пропорционална зависност со енкапсулираниот лек. Вредностите за енкапсулиран лек се движат во граници од 12,90 % за проба Ac-17 до 27,50 % за проба Ac-12.

Овој наод е конзистентен со наодот од истражувањето на Przybyslawska, Amelian, & Winnicka (2013). Во истражувањето на Yang, Tsay, & Tsiang (2000), повисок удел на ЕС резултира со повисока ефикасност на енкапсулација на аспирин. Ист наод имаат добиено (Patel & Patel, 2014) во кој никорандил бил енкапсулиран во хитозанска полимерна обвивка. Концентрацијата на полимерот е клучен фактор, кој влијае врз карактеристиките и профилот на ослободување на лек од микросферите. Вискозен полимерен раствор е многу потешко да биде раскинат во помали капки при иста брзина на мешање. Оцврстувањето на микрочестичките при повисок удел на полимер е побрзо, може да резултира со вискозен полимерен слој на капката на микросферата така што ја инхибира дифузијата на енкапсулираната супстанца кон надворешната водна фаза. Како последица, повисока концентрација на полимер резултира со повисока ефикасност на енкапсулација на енкапсулираната биоактивна супстанца.

Авторот Mateovic и соработниците (2002) утврдиле правопрпорционална зависност помеѓу фракција на големина на микрочестички со брзина на мешање и просечен удел на модел-лек (пипемидинска киселина). Со ANOVA тест утврдиле значајно влијание помеѓу брзина на мешање и содржината на модел-лек. Од друга страна, инверзна зависност е согледана во микросфери со енкапсулиран симвастатин во смеса на PLA и PCL добиени со испарување на растворувач од o/w емулзија (Hayatunnufus, Wati, & Budianto, 2019).

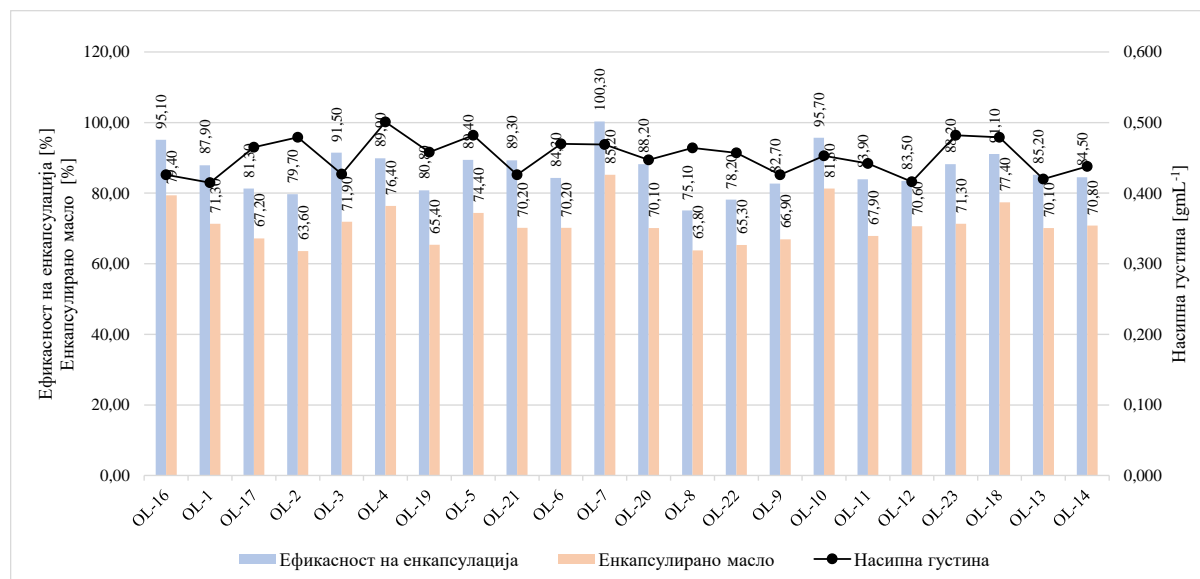
За определување на ефикасноста на енкапсулација на етерично масло од портокал во натриум алгинат се пристапи кон избор на подобен растворувач. Според Ph.Eur. натриум алгинатот е бавно-растворлив во вода, а нерастворлив во 96 % етанол (Ph.Eur. 11.2, 0625 (01/2017), 2017), но авторите Faidi *et al.* (2019) успеале да го растворат натриум алгинатот во 96 % етанол во концентрација 1 mgmL^{-1} . Од авторот Paris и соработници (2020) пријавена е постапка за растворање на микрокапули во 0,055M натриум цитрат. По нивно растворање е додаден етил ацетат со цел екстрахирање на ослободеното етерично масло. Во истражувањето на Nayak *et al.* (2015) бил искористен фосфатен пуфер со pH 7,4, додека од Vannikova и соработниците (2018) е пријавена гравиметриска постапка. Врз основа на литературните достапни податоци, за ова истражување се избра растворувачот 5,5 mM натриум цитрат, а чиј капацитет на растворање се подобри со додавање на површинско активна супстанца 0,5 w/v % Tween 80. За екстракција на етеричното масло од пробниот раствор се додаде 96 % етанол. Крајниот подобен растворувач беше смеса на 5,5 mM натриум цитрат со 0,5 (w/v %) Tween 80:96 % етанол = 24:1 (v/v).

Определувањето на ефикасност на енкапсулација се изведе преку калибрациона крива за чија цел се изработи серија на стандардни раствори во концентрациски ранг $0,016\text{-}1,618 \text{ mgmL}^{-1}$ од основен стандарден раствор во 96 % етанол со $c=1,618 \text{ mgmL}^{-1}$. На слика 3-18. е прикажана калибрационата крива на етерично масло во 96 % етанол, којашто е применлива и за определување на ефикасност на енкапсулација и *in vitro* ослободување на енкапсулирана супстанца.



Слика 3-18 Калибрациона крива за определување на ефикасност на енкапсулација и ослободување на етерично масло во растворувач 96 % етанол

Резултатите за ефикасноста на енкапсулација на етеричното масло од портокал, енкапсулирано масло и насипна густина на микрокапсули графички се прикажани на слика 3-19.



Слика 3-19 Графички приказ за добиените вредности за ефикасност на енкапсулација, енкапсулирано масло и насипна густина кај микрокапсули етерично масло од портокал

Насипната густина варираше во ранг од $0,415 \text{ gmL}^{-1}$ до $0,501 \text{ gmL}^{-1}$. Најниска вредност ($0,415 \text{ gmL}^{-1}$) се забележа за проба OL-1, а највисока вредност ($0,501 \text{ gmL}^{-1}$) за проба OL-4. Максимална ефикасност на енкапсулација ($100,30 \%$) е добиена за проба OL-7, додека најниска вредност ($75,10 \%$) е добиена за проба OL-8. Вредностите за енкапсулирано масло се движат во граници од $63,60 \%$ за проба OL-2 до $85,20 \%$ за проба OL-7. Во однос на параметарот ефикасност на енкапсулација, може да се согледа инверзна зависност помеѓу уделот на полимерот и ефикасноста. Имено, со зголемување на уделот на натриум алгинат, ефикасноста на енкапсулација бележи пониска просечна вредност ($89,29 \%$ за $1,5 \%$ w/v и $84,41 \%$ за 2% w/v). Капацитетот на заробување е мерка за масата на етерично масло што е способно да биде заробено во микросфера и се темели на уделот на употребен полимер. Во оваа студија, концентрацијата на полимерот се менуваше на две нивоа $1,5 \%$ w/v и 2% w/v, додека уделот на маслото беше константен. Резултатите ($74,76 \%$ за $1,5 \%$ w/v и $68,59 \%$ за 2% w/v) укажуваат дека постои инверзна зависност помеѓу уделот на полимерот и енкапсулирано етерично масло. Со зголемување на уделот на полимерот се намалува капацитетот на енкапсулирање на етеричното масло. Ова согледано однесување укажува дека $1,5 \%$ w/v натриум алгинат може да заробува повеќе од 75% на етерично масло (масено). Во ова истражување, ефикасноста на енкапсулација и капацитетот на заробување се високи. Бројни фактори може да ги објаснат добиените вредности. Некои се поврзани со својствата на биополимерите (молекуларна маса, микроструктура, концентрација во дисперзна фаза и друго). Повисоки вредности за ефикасност на енкапсулација се постигнале при повисоки удели на натриум алгинат или биополимер со висока молекуларна маса, во споредба со биополимер со средна или ниска молекуларна маса. Други фактори се големината на

микроферите и нивната морфологија. Микроферите со мала димензија се очекува да бидат сферични, мазни и помалку порозни, во споредба со покрупни микрочестички. Опаѓачкиот тренд на капацитетот на заробување на етеричното масло и ефикасноста на енкапсулација со зголемување на уделот на натриум алгинат може да се објасни преку масени феномени и морфолошко-структурни одлики на микроферите. Имено, зголемувањето на уделот на натриум алгинат резултира со погуста структура, што ги намалува димензиите на порите во микроферите. Ова резултира со зголемен отпор кон масен трансфер и намалена ефективна дифузија на енкапсулирана супстанца (Sevda & Rodrigues, 2011; Soliman E. , El-Moghazy, El-Din, & Massoud, 2013). Во претходно објавени студии, во кои е употребен натриум алгинат како биополимер, се пријавени резултати со различни вредности за ефикасност на енкапсулација. На пример, 4 %, 25 %, 32 %, 67 %, 85 %, 88-91 % и >90 % ефикасност на енкапсулација се постигнати за нитрофурантоин (Hari, Chandy, & Sharma, 1996), етерично масло од каранфилче (Faidi, и др., 2019), индометакин (Shiraishi, Imai, & Otagiri, 1993), дилтиазем (El-Kamel, Al-Gohary, & Hosny, 2003), етерично масло од цимет (Paris, Ramirez-Corona, Palou, & Lopez-Malo, 2020), етерично масло од еукалиптус (Noppakundilograt , Piboon, Graisuwan, Nuisin, & Kiatkamjornwong, 2015), етерично масло од цимет, каранфилче и мајчина душица (Soliman E. , El-Moghazy, El-Din, & Massoud, 2013), соодветно.

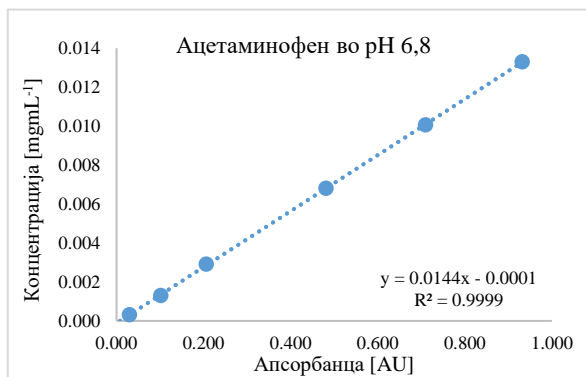
Влијанието на времето на вмрежување врз ефикасноста на енкапсулација и капацитетот на енкапсулирање исто така се евалуираше. Од однесувањето на истражуваните системи е согледана инверзна зависност помеѓу уделот на натриум алгинат и времето на вмрежување врз ефикасноста на енкапсулација и капацитетот на заробување. Резултатите укажуваат дека повисок тренд на ефикасност на енкапсулација и капацитет на енкапсулирање е забележан при понизок удел на полимер. При 1,5 % w/v натриум алгинат постигната е највисока ефикасност на енкапсулација (100,30 % за проба OL-7) и енкапсулирано масло (85,20 % за проба OL-7) за најкратко време на вмрежување, односно 10 минути, додека најниска ефикасност (75,10 %) и енкапсулирано масло (63,80 %) е забележан после најдолго време (60 минути) на вмрежување. При 2 % w/v натриум алгинат, двата параметри бележат значително пониски вредности. Највисока ефикасност на енкапсулација (89,30 % за проба OL-21) и енкапсулирано масло (70,20 % за проба OL-21), додека најниска ефикасност (78,20 %) и енкапсулирано масло (65,30 %) се забележани за проба OL-22. Во однос на времето на вмрежување, просечната ефикасност на енкапсулација е пониска (85,20 %) на најкусо време (10 минути) на вмрежување во однос на најдолго време (60 минути), каде што ефикасноста на енкапсулација е 83,85 %. Со подолго време на вмрежување се постигнува правопрпорционална зависност со енкапсулирана биоактивна супстанца до одредена точка, а потоа се бележи опаѓачки тренд. Овој феномен, според неколку автори, се должи на партиционирање на енкапсулираната супстанца во формирачките микрофери и раствор за вмрежување. Ако енкапсулираната супстанца е растворлива во средството за вмрежување, тогаш подолго изложување ќе предизвика поголема загуба на биоактивната компонента од микроферите по пат на дифузија (Manjanna, Shivakumar, & Pramod-kumar, 2009; Mandal, Kumar, Krishnamoorthy, & Basu, 2010; Soliman E. , El-Moghazy, El-Din, & Massoud, 2013).

Концентрацијата на средството за вмрежување и брзината на мешање во текот на вмрежувањето се евалуирани за двата удели на полимер. Од резултатите може да се забележи дека нема зависност помеѓу уделот на полимерот и концентрацијата на средството за вмрежување врз ефикасноста на енкапсулација и енкапсулираното масло. Слично однесување е забележливо и за брзина на мешање во тек на вмрежувањето. Во одредени разгледани истражувања е утврдено влијание на средството за вмрежување (CaCl_2) врз ефикасноста на енкапсулација. Имено, утврдена е правопрпорционална зависност, до определена граница, помеѓу уделот на средството за вмрежување (CaCl_2) и ефикасноста на енкапсулација. Оваа зависност се должи на зголеменото вмрежување на полимерот и компактоста на формираните нерастворливи густе матрици што резултира во поголем капацитет за да се енкапсулира поголема количина на биоактивна компонента. Во истражувањето на Manjanna, Shivakumar, & Pramod-kumar (2009), повисока ефикасност на енкапсулација (83,3 % vs. 93,3 %) се добила при повисок удел на средство за вмрежување (1 % vs. 5 %, w/v). Сепак, понатамошно зголемување на уделот на средството за вмрежување не резултирало со повисоки вредности на ефикасност на енкапсулација. Овој наод, авторите Manjanna, Shivakumar, & Pramod-kumar (2009) го објасниле дека се должи на можна сатурација на местата за врзување на Ca^{2+} во полимерните вериги. Од друга страна, авторите Soliman E., El-Moghazy, El-Din, & Massoud (2013) студирајќи го градиентното зголемување на концентрацијата на средството за вмрежување утврдиле опаѓачки тренд на ефикасност на енкапсулација и заробената биоактивна компонента. Според нив, овој феномен се должи на намалената големина на пори во алгинатските микросфери при повисок удел на средството за вмрежување, што доведува до опаѓачки тренд на ефикасноста на енкапсулација на биоактивни компоненти.

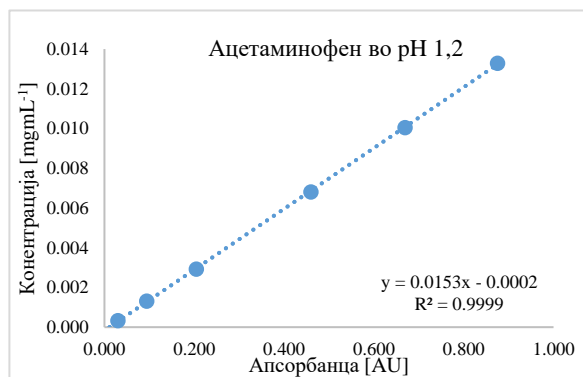
Врз основа на резултатите, висока ефикасност (>85 %) е постигната кај поголемиот број експерименти од дизајн-матрицата, додека највисоката ефикасност е постигната при 1,5 % w/v натриум алгинат, 1 % w/v CaCl_2 , брзина на вмрежување од 600 rpm и време на вмрежување од 10 минути. Во истражувањето на Baimarka и Srisuwan (2014) е определено дека ефикасност на енкапсулација ≥ 80 % е постигнато при низок удел на етерично масло, кои соодветствуваат на концентрација од 10 % во однос на енкапсулирачкиот полимер. Banerjee и соработниците (2013) постигнале ефикасност на енкапсулација од 83,8 %, но во нивната постапка примениле емулгатор (Tween 80) за да го подобрат енкапсулирањето на етеричното масло. Benavides и соработниците добиле висока ефикасност (> 85 %) при 2 % v/v етерично масло и 1 % w/v натриум алгинат.

3.4.6 *In vitro* ослободување и кинетичка студија

Критичниот атрибут на квалитет „ослободување на биоактивна компонента“, како зависна променлива од дизајн-матрицата се следеше во повеќе временски точки. Квантифицирањето на ослободена биоактивна компонента од микрочестичките се направи преку калибрациона крива. За таа цел се изработија серија на стандардни раствори во концентрациски ранг $0,0003 - 0,0133 \text{ mgmL}^{-1}$ од основен стандарден раствор во фосфатен пуфер pH 6,8 и pH 1,2, соодветно. На слика 3-20 и 3-21. се прикажани соодветните калибрациони криви на ацетаминофен.



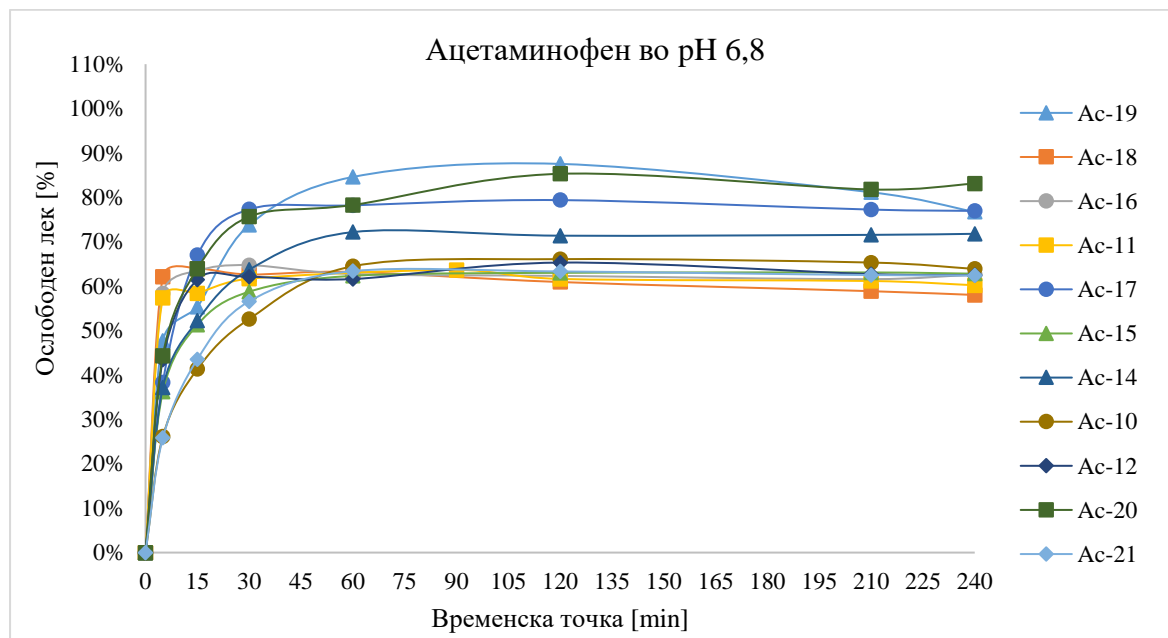
Слика 3-20 Калибрациона крива за ослободување на ацетаминофен во фосфатен пуфер рН 6,8



Слика 3-21 Калибрациона крива за ослободување на ацетаминофен во рН 1,2

Кумулативните криви на ослободување на ацетаминофен од микрочестички се прикажани на графиконот 3-22. Иницијален “burst effect”⁴ во 5 минути се забележува кај сите проби. Најнизок “burst effect” бележат пробите Ас-21 и Ас-10, додека највисок “burst effect” бележи пробата Ас-16.

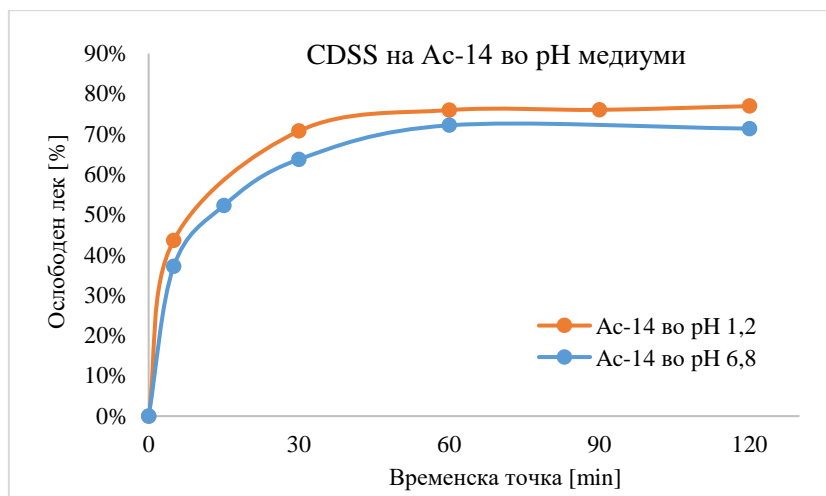
Од кумулативните криви на ослободен лек може да се согледа дека најбавен профил на ослободување на лек покажува пробата Ас-10, со најниска вредност на ослободен лек (43,17 %) во 15 минути. Најбрз профил на ослободување бележи пробата Ас-17 со највисока вредност на ослободен лек (71,05 %) во 15 минути. Во 15 минути може да се утврди право пропорционална зависност помеѓу процентот на ослободен лек од полимерната матрица и уделот на полимерот при брзина на мешање на емулзија на 900 rpm и 700 rpm. Во 240 минути, најмалку ослободен лек е забележлив кај пробата Ас-18, додека најмногу ослободен лек бележи пробата Ас-20.



Слика 3-22. Споредбени кумулативни профили на ослободен ацетаминофен од микрочестички во рН 6,8

⁴ “burst effect” е феномен кој е карактеристичен за формулации со контролирано дејство на ослободување и доведува до повисоко иницијално ослободување на лекот, пред профилот на ослободување да стане стабилен, веднаш откако ќе биде ставен во медиумот за ослободување на лек

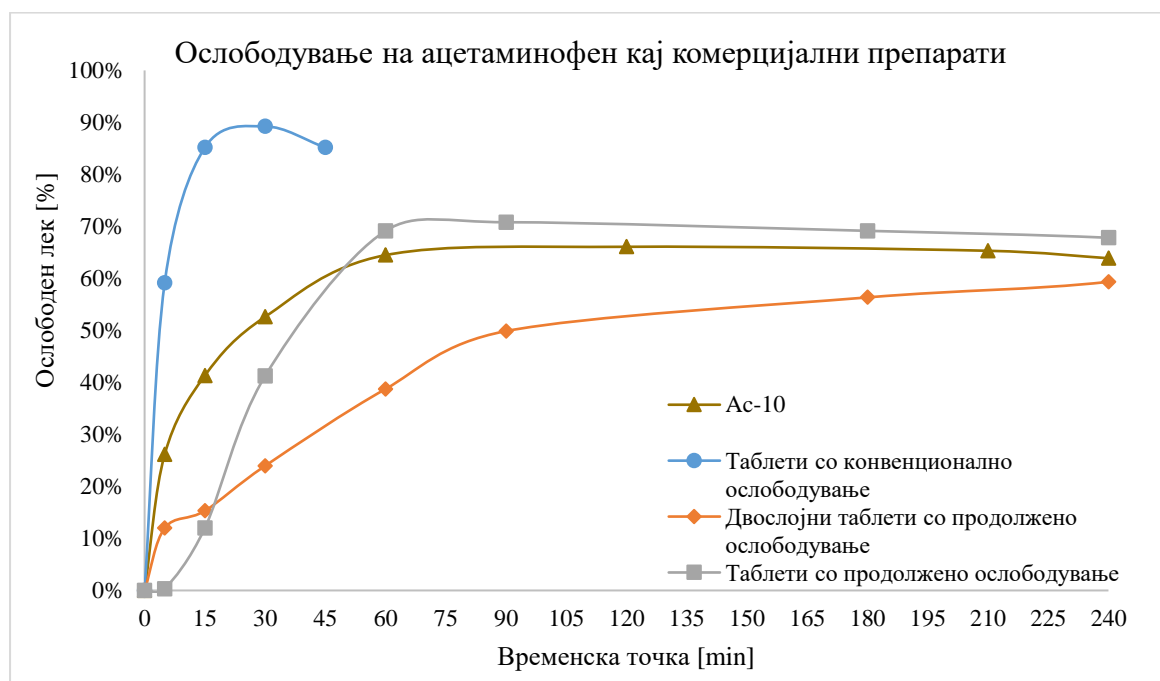
Во медиумот за растворливост рН 1,2 се согледа ослободување на ацетаминофен со сличен профил како и во рН 6,8 (слика 3-23.), што укажа на неподобност на носачот на лек за контролирано ослободување во дебелото црево.



Слика 3-23. Компаративни профили на ослободен ацетаминофен од проба Ас-14 во медиум рН 1,2 и рН 6,8

Следствено се процени за потреба од примена на гастрорезистентно капсулно тело во следните развојни фази за добивање на фармацевтска дозирана форма, за исполнување на барањата на ЕМА за ослободување на лек во дебелото црево.

За споредбена анализа е земена најрепрезентативната проба од микрочестички (Ас-10) во однос на профилот на ослободување, како проба со најбавно ослободување на лек и е компарирана со комерцијално достапни препарати. На слика 3-24 се прикажани компаративните профили на растворливост во медиум рН 6,8.



Слика 3-24. Компаративни профили на ослободен ацетаминофен во медиум рН 6,8

Се тестираа таблети со конвенционално ослободување, филм-обложени таблети и двослојни таблети со продолжено ослободување. Од добиените криви на ослободен лек, може да се заклучи дека пробата (Ac-10) покажува контролирано ослободување во однос на комерцијално достапниот препарат со конвенционално ослободување. Овој наод ја потврдува основната цел на овој докторски труд. Во продолжение на истражувањето, се направи споредба со комерцијално достапните двослојни таблети и филм-обложени таблети со продолжено ослободување. Може да се забележи дека евалуираната проба Ac-10 има побрз профил на ослободување во однос на двослојните таблети со продолжено ослободување, а сличен профил со филм-обложените таблети. Наодот укажува дека во следната истражувачка фаза е потребна оптимизација на формулациските променливи, со цел да се постигне дополнително побавен профил на ослободување. На четвртиот час, трите истражувани системи со контролирано ослободување достигнуваат слична крајна точка на ослободен лек.

Кинетичката студија за ослободениот лек преку *in vitro* карактеризација се направи со линеарно фитување со математички модели, кои се најчесто користени во фармацевтската аналитика на лекови. Различните истражувани кинетички модели се евалуираа преку највисоката вредност на R^2 , така што се определи најсоодветниот математички модел, кој ја следи кинетиката и механизмот на ослободување на лекот. Статистичките параметри од регресионата анализа за кинетичката студија се сумирани во Табела 3.15.

Табела 3.15. Параметри од регресиона анализа за евалуација на податоци од ослободен лек

Проби	Нулти ред		Прв ред		Модел на Higuchi		Модел на Hixson-Crowell	
	D	R^2	K	R^2	K_H	R^2	K_{HC}	R^2
Ac-12	0,0006	0,247	$-2 \cdot 10^{-6}$	0,247	0,012	0,397	$-9 \cdot 10^{-6}$	0,247
Ac-21	0,377	0,614	0,0028	0,606	7,03	0,730	0,008	0,609
Ac-19	0,0016	0,444	$-7 \cdot 10^{-6}$	0,444	0,033	0,627	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,444
Ac-11	0,0002	0,275	$-7 \cdot 10^{-7}$	0,275	0,0034	0,453	$-2 \cdot 10^{-6}$	0,275
Ac-18	0,0004	0,731	$-2 \cdot 10^{-6}$	0,731	0,039	0,913	$-6 \cdot 10^{-6}$	0,731
Ac-10	0,0017	0,539	$-7 \cdot 10^{-6}$	0,539	0,034	0,732	$-3 \cdot 10^{-5}$	0,539
Ac-15	0,001	0,428	$-4 \cdot 10^{-6}$	0,428	0,021	0,617	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,428
Ac-16	10^{-6}	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,004	0,181	0,003	0,696	0,010	0,181
Ac-14	0,0014	0,470	$-6 \cdot 10^{-6}$	0,470	0,028	0,664	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,470
Ac-20	0,0015	0,466	$-7 \cdot 10^{-6}$	0,467	0,030	0,659	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,466
Ac-17	0,001	0,289	$-5 \cdot 10^{-6}$	0,286	0,027	0,459	$-2 \cdot 10^{-5}$	0,286

Евалуацијата на кинетика на ослободување покажа дека ослободувањето на ацетаминофен од микрочестичките го следи моделот на Higuchi. Се согледа дека со зголемување на брзината на мешање се постигнува подобра компатабилност со $Q\sqrt{t}$ кинетиката при сооднос на API:полимер=1:4. Теоретски беше очекувано дека добиените микрочестички ќе бидат компатабилни со $Q\sqrt{t}$ кинетиката, бидејќи станува збор за матрикс-структура (Bruschi, 2015). Оваа компатабилност е индикатор дека матрикс-структурата на микрочестичната форма е постигната во споредба со дозирана форма со контролирано ослободување преку растворливост. Добиеените наоди се конзистентни со

други истражувања (Jelvehgarı & Montazam, 2012; Bruschi, 2015; Patel & Patel, 2014; Przybyslawska, Amelian, & Winnicka, 2013; Özdemir & Tilkan, 2017).

За да се разбере механизмот на ослободување на лек, податоците од кумулативното ослободување на лек се фитувани со равенката на Korsmeyer-Peppas и Weibull. Статистичките параметри од регресионата анализа за кинетичката студија се сумирани во Табела 3.16.

Табела 3.16. Параметри од регресиона анализа за евалуација на податоци од ослободен лек за определување на механизам на ослободен лек

Проби	Weibull		Korsmeyer-Peppas 60%	
	b	R²	n	R²
Ac-12	0.089	0.611	0.22	0.870
Ac-21	2.471	0.779	0.46	0.996
Ac-19	0.187	0.773	0.22	0.613
Ac-11	0.021	0.678	0.04	0.901
Ac-18	0.039	0.913	0.04	0.791
Ac-10	0.272	0.879	0.43	0.997
Ac-15	0.153	0.805	0.30	0.985
Ac-16	0.015	0.638	0.02	0.941
Ac-14	0.194	0.846	0.33	0.999
Ac-20	0.175	0.832	0.36	1.0
Ac-17	0.185	0.672	0.56	1.0

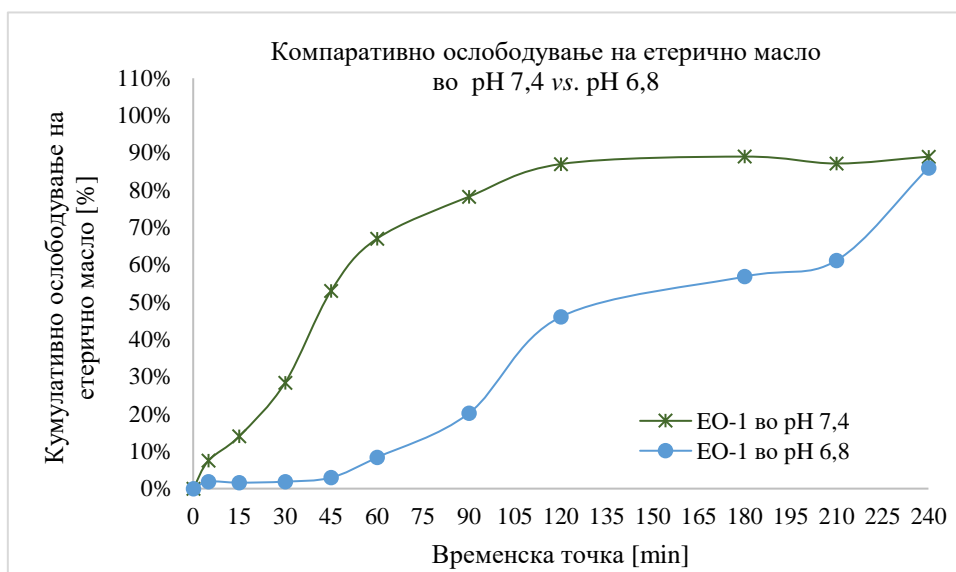
Според експонентот **n** од равенката на Korsmeyer-Peppas при 60 %, може да се заклучи дека истиот го исполнува условот $n < 0,43$ во најголем број случаи, со исклучок на пробите Ac-21 и Ac-17, кадешто е задоволен условот $0,43 < n < 0,85$. Оттука може да се заклучи дека механизмот на ослободување на лекот е контролиран преку Фикова дифузија. Од друга страна, аномален транспорт (дифузија и релаксација, ерозија) е согледан за пробите Ac-21 и Ac-17.

Коефициентот **b** во моделот на Weibull го опишува обликот на кривата на ослободување како експоненцијална ($b=1$), сигмодова или S-облик со нагорен тренд и точка на пресврт ($b>1$), или параболична со повисок иницијален нагиб и потоа конзистентен тек како експоненцијална функција ($b<1$) (D'Souza, Faraj, & DeLuca, 2005). Следејќи ја теоријата, Фиковата дифузија би била присутна, ако $b \leq 0,75$, аномален транспорт (Фикова дифузија и бабрење, односно супер II транспорт) при $0,75 < b < 1$ и тип II на транспорт $b > 1$, што е комбинација на феномените: дифузија, ерозија и бабрење (Papadopoulou, Kosmidis, Vlachou, & Macheras, 2006; Carbinatto, de Castro, Evangelista, & Cury, 2014). Оваа анализа, поткрепена и со параметарот **n** од Korsmeyer-Peppas го тестира влијанието на Фикова дифузија врз ослободување на лекот од микрочестички.

Определувањето на ослободено етерично масло се изведе со калибрациона крива прикажана на слика 3-18, којашто се примени за рН 7,4, рН 6,8 и рН 1,2, соодветно.

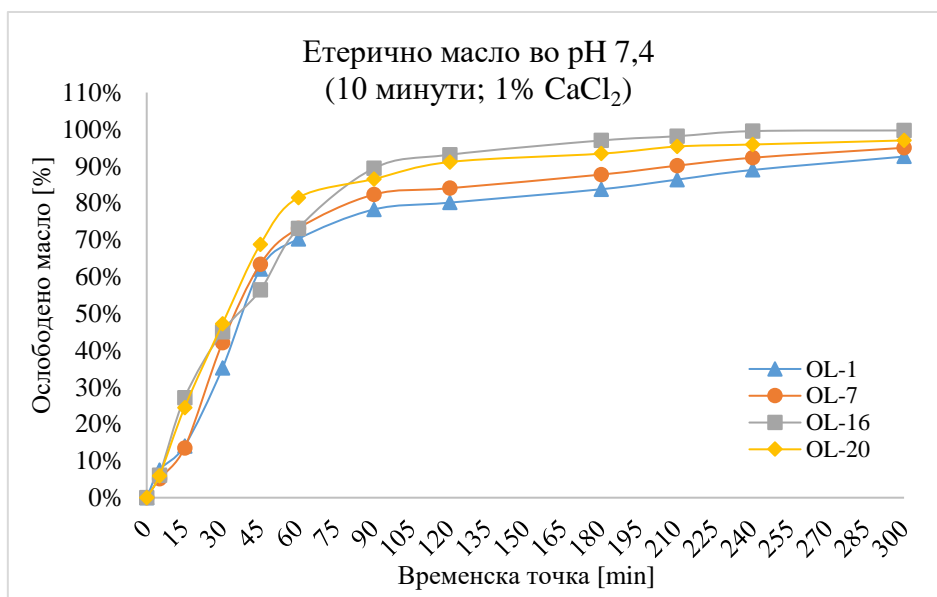
Земајќи предвид дека во препорачаниот фармакопејски медиум рН 6,8 се забележа побавен профил на ослободување (слика 3-25.), којшто се должи на рН-ограничената расторливост на натриум алгинатот и истиот не е во сообразност со барањата за

фармацевтски форми со контролирано ослободување. Оттука за понатамошно евалуирање на растворливоста на микрокапсулите се избра медиум рН 7,4 во смеса со 96 % етанол (9:1, v/v).

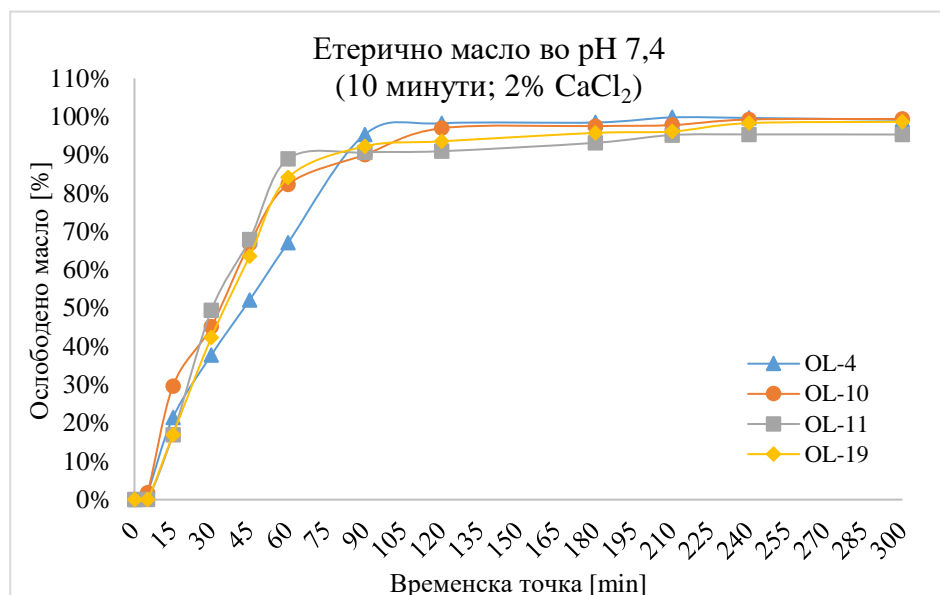


Слика 3-25. Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиуми рН 6,8 и рН 7,4

In vitro студиите на растворливост се направија на микрокапсулите со цел да се согледаат разликите во профилот на ослободување и можните процесно-формулациски фактори кои влијаат на истото. На графиконите во продолжение, од слика 3-26 до слика 3-31 се прикажаните кривите на растворливост на микрокапсулите, групирани според времето на вмрежување и концентрација на средството за вмрежување.



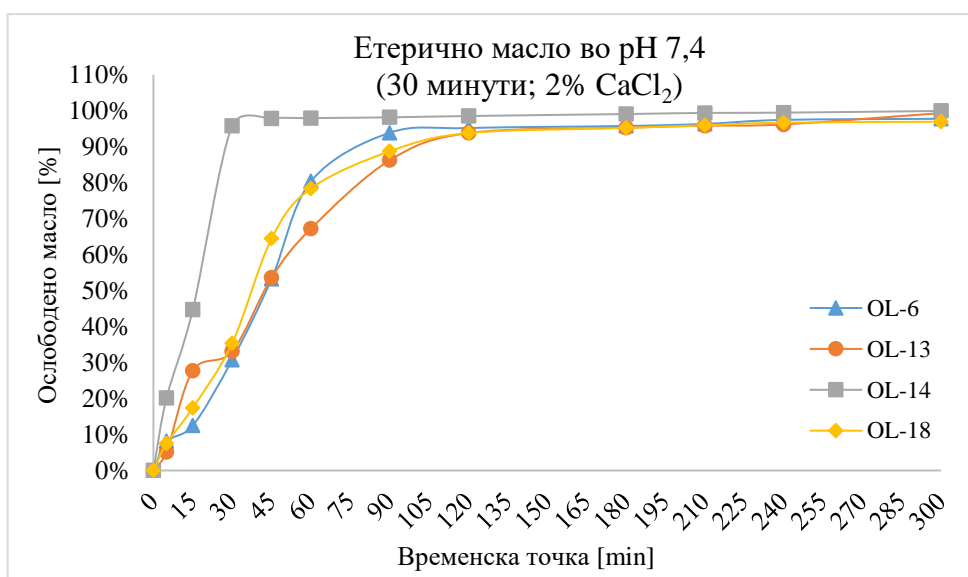
Слика 3-26 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум рН 7,4 (време на вмрежување 10 минути; концентрација на средство за вмрежување 1 %)



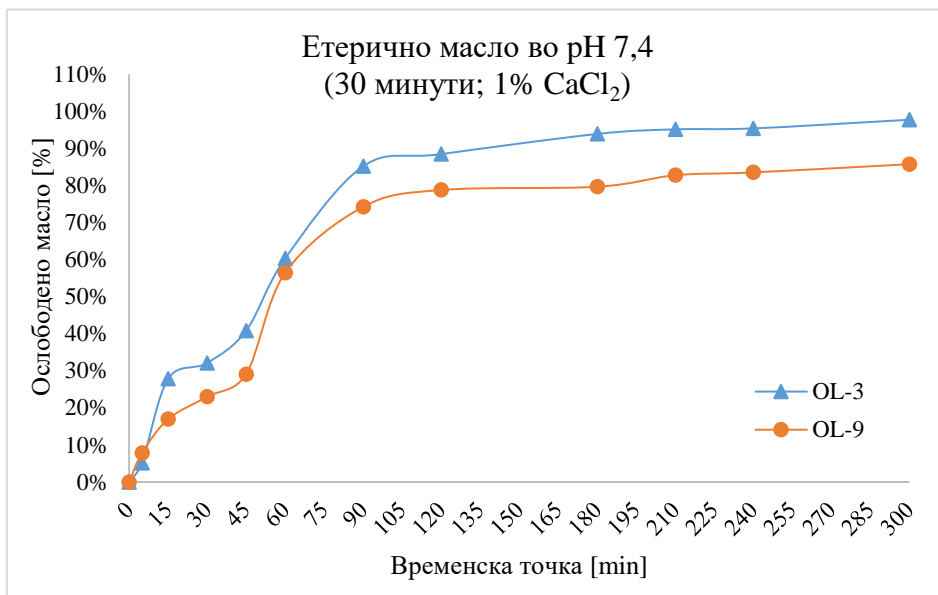
Слика 3-27 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум pH 7,4 (време на вмрежување 10 минути; концентрација на средство за вмрежување 2 %)

Од профилите на ослободување на етерично масло може да се согледаат две фази: иницијална растечка фаза (нагло ослободување) и втора фаза постигнување на плато-ефект. Иницијалното нагло ослободување на петта минута е генерално забележливо кај речиси сите проби. Заклучок е дека повисоко ослободување на петта минута има кај пробите со повисока концентрација на средството за вмрежување (CaCl₂).

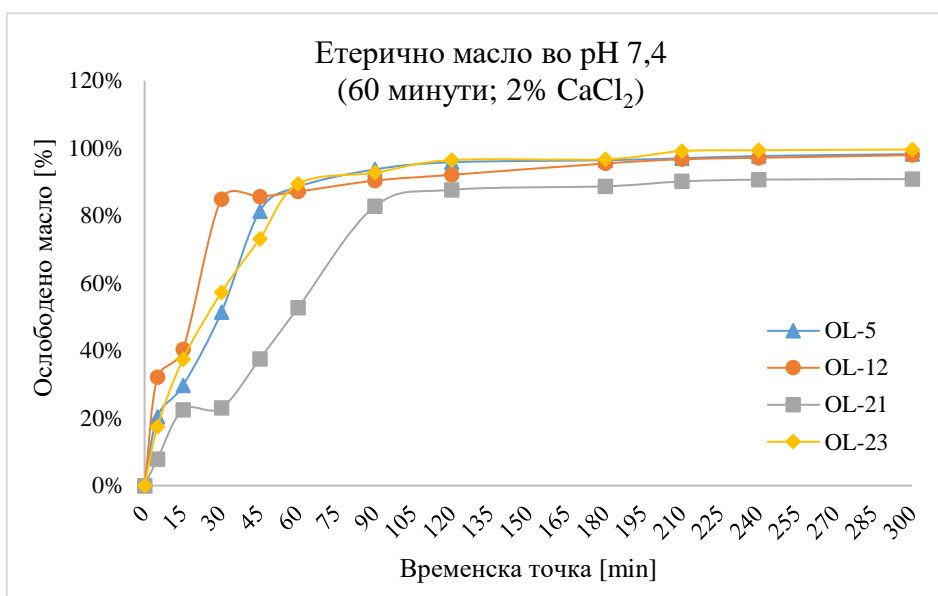
Во однос на останатите независни променливи не може да се изведе целосно јасен заклучок за значајно влијание. Иницијалното нагло ослободување е корелирано со молекулите на етерично масло на површината на микросфери или близу самата површина. Волуменот на експанзија (индекс на бабрење) на полимерот има суштинска улога во иницијалното нагло ослободување на етерично масло од алгинатската матрица (Beirão-da-Costa, et al., 2013) во неутрална до слабо-алкална средина.



Слика 3-28 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум pH 7,4 (време на вмрежување 30 минути; концентрација на средство за вмрежување 2 %)



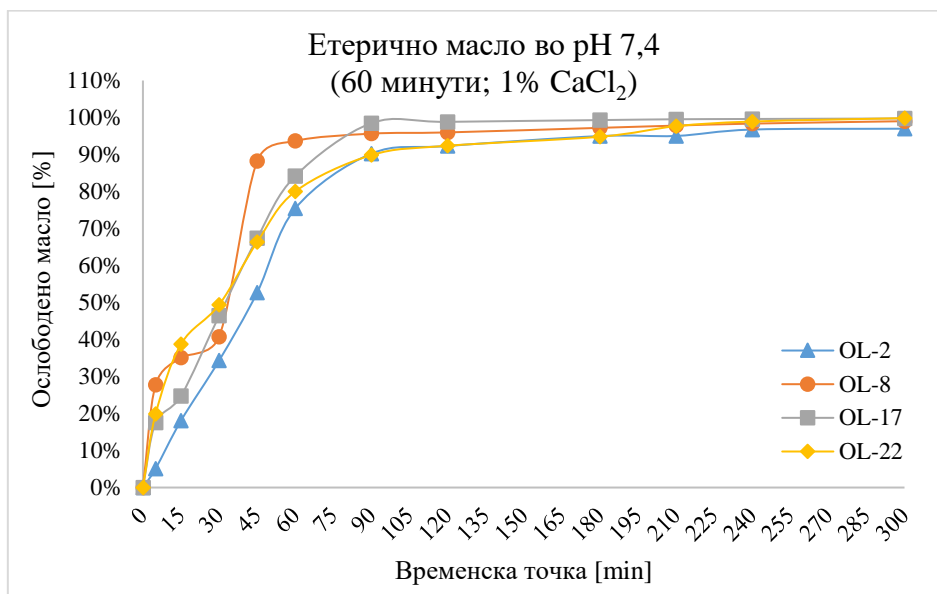
Слика 3-29 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум рН 7,4 (време на вмрежување 30 минути; концентрација на средство за вмрежување 1 %)



Слика 3-30 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум рН 7,4 (време на вмрежување 60 минути; концентрација на средство за вмрежување 2 %)

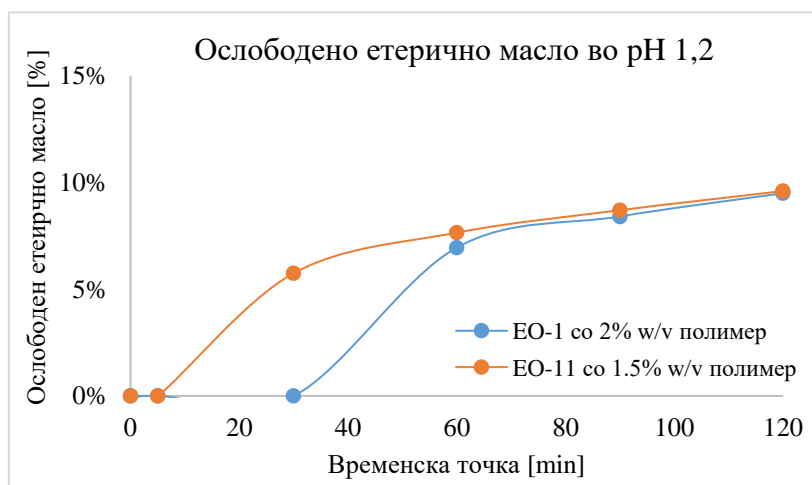
Од друга страна, бавното ослободување на етеричното масло во втората фаза може да се должи на дифузијата на енкапсулираното етерично масло во алгинатските микрокапсули со тек на време (Hosseini, Zandi, Rezaei, & Farahmandghavi, 2013). Од кумулативните криви на ослободено етерично масло може да се согледа дека побавен профил на ослободување генерално е присутен кај микрокапсулите добиени при повисока концентрација на средството за вмрежување CaCl₂. Исто така, побавен профил се согледа кај пробите кои се добиени со пократко време на вмрежување (10 минути) во однос на пробите добиени со најдолго време на вмрежување (60 минути). Побрз профил на ослободување се забележа кај пробите со повисок удел на етерично масло, односно помал удел на натриум алгинат. Овој наод не е во согласност со истражувањето на

Hosseini и соработниците (2013). Во други релевантни публикации е објавено дека феноменот на бавно ослободување на етерично масло може да се поврзе со формирање на дебел гел-слој по хидратација на биополимерот во медиумот за растворливост, поради неговата висока молекуларна маса (Subedi, Shrestha, & Shakya, 2016). Овој слој делува како бариера, што предизвикува модификувано ослободување на етерично масло од микрокапсулите. Дополнително, зголемување на M_w на полимерот доведува до намалување на вкупната порозност, што ја отежнува дифузијата на биоактивната енкапсулирана супстанца надвор од матрицата и придонесува до продолжено ослободување.



Слика 3-31 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум pH 7,4 (време на вмрежување 60 минути; концентрација на средство за вмрежување 1 %)

Во медиумот за растворливост pH 1,2 во смеса со 96 % етанол (9:1, v/v), прикажано на слика 3-32 не се забележа бабрење на алгинатските микрокапсули, што резултираше со ниско ослободување на етерично масло.



Слика 3-32 Компаративни профили на ослободено етерично масло од микрокапсули во медиум pH 1,2

Придонес кон овој феномен има ограничената растворливост на натриум алгинат во кисела средина. Овој наод е во согласност со барањата на ЕМА за ослободување на лек во дебело црево.

Кинетичката студија (табела 3.17 и 3.18) за ослободено етерично масло преку *in vitro* карактеризација се направи со линеарно фитување со математички модели, кои се најчесто користени во фармацевтска аналитика на лекови. Различните истражувани кинетички модели се евалуираа преку највисоката вредност на R^2 , така што се определи најсоодветниот математички модел, кој ја следи кинетиката и механизмот на ослободување.

Табела 3.17. Параметри од регресиона анализа за евалуација на податоци од ослободено етерично масло

Проби	Нулти ред		Прв ред		Модел на Higuchi		Модел на Hixson-Crowell	
	D	R ²	K	R ²	K _H	R ²	K _{HC}	R ²
OL-1	0,002	0,503	-10 ⁻⁵	0,503	0,053	0,672	-4·10 ⁻⁵	0,503
OL-2	0,003	0,535	-10 ⁻⁵	0,535	0,062	0,713	-4·10 ⁻⁵	0,535
OL-3	0,003	0,640	-10 ⁻⁵	0,640	0,057	0,801	-4·10 ⁻⁵	0,640
OL-4	0,003	0,580	-10 ⁻⁵	0,558	0,065	0,758	-4·10 ⁻⁵	0,580
OL-5	0,003	0,578	-10 ⁻⁵	0,579	0,061	0,757	-4·10 ⁻⁵	0,579
OL-6	0,003	0,518	-10 ⁻⁵	0,518	0,072	0,697	-5·10 ⁻⁵	0,518
OL-7	0,003	0,484	-10 ⁻⁵	0,484	0,061	0,644	-4·10 ⁻⁵	0,484
OL-8	0,003	0,576	-10 ⁻⁵	0,576	0,061	0,737	-4·10 ⁻⁵	0,576
OL-9	0,002	0,360	-8·10 ⁻⁶	0,360	0,043	0,520	-3·10 ⁻⁵	0,360
OL-10	0,003	0,696	-10 ⁻⁵	0,697	0,071	0,858	-5·10 ⁻⁵	0,697
OL-11	0,002	0,399	-10 ⁻⁵	0,399	0,060	0,593	-4·10 ⁻⁵	0,399
OL-12	0,002	0,642	-10 ⁻⁵	0,643	0,054	0,790	-4·10 ⁻⁵	0,642
OL-13	0,003	0,611	-10 ⁻⁵	0,612	0,058	0,787	-4·10 ⁻⁵	0,612
OL-14	0,002	0,284	-7·10 ⁻⁶	0,284	0,041	0,466	-3·10 ⁻⁵	0,284
OL-15	0,004	0,747	-2·10 ⁻⁵	0,747	0,085	0,851	-6·10 ⁻⁵	0,747
OL-16	0,003	0,683	-10 ⁻⁵	0,684	0,061	0,850	-4·10 ⁻⁵	0,684
OL-17	0,003	0,595	-10 ⁻⁵	0,595	0,056	0,772	-4·10 ⁻⁵	0,595
OL-18	0,003	0,624	-10 ⁻⁵	0,625	0,061	0,797	-4·10 ⁻⁵	0,625
OL-19	0,003	0,591	-10 ⁻⁵	0,592	0,063	0,772	-4·10 ⁻⁵	0,592
OL-20	0,003	0,603	-10 ⁻⁵	0,603	0,056	0,783	-4·10 ⁻⁵	0,603
OL-21	0,003	0,731	-10 ⁻⁵	0,731	0,062	0,864	-4·10 ⁻⁵	0,731
OL-22	0,002	0,674	-10 ⁻⁵	0,675	0,051	0,842	-4·10 ⁻⁵	0,675
OL-23	0,002	0,576	-9·10 ⁻⁶	0,577	0,050	0,761	-3·10 ⁻⁵	0,577

Евалуацијата на кинетиката на ослободување покажа дека ослободувањето на етерично масло од микрокапсулите го следи моделот на Higuchi, исто како со системот на микрочестички. Генерално може да се заклучи дека подобра компатабилност со $Q\sqrt{t}$ кинетиката се постигнува при повисок удел на натриум алгинат. Теоретски беше очекувано дека добиените микрокапсули ќе бидат компатабилни со $Q\sqrt{t}$ кинетиката, бидејќи станува збор за матрикс-структура (Bruschi, 2015). Во истражувањето на Faidi и соработниците (2019) се применети истите кинетички модели и моделот на Higuchi

покажал најдобро фитување, покрај моделите на Weibull и Korsmeyer-Perppas. Во други истражувања, најчесто е истражувана кинетиката во насока на применливост на микрокапсулите во функционализација на медицински текстил. За таа цел е неретко користена модел равенката на Ritger-Perppas, а се применуваат и други аналитички постапки за евалуација на ослободување на етерично масло од полимерната матрица.

Ослободувањето на енкапсулирана супстанца (лек или биоактивна супстанца) низ бабречки биополимер е комплексен феномен, којшто може да биде Фикова дифузија, ерозија и/или деградација, или комбинација на овие механизми. Експонентот на ослободување (n) од моделот на Korsmeyer-Perppas корелира со механизмот на ослободување.

Табела 3.18. Параметри од регресиона анализа за евалуација на податоци од ослободен лек за определување на механизам на ослободен лек

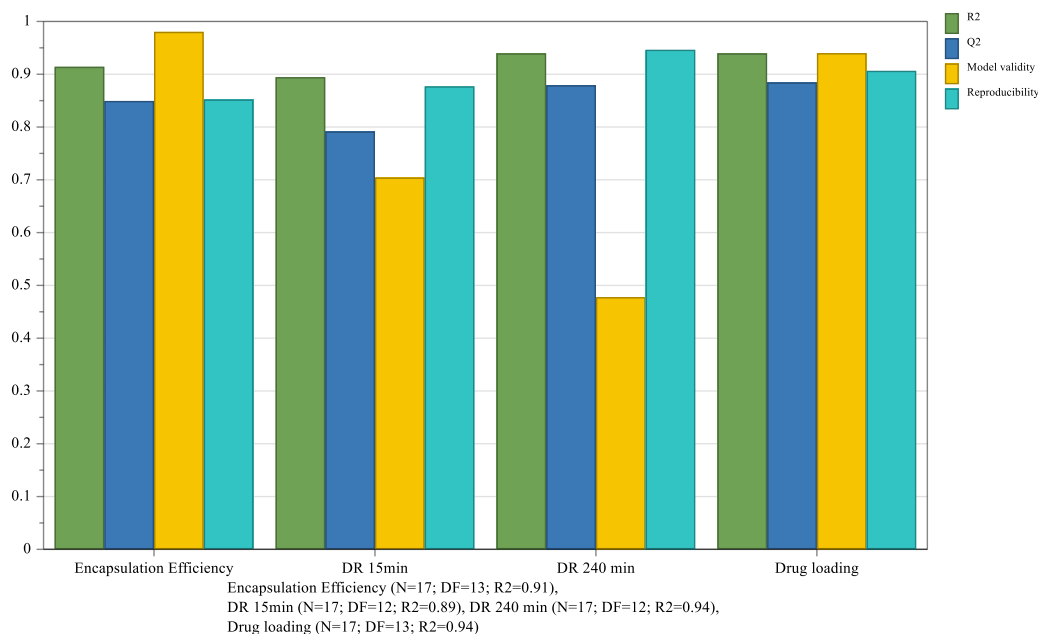
Проби	Модел на Weibull		Модел на Korsmeyer-Perppas 60 %	
	b	R ²	n	R ²
OL-1	0,626	0,827	1,65	0,973
OL-2	0,699	0,865	2,01	0,998
OL-3	0,648	0,870	1,83	0,911
OL-4	0,851	0,815	1,49	0,932
OL-5	0,445	0,885	1,06	0,945
OL-6	0,727	0,722	3,09	0,993
OL-7	0,596	0,811	1,43	0,668
OL-8	0,431	0,794	1,01	0,543
OL-9	0,568	0,824	1,62	0,937
OL-10	0,848	0,787	2,73	0,912
OL-11	0,476	0,649	2,21	0,957
OL-12	0,349	0,816	0,90	0,740
OL-13	0,649	0,855	1,94	0,934
OL-14	0,353	0,703	1,23	0,972
OL-15	0,840	0,943	1,86	0,977
OL-16	0,623	0,869	1,87	0,968
OL-17	0,461	0,887	1,15	0,915
OL-18	0,633	0,883	1,83	0,982
OL-19	0,504	0,764	2,19	0,996
OL-20	0,620	0,833	2,03	0,994
OL-21	0,620	0,932	1,57	0,941
OL-22	0,388	0,923	1,05	0,982
OL-23	0,406	0,870	1,22	0,999

Во сите истражувани проби, n -вредностите се над 0,85 што укажува на супер-случај II на транспорт, односно ослободување на етерично масло од матрицата се одвива по пат на бабрење, макромолекуларна релаксација на полимерните вериги и ерозија на биополимерот. b -коефициентите се доминантно помали од 0,75, со исклучок на три проби, што укажува дека механизмот на ослободувањето на етеричното масло од биополимерот, доминантно, е според Фикова дифузија. Кај трите проби, преносот на лекот е комбиниран Фикова дифузија и бабрење (супер II транспорт). Сепак, механизмите на ерозија/деградација може да допринесат кон ослободување на

етеричното масло од микрокапсулите. Феномените на ерозија/деградација, од Faidi и соработниците (2019) се објаснети дека може да се должат на отстранувањето на Ca^{2+} од микросферите, како последица на навлегување на медиумот за растворливост и по пат на хелирање на медиумот за растворливост, поради фосфатните анјони, кои придонесуваат кон дисторзија на матрицата. Бабречкиот биополимер ја зголемува порозноста на микросферите, а последователно и фаворизирање на феномените на дифузија и ерозија. Слично објаснување е публикувано од Al-Kassas и соработниците (2007). Бабрењето на полимерната матрица е индуцирано од зголемен осмотски притисок во самиот гел, што е последица од размена на Ca^{2+} преку електростатски сили помеѓу различни карбоксилатни единици на алгинатската верига со Na^+ (Al-Kassas, Al-Gohary, & Al-Faadhel, 2007). Во истражувањето на Hosseini и соработниците (2013) феноменот на пренос на етерично масло од каранфилче било по пат на Фикова дифузија.

3.5 Оптимизација на процес за добивање микрочестички

Оптимизирањето на процесот за добивање на микрочестички е направено со неконвенционален пристап преку интегрирање на формулациски и процесни променливи во една дизајн матрица (табела 2.3). За да се предвиди варијабилност помеѓу добиените резултати од зависните променливи врз основа на менување на независните променливи, и да се утврди зависноста помеѓу зависните и две, или повеќе независни променливи, се направи фитување на резултатите со MLR. Резиме од фитувањето е прикажано на графиконот на слика 3-33.



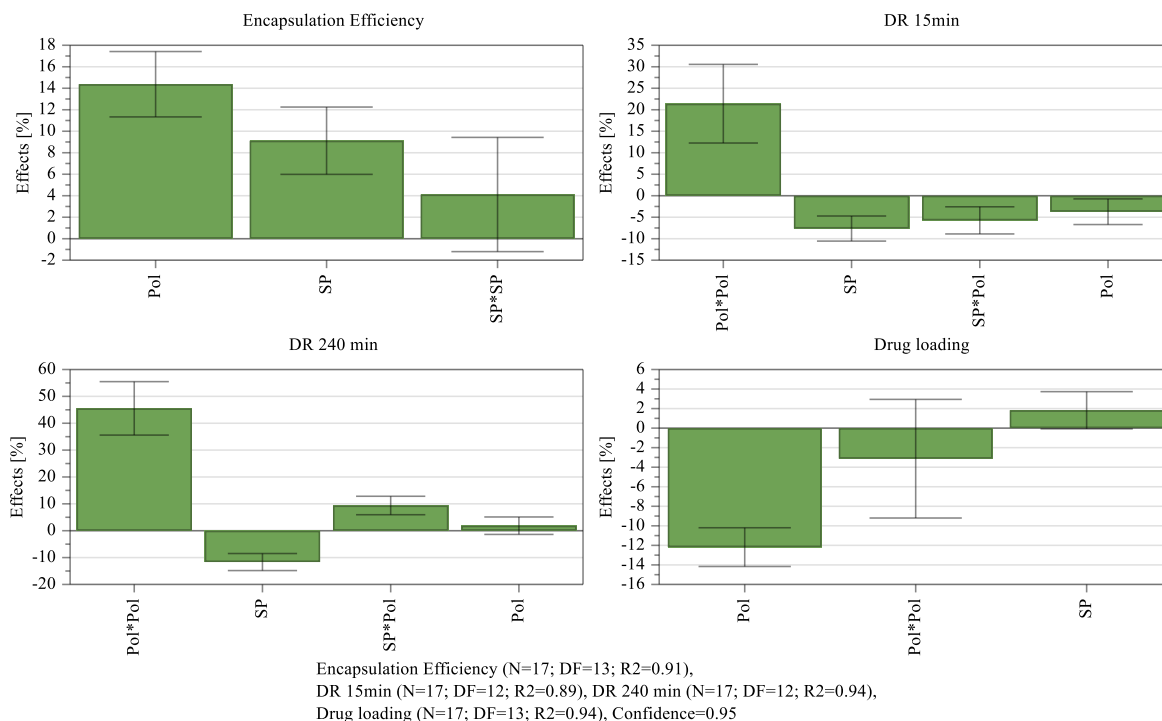
Слика 3-33. Резиме од фитувањето за микрочестички

Графиконот прикажува сумарна статистика за четири статистички параметри: R^2 , Q^2 (проценка на идни предвидувања за прецизност), валидност на модел и репродуцибилност. Факторот на корелација (R^2) и факторот на идни предвидувања (Q^2) треба да имаат високи вредности, а разликата помеѓу нив не треба да биде повисока од

0,2-0,3, додека повисока разлика би укажала на несоодветно избран модел. Избраните линеарни модели покажуваат добар квалитет, со вредности повисоки од 0,9, со исклучок на зависната променлива ослободен лек на 15 минута, којшто има вредност 0,89 и вредности за Q^2 коишто се во опсег 0,84-0,88, со исклучок вредноста 0,79 којашто е асоцирана со зависната променлива ослободен лек на 15 минута. Ниту еден од моделите нема вредност пониска од 0,25 за параметарот валидноста на моделот, што укажува дека моделот е валиден. Незначајно пониска вредност во однос на другите, од 0,48, е добиено за одговорот ослободен лек во 240 минута, но сепак е валиден модел. Вредностите на параметарот репродукцибилност се во опсег 0,85-0,95. Генерално, вредностите на репродукцибилност пониска од 0,5 укажува на лоша или несоодветна експериментална контрола и голема чиста грешка.

Со докажаната моќ за предвидување, на веќе развиена и оптимизирана формулација, може да се проценува влијанието на евалуираните два параметри врз критични атрибути на квалитет. Промената во уделот на полимер може да влијае врз степенот на ефикасност на енкапсулација, деградационите продукти и профилот на контролирано ослободување на лекот. Брзината на мешање во тек на оцврстување на микрочестичките може да влијае врз распределбата на големината на честичките и последователно на профилот на ослободување на лекот.

Во продолжение на сумарниот заклучок од фитувањето, се евалуираше ефектот на независните променливи и интеркацијата помеѓу независните променливи врз секоја зависна променлива преку графикон на ефекти (слика 3-34.) и графикон на главни ефекти (слика 3-35. и 3-36).



Слика 3-34. Графикон на ефекти за микрочестички

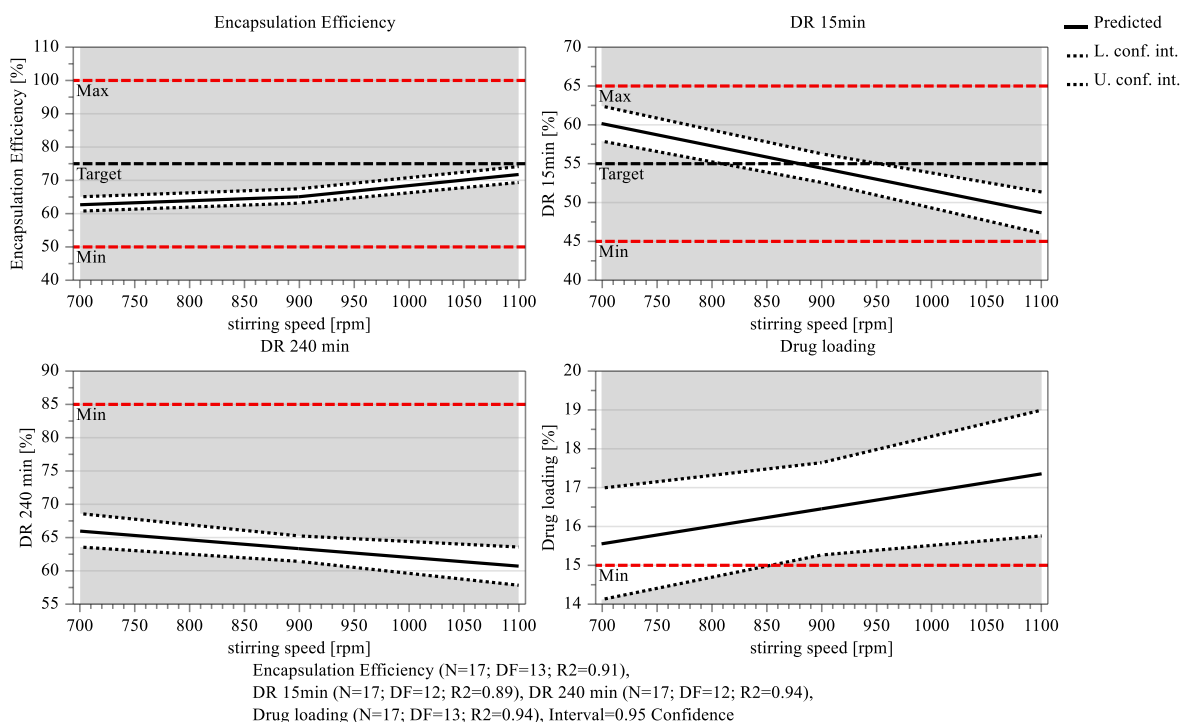
Ефикасноста на енкапсулација е пропорционално зависна од уделот на полимерот и брзината на мешање на емулзијата во тек на оцврстување, како и од

бинарниот единечен фактор на брзината на мешање. Со зголемување на брзината на мешање на емулзијата во тек на испарување на растворувачот се овозможува побрзо оцврстување на микрочестички, така што дифундирањето на растворената АРІ кон течниот парафин се редуцира. Зголемениот удел на полимер овозможува енкапсулирање на повисок процент на АРІ во матриксот.

Од друга страна, за енкапсулирана биоактивна компонента може да се утврди обратнопропорционална зависност со уделот на полимерот и бинарниот единечен член на полимер, а правопрпорционална со брзината на мешање. Брзината на мешање го зголемува капацитетот на енкапсулирање на биоактивна компонента во полимерниот матрикс, што може да се должи на турбулентното мешање кое влијае на подобрување на физичката интеркација лек-полимер.

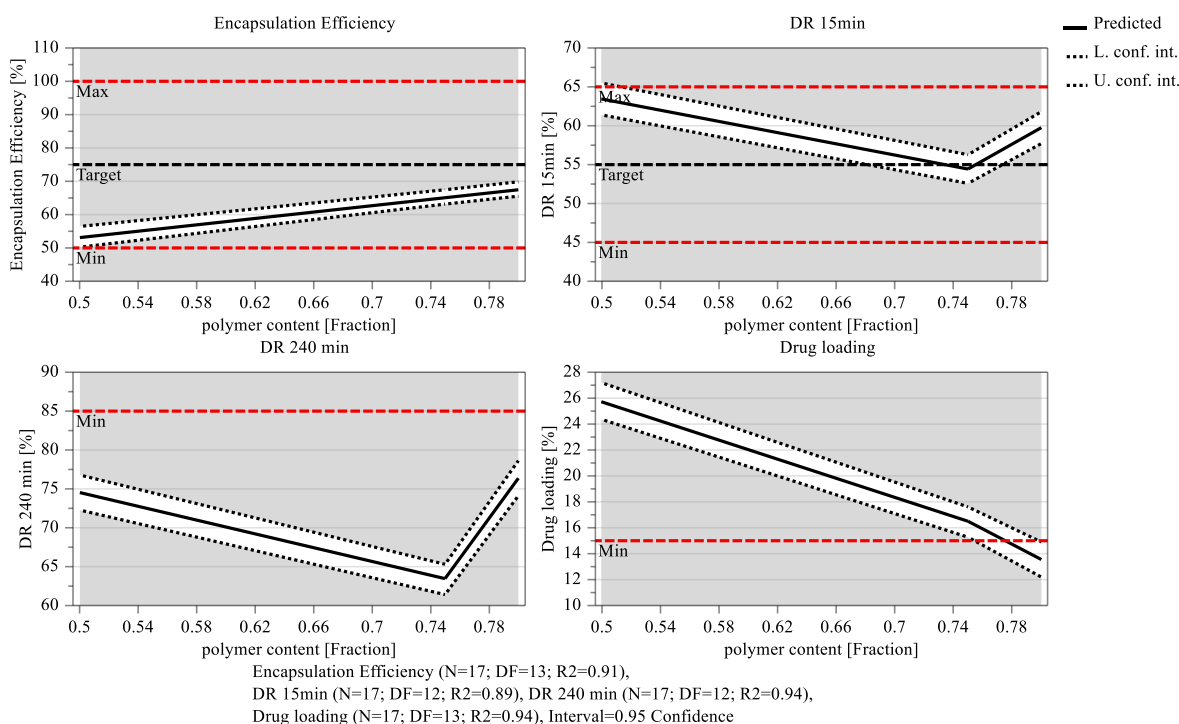
Во однос на ослободен лек на 15 и 240 минута, правопрпорционална зависност е утврдена со бинарниот единечен член на удел на полимер, којашто е и статистички значајна. Познато е дека полимерниот матрикс го контролира профилот на ослободување, односно поголем удел на полимер го забавува ослободувањето на лекот. Влијанието на брзина на мешање на емулзијата го забрзува ослободувањето на енкапсулираната биоактивна компонента и е статистички незначајна. Од ефектот на бинарниот единечен член на удел на полимер може да се утврди дека го забрзува ослободувањето на енкапсулираната биоактивна компонента на 15 минута во однос на ослободена биоактивна компонента на четвртиот час.

Во добиениот модел, главните ефекти на брзина на мешање во тек на оцврстување на микрочестички и удел на полимер врз истражуваните зависни променливи се прикажани на слика 3-35. и 3-36. Предвидените вредности се претставени со полна црна линија, додека долен и горен лимит на интервал на доверба се претставени со испрекинати линии.



Слика 3-35. Графикон на главни ефекти за брзина на мешање во тек на оцврстување на микрочестички

Со менување на брзината на мешање на емулзијата во тек на оцврстување на микрочестичките и уделот на полимерот во истражуваниот опсег, истражуваните зависни променливи остануваат во рамките на критериумот на прифатливост. Исклучок е зависната променлива ослободен лек на 240 минути, којашто е под критериумот на прифатливост. Брзината на мешање има значајна улога во контролирање на ефикасноста на енкапсулација и при нејзино менување во истражуваниот опсег (700-1100 rpm), додека уделот на полимерот е оптимален, тогаш ефикасноста на енкапсулација е во очекуваниот ранг, но е под целната вредност. Ослободувањето на енкапсулираниот ацетаминофен на четвртиот час е под посакуваниот критериум на прифатливост, укажувајќи на понатамошна оптимизација на формулацијата.

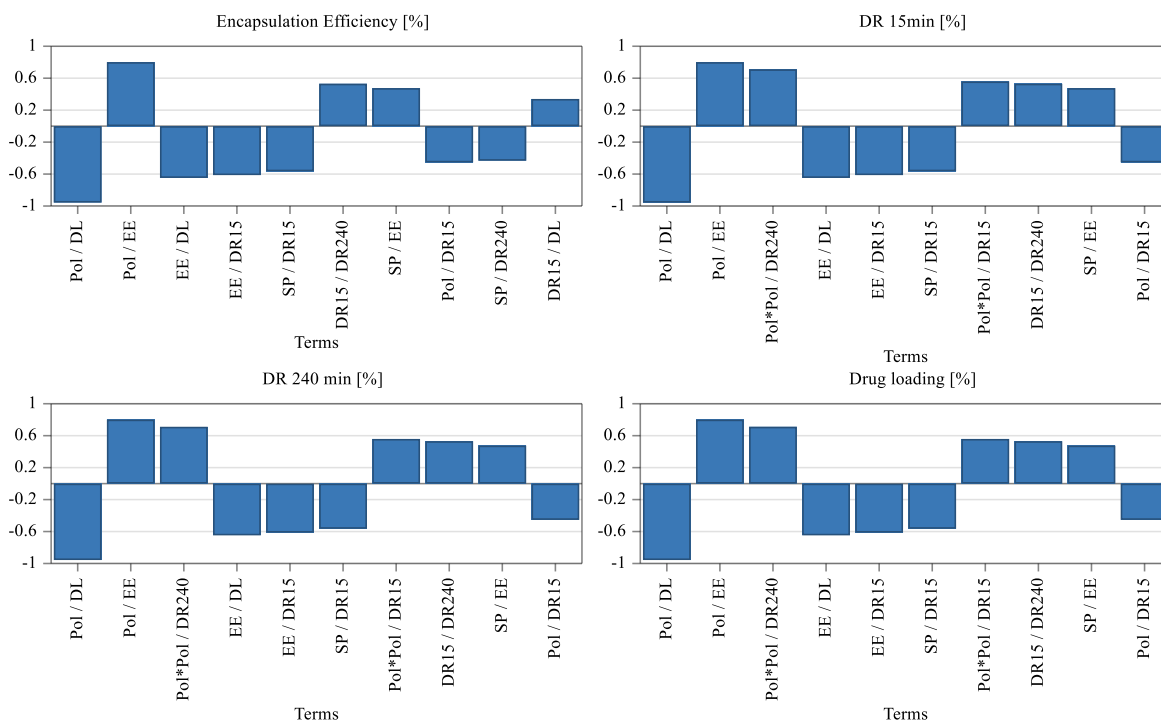


Слика 3-36. Графикон на главни ефекти за удел на полимер за микрочестички

Уделот на полимерот, исто така, има значајно влијание врз зависните променливи. Со менување на неговиот удел во формулацијата во истражуваниот ранг (0,5-0,8 w/w) при оптимална брзина на мешање, сите истражувани зависни променливи се во граници на прифатливост, освен ослободена биоактивна компонента на четвртиот час, којшто е под целниот минимум (85 %). Ефикасноста на енкапсулација е под целната вредност, додека енкапсулирана биоактивна супстанца при највисок удел на полимер (0,8 w/w) бележи пониска вредност од долната целна граница.

На слика 3-37. е прикажано статистичкото значење на десетте најголеми интеракции помеѓу зависните и независните променливи. Од графиконот може да се утврди дека уделот на полимер има позитивно влијание врз ефикасноста на енкапсулација, односно со зголемување на уделот на полимер во формулацијата ќе се зголемува и процентот на ефикасноста на енкапсулација. Сепак, влијанието на полимерот врз енкапсулираната биоактивна супстанца има негативно влијание. Со

зголемување на уделот на полимерот се намалува капацитет на енкапсулирање биоактивна супстанца. За постигнување на оптимални вредности за двата критични параметри потребна е дополнителна оптимизација на уделот на полимер. Со зголемување на ефикасноста на енкапсулација ќе се намалува енкапсулираната биоактивна супстанца и ослободен ацетаминофен на 15 минути. Влијанието на бинарниот единечен член на полимер врз ослободен ацетаминофен на четвртиот час и 15 минута е негативен, односно со зголемување на полимерот се забавува профилот на ослободување.



Слика 3-37. Графикон на најзначајни статистички влијанија за микрочестички

За оптимизација на процесот за микроенкапсулација на биоактивна компонента во цврста агрегатна состојба се примени методологијата на 2D одзивни површини. Со овој метод се претставува функционалната зависност помеѓу зависните и независните променливи, што се предмет на истражувањето. Добиените конечни моделни равенки за функционална зависност за добивање на оптимизационите вредности за четирите зависни променливи, согласно кои софтверот ги прави пресметките, се прикажани со моделните равенки⁵, во продолжение:

$$Y_1 = 47,9153X_1 - 0,0695 X_2 + 5,14 \cdot 10^5 X_2^2 + 50,4896$$

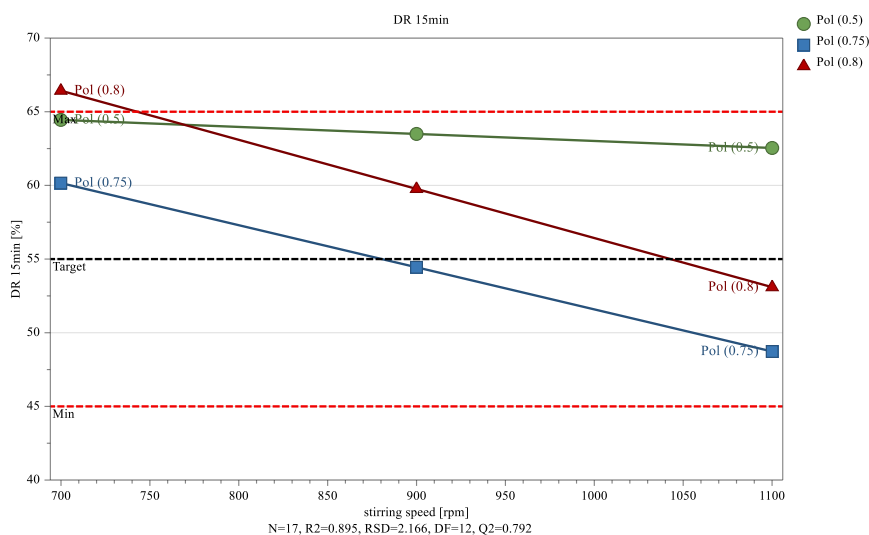
$$Y_2 = 49,7982 X_1 - 0,0046 X_2 - 69,5371 X_1^2 + 14,11$$

$$Y_3 = -544,786 X_1 + 0,0430 X_2 + 475,642 X_1^2 - 0,095 X_1 \cdot X_2 + 221,254$$

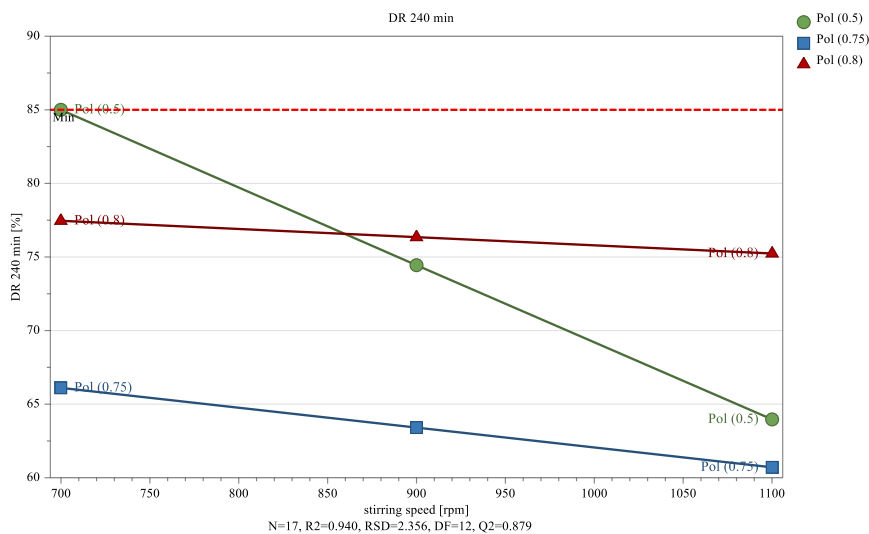
$$Y_4 = -1450,08 X_1 - 0,131 X_2 + 1011,94 X_1^2 + 0,156 X_1 \cdot X_2 + 593,897$$

⁵Y₁-ефикасност на енкапсулација; Y₂-енкапсулирана биоактивна компонента; Y₃-ослободен ацетаминофен на 15 минути; Y₄-ослободен ацетаминофен на 240 минути; X₁-удел на полимер; X₂-брзина на мешање

Уделот на полимер (X_1) покажа статистички значаен негативен ефект на растворливоста во 15 минути и четвртиот час. Зголемен удел на полимер влијае врз добивање оптимално-минимална вредност на ослободен ацетаминофен. Во однос на ефикасноста на енкапсулација, уделот на полимер покажа статистички значаен позитивен ефект, односно за постигнување оптимално-максимална вредност влијае повисок удел на полимер, којшто ќе може да енкапсулира биоактивна супстанца во полимерниот матрикс. Бинарниот единечен член на уделот на полимер покажа позитивно статистички значаен ефект, односно со моделирањето ќе се бара оптимален максимум. Брзината на мешање (X_2) покажа статистички незначајно влијание врз сите истражувани променливи. Бинарниот единечен член на брзина на мешање покажа дополнително пониско влијание врз ефикасноста на енкапсулација. Членот на интеракција на удел на полимер и брзина на мешање е статистички незначен за ослободен ацетаминофен на 15 минути и четвртиот час. Значајното влијание на уделот на полимерот е редуцирано поради изразено ниското влијанието на брзината на мешање на емулзијата во тек на испарување на растворувачот.



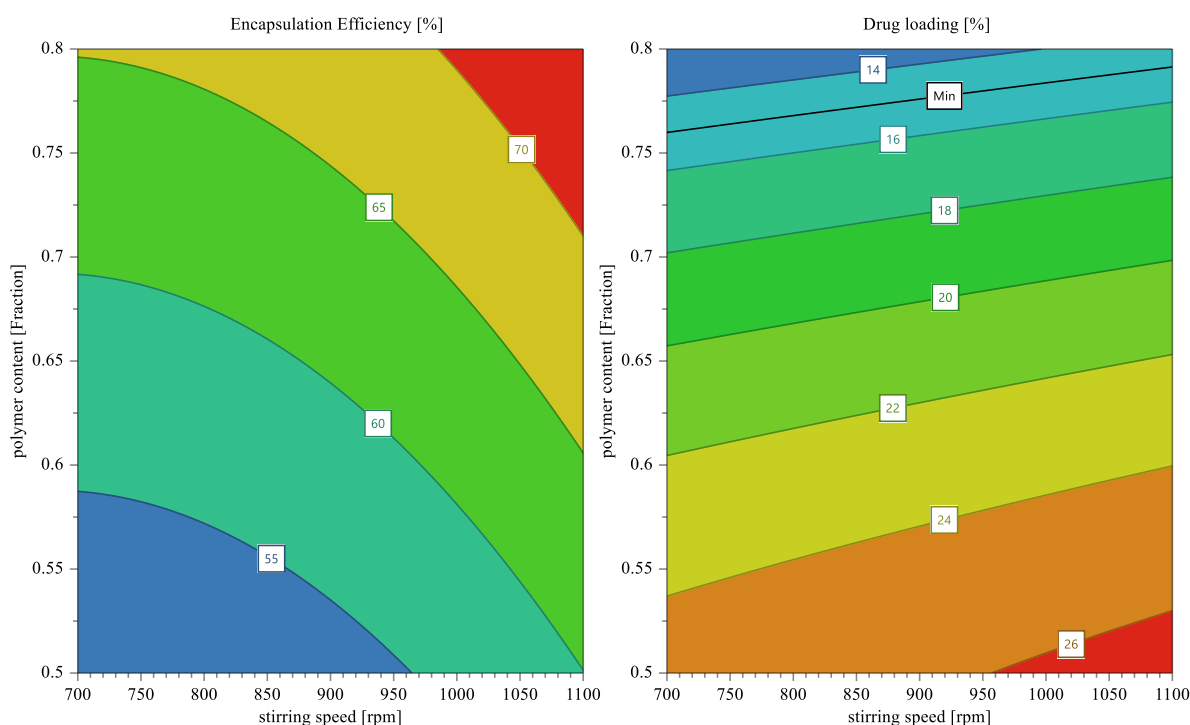
Слика 3-38. Графикон на интеракции за ослободен ацетаминофен на 15 минути за микрочестички



Слика 3-39. Графикон на интеракции за ослободен ацетаминофен на 240 минути за микрочестички

Графички приказ на влијанието на членовите на интеракции (слика 3-38) покажува дека со зголемување на брзината од 700 кон 1100 rpm, најбавно ослободување на 15 минута покажува средниот удел на полимер (0,75 w/w). Истиот тренд е забележлив и за зависната променлива 240 минута (слика 3-39).

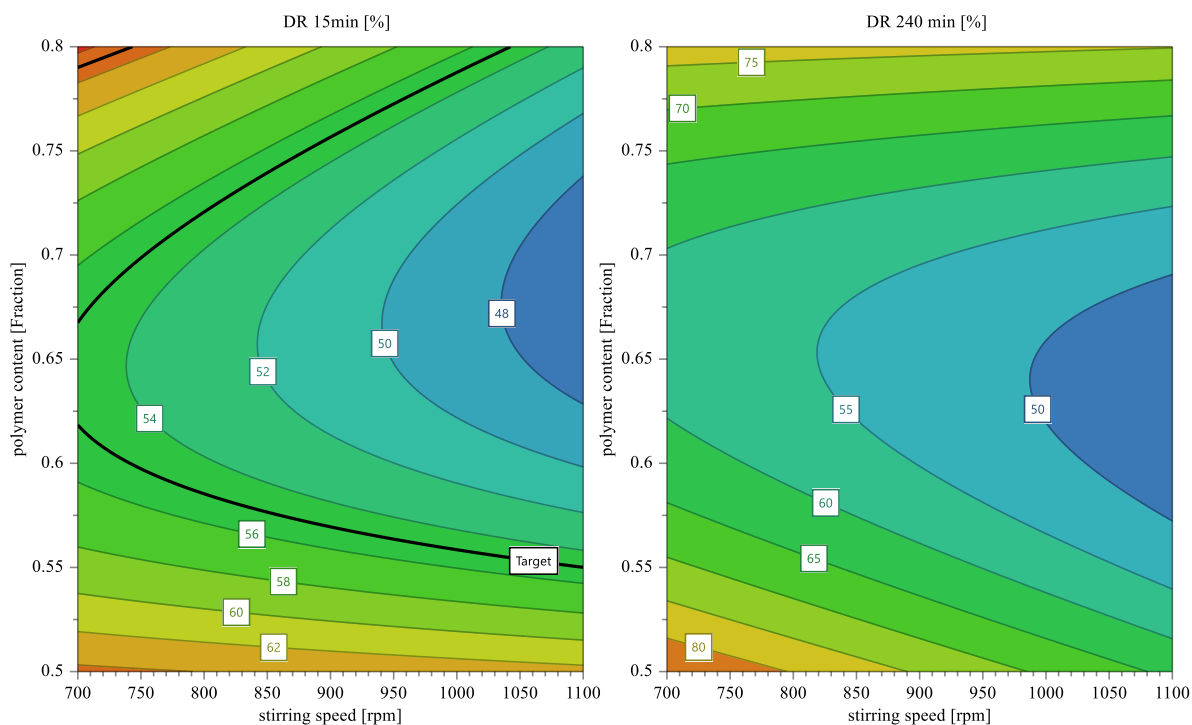
По евалуација на главните ефекти, корелации и интеракции на зависните променливи, направена е оптимизација врз основа на поставените критериуми за оптимизација поставени во табела 2.3. Графиконите на површините на одговор ги прикажуваат предвидените вредности (црвена боја-максимум, сина боја-минимум) за истражуваните зависни променливи. На сликите 3-40. и 3-41. се прикажани групирани 2D одзивни површини за ефикасност на енкапсулација и енкапсулиран лек и ослободен лек на 15 и 240 минута, соодветно.



Слика 3-40. 2D оптимизационен дијаграм на ефикасност на енкапсулација и енкапсулиран ацетаминофен во микрочестички

Одзивните површини ги потврдуваат претходно согледаните интеракции помеѓу независните променливи, главните ефекти и корелациите помеѓу независните и зависните променливи. Оптимизациониот дијаграм (Слика 3-40.) покажува дека највисока ефикасност на енкапсулација се постигнува при удел на полимер во ранг 0,725-0,8 (w/w) и ранг на брзина на мешање 950-1100 rpm. Најниските вредности на ефикасност на енкапсулација се постигнати при удел на полимер 0,5-0,588 (w/w) и брзина на мешање 700-965 rpm. Од друга страна, максимален енкапсулиран лек се постигнува при удел на полимер 0,5-0,525 (w/w) и брзина на мешање 960-1100 rpm. Од оптимизациониот дијаграм (слика 3-40) може да се утврди дека најнизок енкапсулиран ацетаминофен е постигнат при удел на полимер од 0,775-0,8 (w/w) при максимална брзина од 1000 rpm. Ослободен лек на 15 минута со најбавен профил на ослободување (најниски вредности) се постигнува при удел на полимер 0,630-0,725 (w/w) и брзина на

мешање 1050-1100 rpm (слика 3-41), додека највисок процент на ослободен лек се очекува при удел на полимер 0,775-0,8 (w/w) и брзина на мешање 700-770 rpm. Најмалку ослободен лек на 240 минута, од оптимизациониот дијаграм (Слика 3-41.) се согледа при удел на полимер во ранг 0,575-0,688 (w/w) и брзина на мешање 985-1100 rpm. Најбрзо ослободен лек на 240 минута, се постигна при удел на полимер 0,5-0,525 (w/w) и брзина на мешање 700-790 rpm.



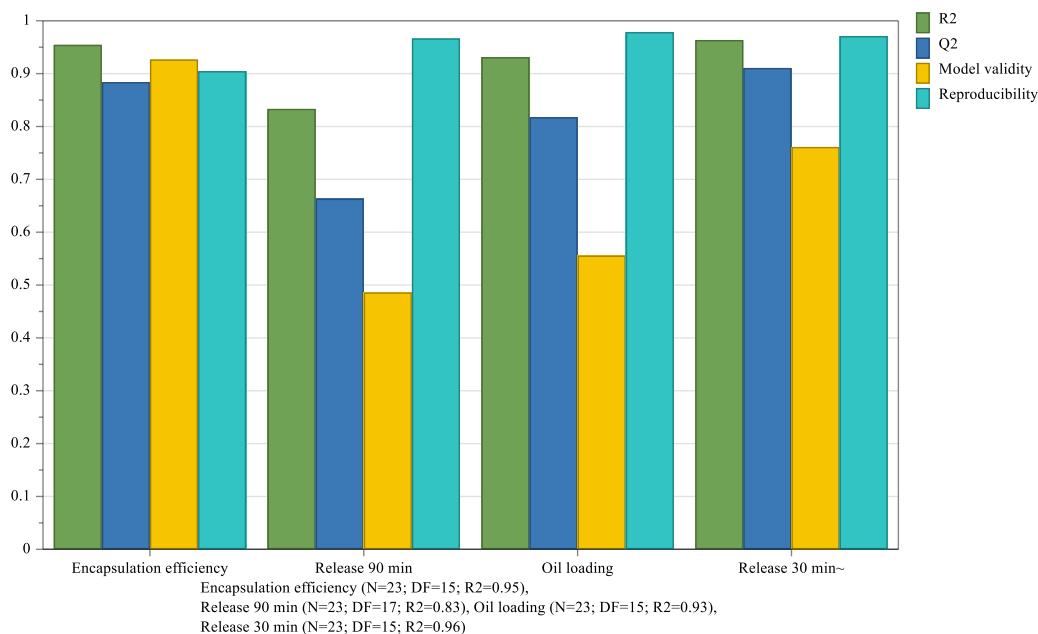
Слика 3-41. 2D оптимизационен дијаграм на ослободен ацетаминифен на 15 и 240 минута од микрочестички

3.6 Оптимизација на процес за добивање микрокапсули

Оптимизирањето на процесот за добивање на микрокапсули е направено со неконвенционален пристап преку интегрирање на формулациски и процесни променливи во една дизајн матрица (табела 2.4). За да се предвиди варијабилност помеѓу добиените резултати од зависните променливи врз основа на менување на независните променливи, и да се утврди зависноста помеѓу зависните и две, или повеќе независни променливи, се направи фитовање на резултатите со MLR. Резиме од фитовањето е прикажано на графиконот на слика 3-42.

Факторот на корелација (R^2) и факторот на идни предвидувања (Q^2) треба да имаат високи вредности, а разликата помеѓу нив не треба да биде повисока од 0,2-0,3, додека повисока разлика би укажала на несоодветно избран модел. Избраните линеарни модели покажуваат добар квалитет, со вредности повисоки од 0,9, со исклучок на зависната променлива ослободено масло на 90 минута, којшто има вредност 0,83 и вредности за Q^2 коишто се во опсег 0,81-0,91, со исклучок на вредноста 0,66 којашто е асоцирана со зависната променлива ослободено масло на 90 минута. Ниту еден од моделите нема вредност пониска од 0,25 за параметарот валидноста на моделот, што

укажува дека моделот е валиден. Незначајно ниска вредност во однос на другите, од 0,49, има ослободено масло на 90 минути, но сепак е валиден модел. Вредностите на параметарот репродукцибилност се во опсег 0,90-0,98. Генерално, вредностите на репродукцибилност пониска од 0,5 укажува на лоша или несоодветна експериментална контрола и голема чиста грешка.



Слика 3-42. Резиме од фитувањето за микрокапсули

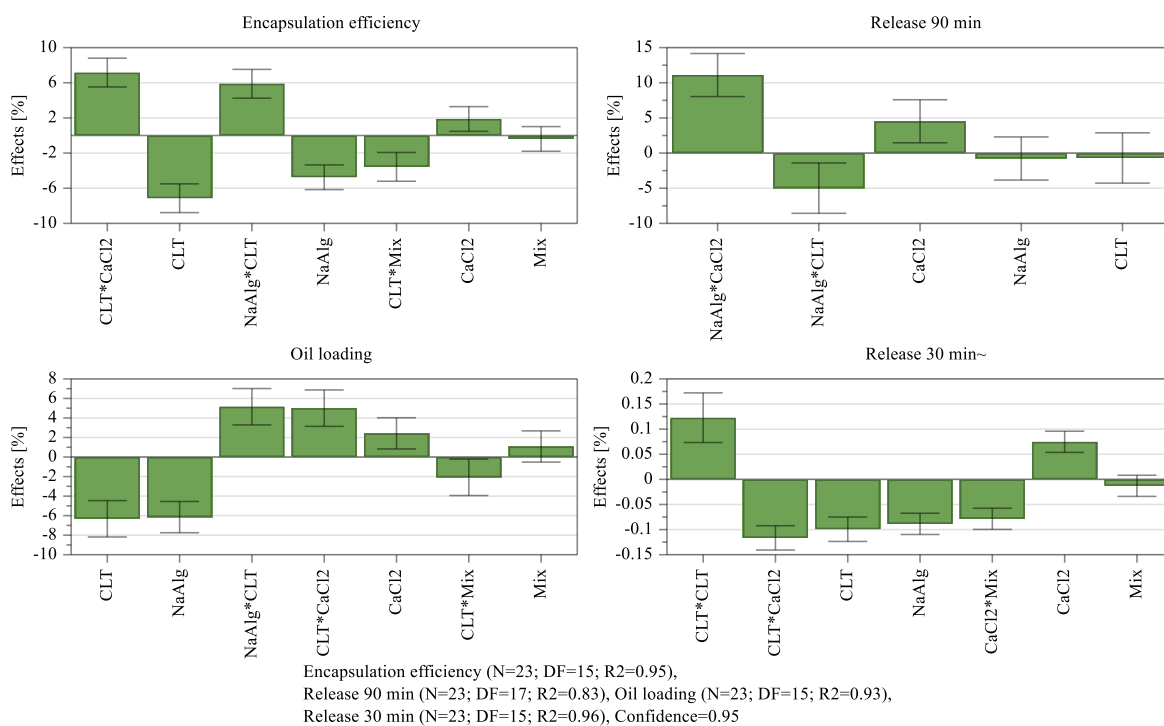
Со докажаната моќ за предвидување, на веќе развиена и оптимизирана формулација, може да се проценува влијанието на евалуираните четири параметри врз CQAs. Промената во уделот на полимерот може да влијае врз степенот на ефикасноста на енкапсулација и профилот на контролирано ослободување на етерично масло. Соодносот помеѓу етеричното масло и полимерот, како и дијаметарот на иглата за екструдирање може да влијаат врз распределбата на големината на микрокапсулите и последователно на профилот на ослободување на етеричното масло. Уделот на средството за вмрежување може да влијае врз цврстината на полимерната алгинатска матрица, оттука и врз профилот на ослободување или стабилноста на микрокапсулите. Времето на вмрежување на микрочестичките може да влијае врз ефикасноста на енкапсулација и количината на енкапсулирано етеричното масло, а оттука и врз севкупниот квалитет на крајниот продукт - микрокапсулите.

Во продолжение на сумарниот заклучок од фитувањето, се евалуираше ефектот на независните променливи врз секоја зависна променлива преку графикон на ефекти (слика 3-43.). Ефикасноста на енкапсулација е право пропорционално зависна од интеракцијата на време на вмрежување со удел на средство за вмрежување и удел на полимер со време на вмрежување, коишто се статистички значајни. Обратнопорационална зависност е утврдена со време на вмрежување, удел на биополимер и интеракција на вмрежување и брзина на мешање, коишто се исто така статистички значајни. Останатите ефекти се статистички незначајни.

Процентот на енкапсулирано масло статистички најмногу зависи од време на вмрежување и удел на полимер, каде зависноста е обратнопропорционална, додека првопропорционална зависност се бележи со членовите на интеракција помеѓу удел на полимер и време на вмрежување и време на вмрежување со средство на вмрежување.

За ослободување на етерично масло на 30 минути, статистички значајни се сите независни променливи, членови на интеракција, како и бинарен единечен член од графиконот (слика 3-43), така што бинарниот единечен член на време на вмрежување и концентрацијата на средство на вмрежување покажуваат правопрпорционална зависност, додека останатите членови бележат обратнопропорционална зависност. Исклучок е променливата брзина на мешање којашто е статистички незначајна.

Од друга страна, за ослободување на етеричното масло на 90 минути, статистички најзначаен е членот на интеракција помеѓу уделот на полимер и концентрацијата на средството за вмрежување, кој бележи правопрпорционална зависност. Останатите членови се статистички незначајни.

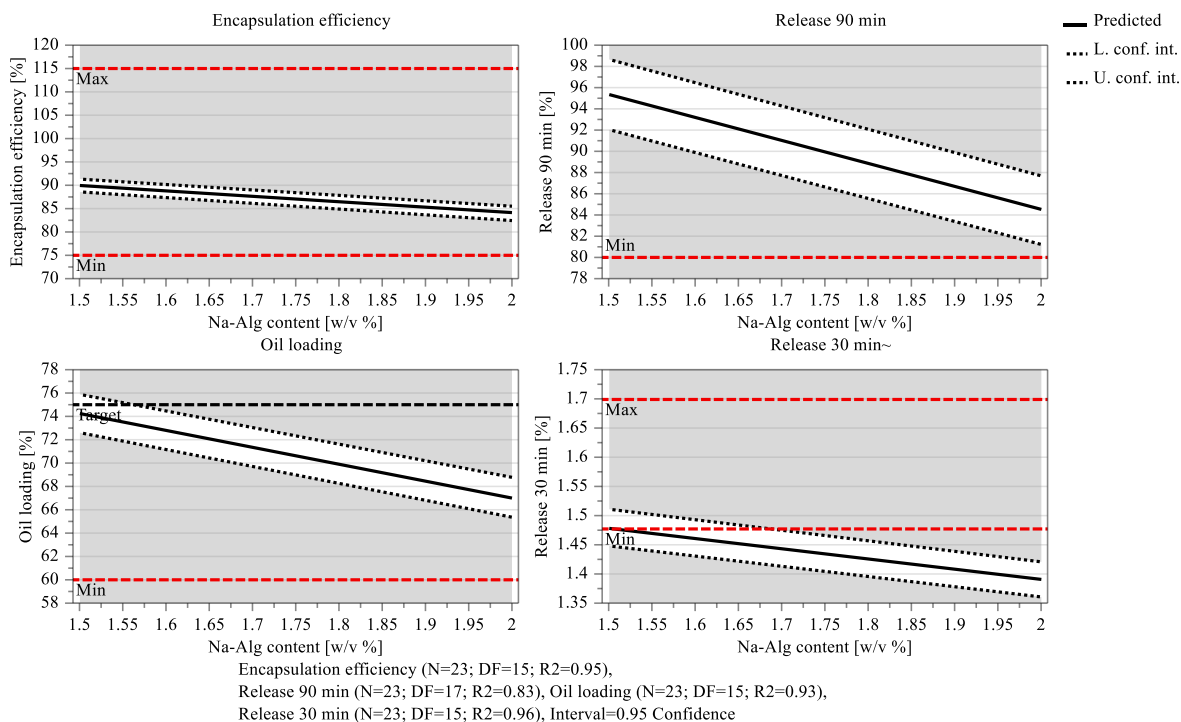


Слика 3-43. Графикон на ефекти за микрокапсули

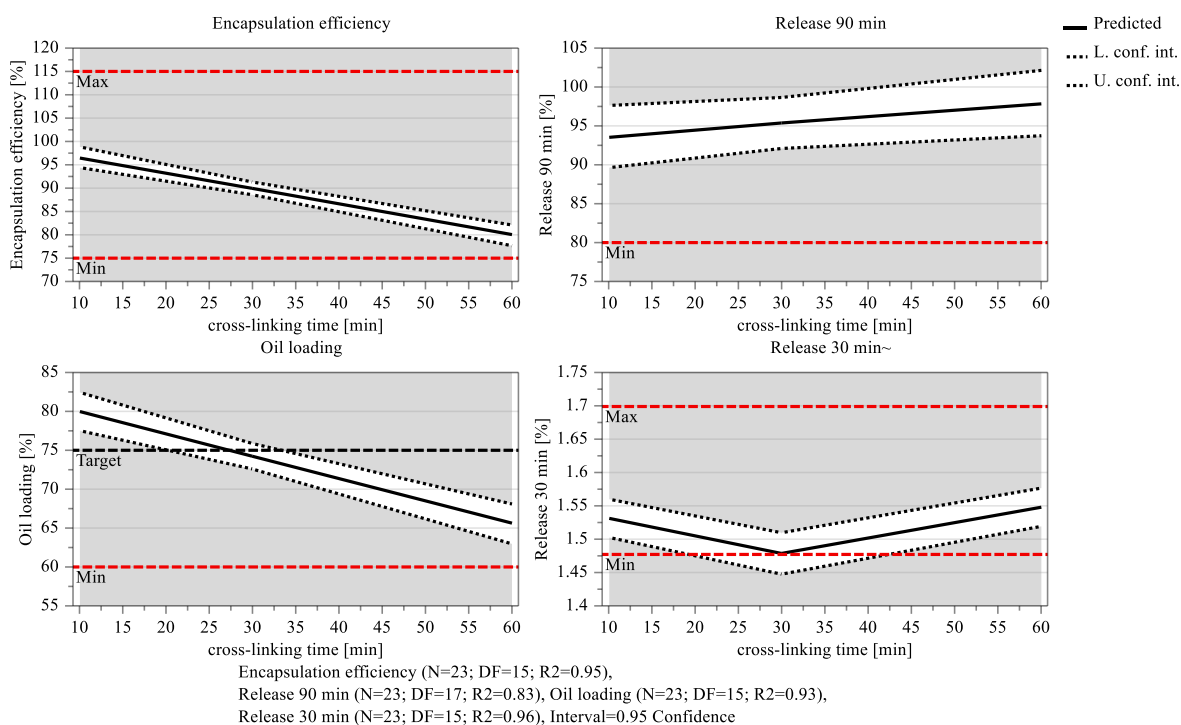
Во добиениот модел, главните ефекти на независните променливи врз истражуваните зависни променливи се прикажани низ слика 3-44 до 3-47. Предвидените вредности се претставени со полна црна линија, додека долен и горен лимит на интервал на доверба се претставени со испрекинати линии.

Со менување на избраните независни променливи во истражуваните рангови, вредностите за зависните променливи остануваат во рамките на критериумот на прифатливост. Од слика 3-44 може да се согледа дека исклучок е зависната променлива ослободување на етерично масло на 30 минути, коешто е под минималниот критериум

на прифатливост. Овој наод укажува на добиени микрокапсули со етерично масло од портокал со контролиран профил на ослободување.



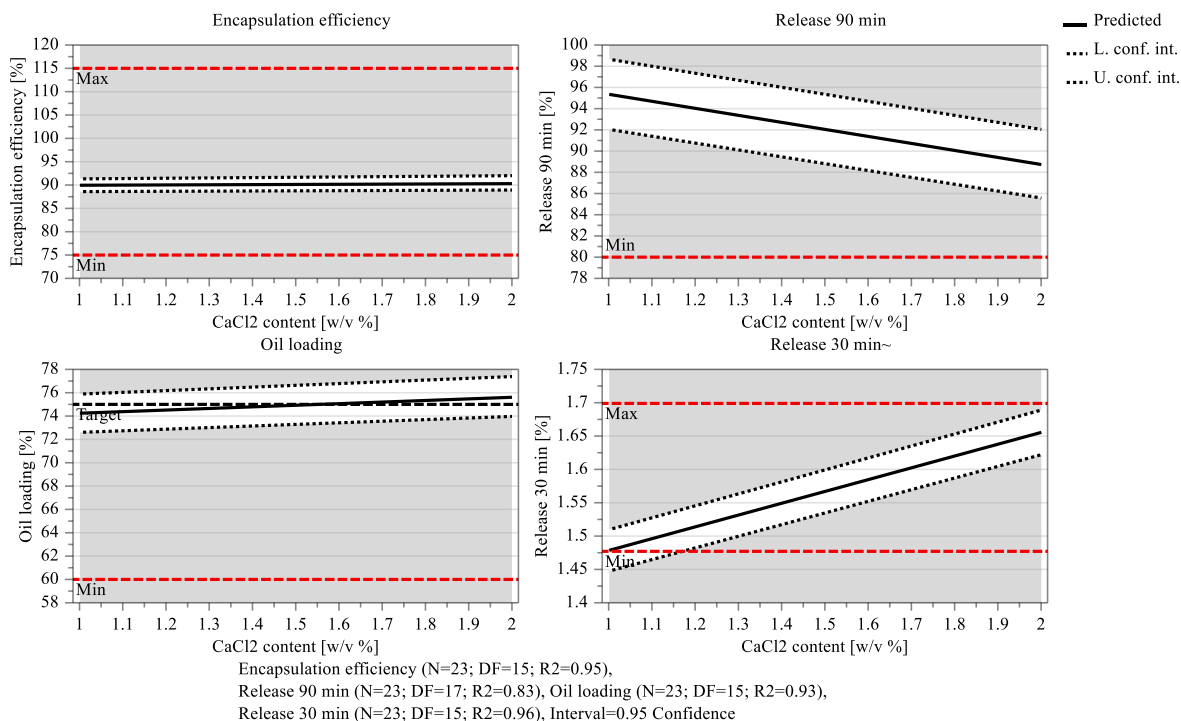
Слика 3-44. Графикон на главни ефекти за удел на натриум алгинат за микрокапсули



Слика 3-45. Графикон на главни ефекти за време на вмрежување за микрокапсули

Влијанието на времето на вмрежување покажува дека сите четири истражувани зависни променливи остануваат во критериумите на прифатливост. Од графиконот за

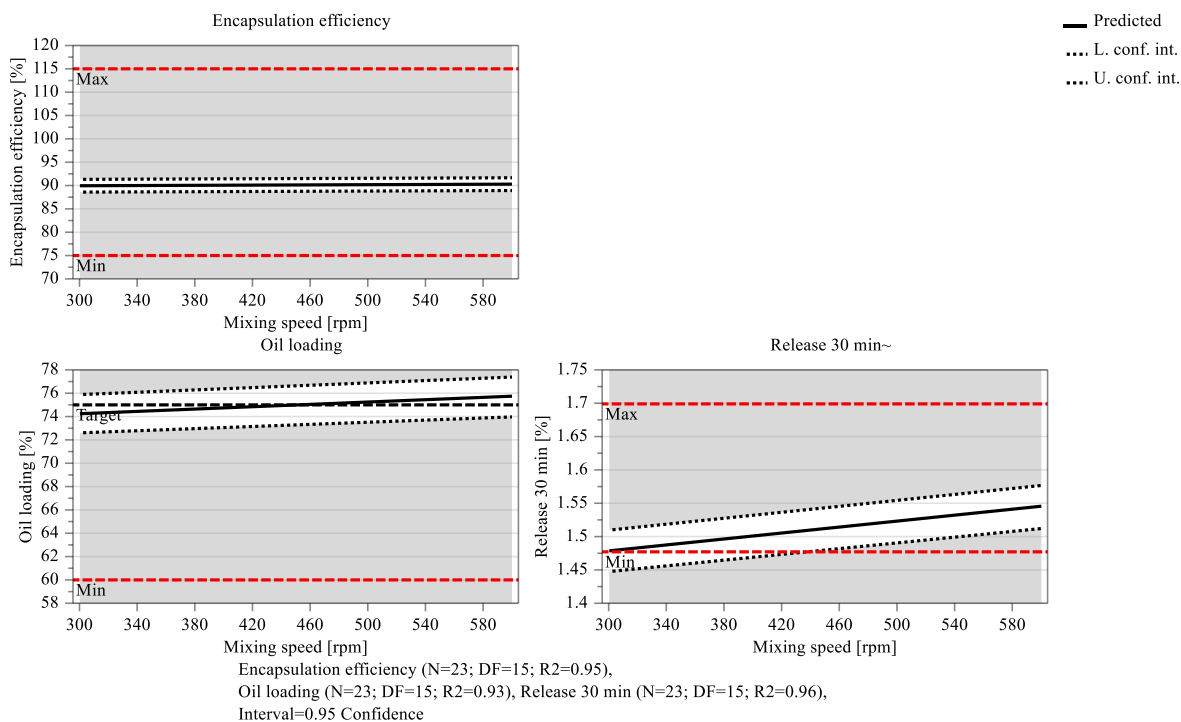
енкапсулирано етерично масло може да се утврди дека при време на вмрежување од 10 до 27 минути резултира со добивање микрокапсули со енкапсулирано етерично масло над посакуваната воспоставена граница (75 %), додека минималната спецификациска граница е поставена на 60 %.



Слика 3-46. Графикон на главни ефекти за удел на средство за вмрежување за микрокапсули

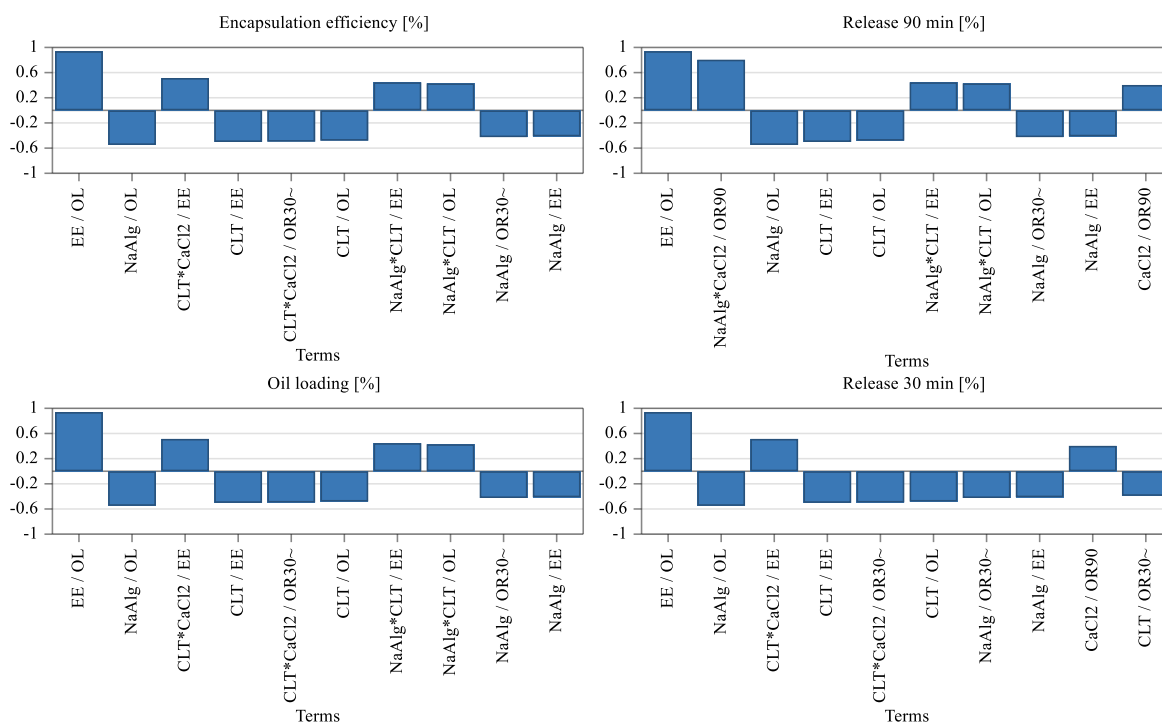
Од слика 3-46. се согледани слични наоди и за влијанието на концентрација на средството за вмрежување врз зависните променливи, односно остануваат во критериумите на прифатливост воспоставени во дизајн-матрицата. Од поставеноста на линијата на предвидени вредности за енкапсулирано масло, може да се согледа дека се постигнуваат повисоки вредности над целно-поставената граница (75 %) при повисок удел на средство за вмрежување. Овој наод остава простор за понатамошни истражувања за оптимизација на концентрацијата на средството за вмрежување, кое ќе биде над сегашно истражената максимална концентрација (2 %).

Во однос на влијанието на брзината на мешање (слика 3-47), исто така, се согледани конзистентни наоди, односно се во границите на прифатливост, за сите евалуирани зависни променливи. Значајно е напомене дека при зголемени брзини на мешање 450-600 грм, процентот на енкапсулирано етерично масло е над целната вредност (75 %). Брзината на мешање се покажа дека нема никаков ефект врз ослободеното етерично масло на 90 минути, поради што софтверот Modde автоматски го исклучува од евалуација за главни ефекти.



Слика 3-47. Графикон на главни ефекти за брзина на мешање за микрокапсули

На слика 3-48. е прикажано статистичкото значење на десетте најголеми интеракции помеѓу зависните и независните променливи. Од графиконот на корелации може да се потврдат главните корелации помеѓу истражуваните променливи.



Слика 3-48. Графикон на најзначајни статистички влијанија за микрокапсули

Од графиконот може да се утврди дека уделот на полимерот и времето на вмрежување имаат обратнопропорционално влијание врз сите четири истражувани променливи. Правопропорционално влијание има ефикасноста на енкапсулација со енкапсулирано етерично масло. Членот на интеракција помеѓу времето на вмрежување и концентрацијата на средството за вмрежуваат има правопропорционално влијание врз ефикасноста на енкапсулација, енкапсулирано етерично масло и ослободување во 30 минути. Во однос на ослободувањето во 90 минути, големо влијание има членот на интеракција помеѓу уделот на полимер и концентрација на средството за вмрежување, каде зависноста е правопропорционална. Односно, со зголемување на уделот на двете супстанции, ослободувањето ќе биде побрзо на 90 минути.

За оптимизација на процесот за микроенкапсулација на биоактивна компонента во течна агрегатна состојба се примени методологијата на 2D одзивни површини. Со овој метод се претставува функционалната зависност помеѓу зависни и независни променливи, што се предмет на истражувањето. Добиените конечни моделни равенки за функционална зависност за добивање на оптимизационите вредности за четирите зависни променливи, согласно кои софтверот ги прави пресметките, се прикажани со моделните равенки⁶, прикажани во продолжение.

$$Y_1 = -25,981X_1 - 1,182X_3 - 8,143X_4 + 0,015X_2 + 0,471X_1X_3 - 0,286X_3X_4 - 0,0005X_3X_2 + 142,425$$

$$Y_2 = -26,722 X_1 - 1,023X_3 - 4,584X_4 + 0,013X_2 + 0,412X_1X_3 + 0,200X_3X_4 - 0,0003X_3X_2 + 123,54$$

$$Y_5 = -0,177 X_1 - 0,0019X_3 + 0,473X_4 + 0,0007X_2 + 9,810^{-5}X_3^2 - 0,005X_3X_4 - 0,0005X_3X_2 + 1,313$$

$$Y_6 = -54,159 X_1 + 0,684X_3 - 73,160 X_4 - 0,399X_1X_3 + 44,39X_1X_4 + 180,585$$

Уделот на полимер (X_1) покажа статистички значаен негативен ефект на ефикасност на енкапсулација, енкапсулирано етерично масло и ослободено етерично масло на 90 минути. Статистички незначен ефект има врз ослободено етерично масло на 30 минути. Зголемен удел на полимер влијае врз добивање на оптимално-минимални вредности на ефикасност на енкапсулација и енкапсулирано етерично масло, коишто се непосакувани. Од друга страна, влијае исто така за постигнување на оптимално-минимална вредност на ослободено етерично масло.

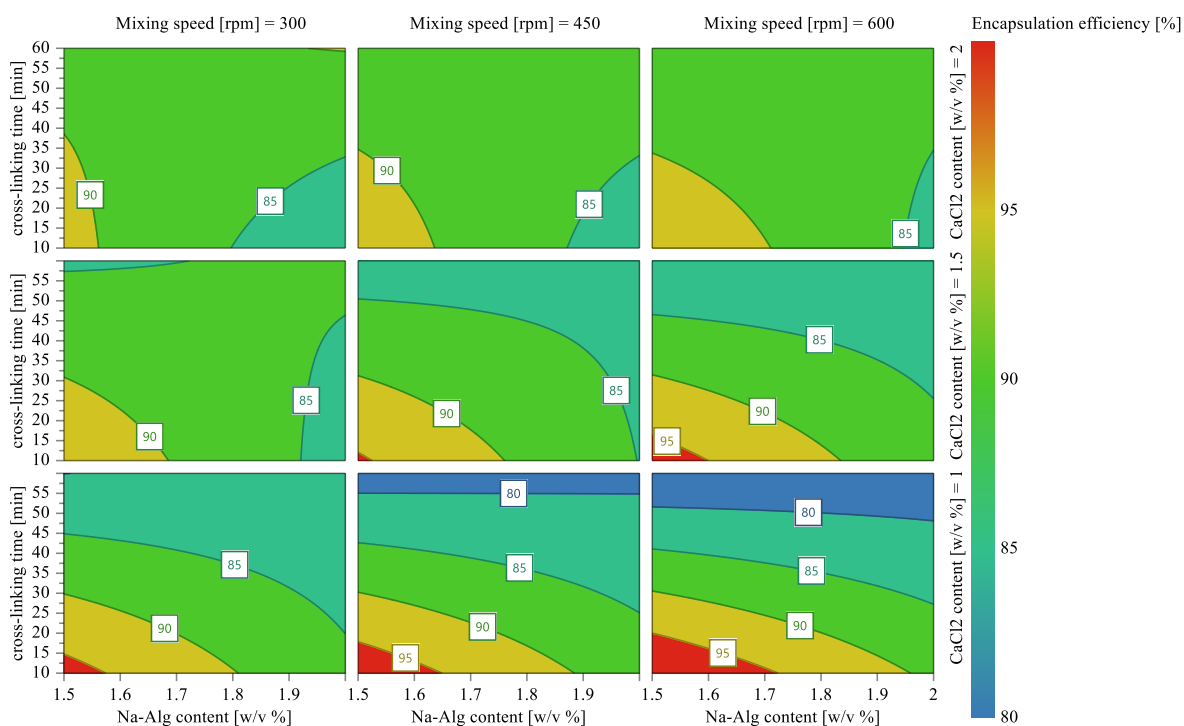
Членот на интеракција на удел на полимер и концентрација на средството за вмрежување покажува статистички значаен ефект врз ослободено етерично масло на 90 минути (Y_6). Значајното влијание на концентрацијата на средството за вмрежување е редуцирано поради пониското влијанието на уделот на полимерот. Синергистичкиот ефект на двете променливи придонесуваат за постигнување на оптимално-максимална вредност, односно побрзо ослободување на етерично масло на 90 минути, за разлика од нивното индивидуално влијание, коешто е во насока на постигнување на оптимален-минимум. Членот на интеракција помеѓу удел на полимер и времето на вмрежување

⁶ Y_1 -ефикасност на енкапсулација; Y_2 -енкапсулирана биоактивна компонента; Y_5 -ослободено етерично масло на 30 минути; Y_6 -ослободено етерично масло на 90 минути; X_1 -удел на полимер; X_2 - брзина на мешање; X_3 -време на вмрежување; X_4 -концентрација на средство за вмрежување

имаат статистички незначајно влијание врз ослободено етерично масло на 90 минути. Значајното статистичко влијание на уделот на полимерот за постигнување на оптимален-минимум е редуцирано поради изразеното ниско влијание на времето на вмрежување. Предзнакот пред членот на интеркација укажува дека влијанието е во насока на постигнување на оптимален-минимум, односно исто како индивидуалното влијание на уделот на полимерот.

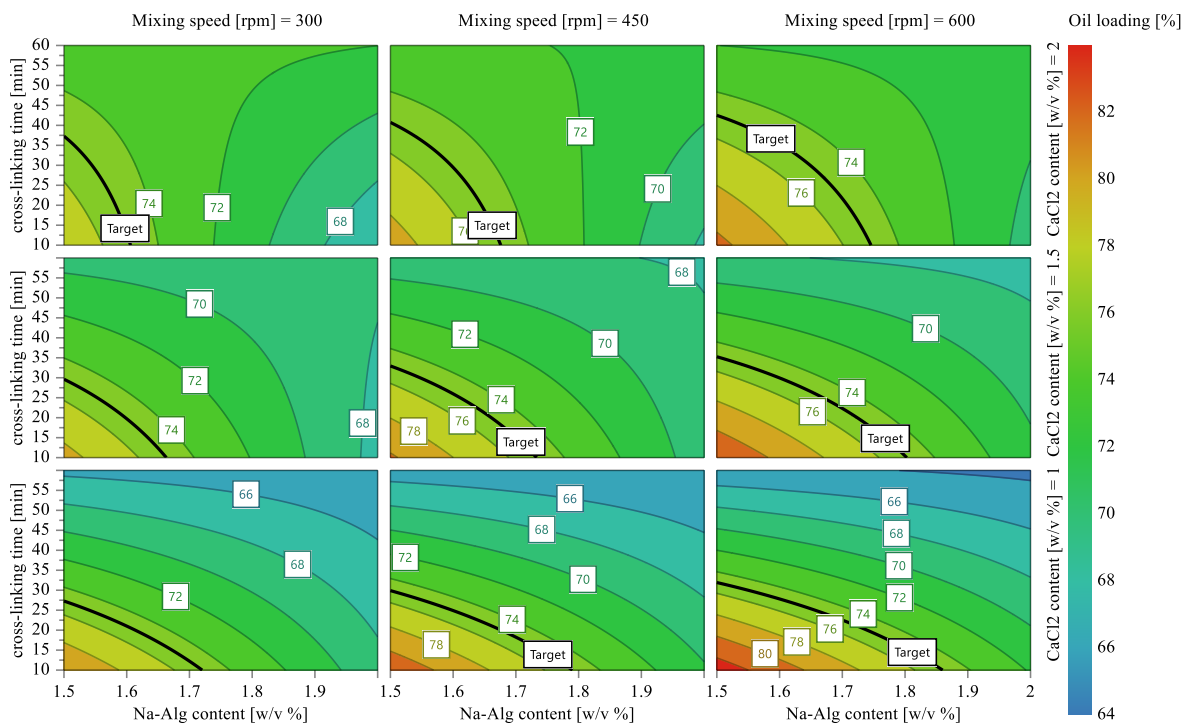
Врз ослободено етерично масло на 30 минути (Y_5), ефикасност на енкапсулација (Y_1) и енкапсулирано етерично масло (Y_2) ниту еден од индивидуалните независни променливи (со исклучок на X_1), членови на интеркација и бинарен единечен член немаат статистичко значајно влијание.

На сликите од 3-49. до 3-52. се прикажани 4D одзивни површини. На x-оската е претставен уделот на натриум алгинат, на y-оската времето на вмрежување, на секундарната x-оска брзината мешање и на секундарната y-оска концентрацијата на средството за вмрежување.



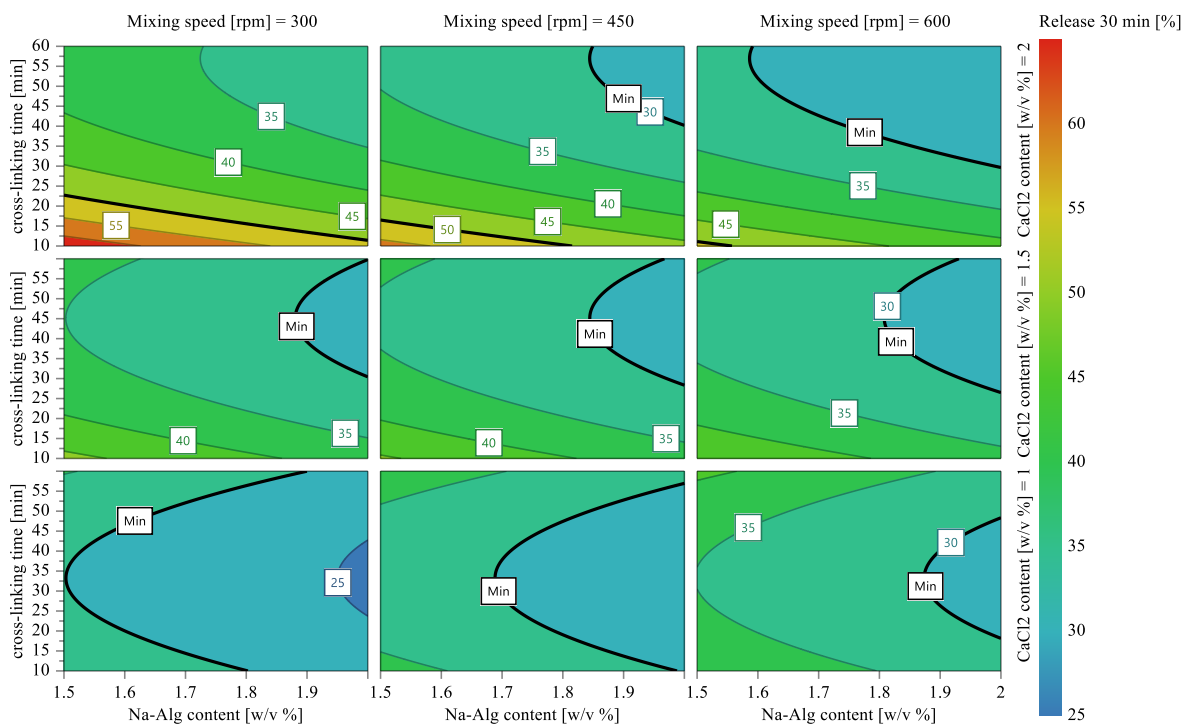
Слика 3-49. 4D оптимизационен графикон за ефикасност на енкапсулација во микрокапсули

Од слика 3-49. може да се согледа дека максимална вредност за ефикасност на енкапсулација (црвена боја) се постигнува преку неколку комбинации на независни променливи. Најоптимална комбинација би можело да се смета онаа која е воедно и економски најисплатлива (најниско можна брзина на мешање и најкратко оптимално време на вмрежување) во комбинација со најнизок можен удел на ексципиенси. Оттука може да се согледа дека вредности за ефикасност на енкапсулација над целните лимити може да се постигнат и при брзина на мешање 450 грм, време на вмрежување 11-19 минути, удел на натриум алгинат 1,5-1,65 % (w/v) и 1 % (w/v) концентрација на CaCl₂.



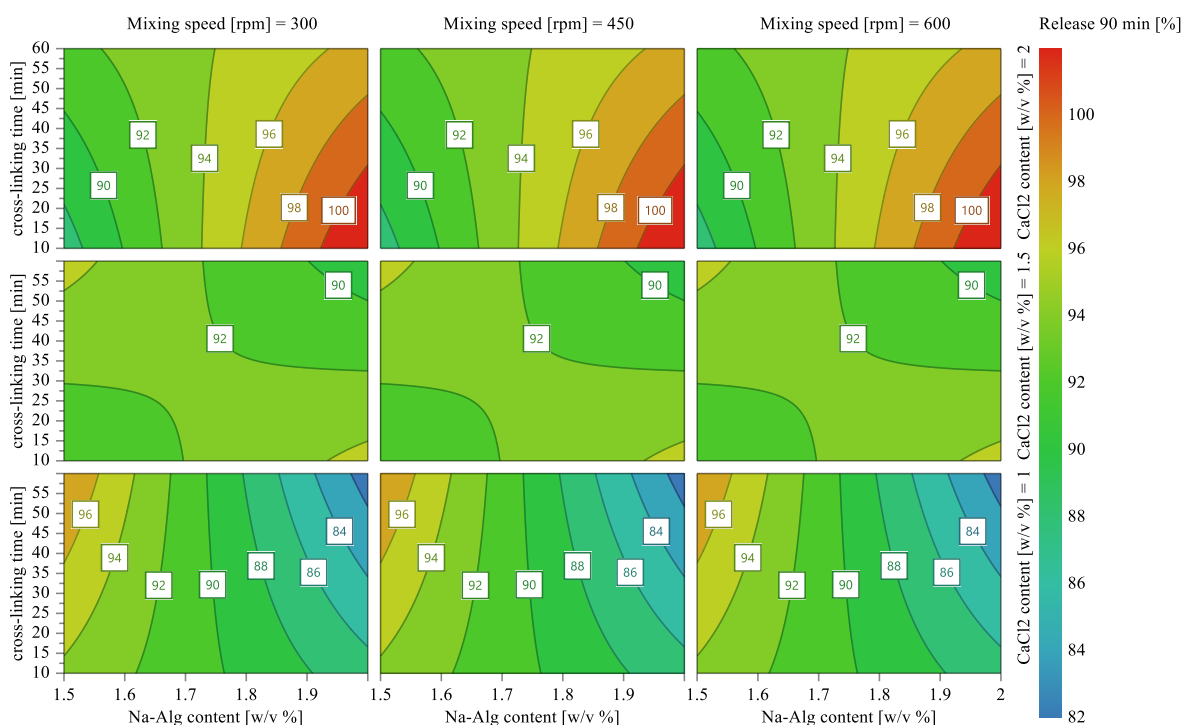
Слика 3-50. 4D оптимизационен графикон за енкапсулирано етерично масло во микрокапсули

Од слика 3-50 може да се заклучи дека најоптимално подрачје за добивање највисоки вредности на енкапсулирано етерично масло е при условите: удел на полимер 1,5-1,54 % (w/v) и време на вмрежување 10-13 минути, константен удел на CaCl₂ (2 % (w/v)) и брзина на мешање 600 грм.



Слика 3-51. 4D оптимизационен графикон за ослободено етерично масло на 30 минути од микрокапсули

Ослободувањето на етеричното масло на 30 минути е целно да биде во границите на прифатливост (30-50 % ослободено за 30 минути), поради што значајно е оптимизационото подрачје во сино-зелена и зелена боја од слика 3-51.



Слика 3-52. 4D оптимизационен графикон за ослободено етерично масло на 90 минути во микрокапсули

Од графиконот на слика 3-52 може да се согледа дека црвените зони (најповолни вредности за ослободено етерично масло на 90 минути) се забележливи при 2 % (w/v) CaCl₂, време на вмрежување 60 минути и удел на полимер 1,9-2,0 % (w/v), така што за најоптимална проба може да се избере при најниска брзина на мешање – 300 грм.

Заклучок

ЗАКЛУЧОК

Врз основа на поставените цели, задачи и хипотетската рамка се реализираше истражувањето и од сумираните резултати се изведоа следните заклучни согледувања:

1. Микрочестичките од НРС се добиени успешно со примена на методот *испарување на растворувач од о/о емулзија* и истото се потврди преку физичко-хемиска карактеризација (FTIR, DSC, TGA, UV-Vis, оптичка микроскопија и ласерска дифракција);
2. Микрокапсулите од натриум алгинат се добиени успешно со примена на методот *надворешно јонотропско гелирање* и истото се потврди преку физичко-хемиска карактеризација (FTIR, DSC, TGA, UV-Vis, оптичка микроскопија и ласерска дифракција);
3. Оптичката микроскопија покажа сферична и псевдосферична морфологија со порозно-рапава површина кај микрочестичките и микрокапсулите, соодветно;
4. Сферична морфологија на микрочестичките е забележлива при најголем удел на полимер и највисока брзина на мешање во тек на испарувањето на растворувачот од емулзијата и оцврстување на микрочестичките;
5. Микрокапсулите добиени при повисока концентрација на CaCl_2 имаат поизразена псевдосферична морфологија;
6. Големината на добиени микрочестички е во ранг од 495 μm до 760 μm (евалуирано на d_{50}) и се утврди обратнопропорционална зависност помеѓу големината на микрочестичките и уделот на полимерот;
7. Микрокапсулите се добиени со големина на честички во ранг од 1135 μm до 1893 μm (евалуирано на d_{50}). Се утврди и правопрпорционална и обратнопропорционална зависност помеѓу големината на микрокапсулите и уделот на полимерот, којашто во вториот случај може да се должи на пропратен ефект на подолго време на вмрежување при помала концентрација на CaCl_2 ;
8. FT-IR анализата на користените ексципиенси и биоактивни компоненти од двата истражувани системи ја потврди успешната енкапсулација во полимерните матрици кај двата истражувани процеси;
9. Со FT-IR анализата исто така се потврди и компатибилноста помеѓу одбраните ексципиенси и биоактивни супстанции со тоа што не беа идентификувани дополнителни апсорпциони ленти во спектрите;
10. Термичките анализи со DSC и TGA/DTG ја потврдија термичката стабилност на добиените микрочестички и микрокапсули до 200 °C;
11. Во системот на микрочестички се утврди правопрпорционално влијание на брзината на мешање во тек на испарување на растворувач од о/о емулзија врз ефикасноста на енкапсулација; правопрпорционална зависност помеѓу зголемување на уделот на полимерот и ефикасноста на енкапсулација, а обратнопропорционална зависност со енкапсулираниот лек;
12. Во системот на микрокапсули се утврди обратнопропорционална зависност помеѓу уделот на полимер и ефикасноста на енкапсулација; обратнопропорционална зависност помеѓу уделот на натриум алгинат и времето

- на вмрежување врз ефикасноста на енкапсулација и енкапсулирано масло. Не се утврди зависност од брзината на мешање врз зависните променливи во текот на гелирање на микросферите;
13. Двата истражувани процеси за микроенкапсулација на биоактивни компоненти овозможува добивање на микрочестички и микрокапсули со контролиран механизам на ослободување на биоактивните супстанции;
 14. *In vitro* профилот на ослободување на микрочестичките со ацетаминофен се спореди со комерцијално достапни препарати и се утврди дека добиените микрочестички имаат модифициран профил на ослободување во однос на препарат со конвенционален механизам на ослободување, и ослободуваат побрзо во период од четири часа споредено со двослојни таблети со продолжено дејство на ослободување;
 15. *In vitro* студијата на ослободување во кисела средина покажа ослободување на ацетаминофен од хидроксипропилцелулозните микрочестички слично како во фосфатен пуфер рН 6,8, додека ослободувањето на етеричното масло од портокал од алгинатските микрокапсули беше пониско од 10 % во период од 2 часа. Суштински придонес кон овој утврден феномен има ограничената растворливост на натриум алгинат во кисела средина;
 16. Евалуацијата на кинетиката на ослободување покажа дека двата истражувани системи, микрочестички и микрокапсули, се компатабилни со $Q\sqrt{t}$ кинетика (модел на Higuchi), што укажува на добиени матрикс-стуркурни системи;
 17. *In vitro* студијата на растворливост покажа дека контролираното ослободување на ацетаминофен следи доминантно Фикова дифузија;
 18. *In vitro* студијата на растворливост покажа дека контролираното ослободување на етеричното масло од портокал го следи супер случај II на транспорт, односно се одвива по пат на бабрење, релаксација на макромолекуларните полимерни вериги и ерозија на биополимерниот матрикс;
 19. Со примена на D-оптимален дизајн се генерираше неконвенционална дизајн-матрицата за двата истражувани системи интегрирајќи формулациски и процесни променливи;
 20. Фитувањето на податоците преку повеќекратна линеарна регресија покажа дека коефициентите на корелација за сите зависни променливи во двата истражувани процеси се прифатливо високи и моделите се одликуваат со висока моќ на предвидување;
 21. Успешно беа воспоставени математичките моделни равенки преку кои софтверски детално се карактеризираше влијанието на истражуваните процесни и формулациски променливи врз зависните променливи (CQAs);
 22. Разликата помеѓу предвидените и експериментално добиените вредности за зависните променливи е занемарливо ниска што ја потврдува робусноста на математичките модели.

Генерално, заклучоците од оваа докторска дисертација претставуваат научен придонес во областа на конвенционално и зелено фармацевтско процесно инженерство и напредна фармацевтска технологија, кои се темелат на постапките на

микроенкапсулација на биоактивни компоненти и полисахаридни енкапсулирачки матрици. Истражувачката студија го нагласи потенцијалот за примена на два полисахаридни полимери, хидроксипропил целулоза и натриум алгинат, за да се дизајнираат и добијат полимерни микросфери.

Применливоста е очекувана и целно насочена кон добивање на диететски суплементи со функционални својства, коишто би биле докажана соодветна замена за генерички лекови добиени со конвенционално фармацевтско процесно инженерство. Неминовен е и практичниот придонес во пристапот *квалитет според дизајн* во постапките на јонотропско гелирање и во испарување на растворувач од емулзија. Развојот на постапки на микроенкапсулација со QbD пристап се актуелизира во последните години. Примената на D-оптимален експериментален дизајн ќе придонесе за негово подобро валоризирање во дизајн на експерименти на истражуваните постапки за микроенкапсулација.

Наодите од ова истражување покажаа дека микрокапсулите со етерично масло од портокал би можеле да се применат како диететски суплемент со продолжено дејство на ослободување и функционални својства, односно аналгетско својство како што е фармаколошкото дејство на ацетаминофенот. Моменталниот пристап, може да се искористи како технолошка постапка за енкапсулирање и на други етерични масла и преку соодветно дизајнирање и оптимизирање на процесот да се добијат микрокапсули со помала распределба на големина. Фарма-нутритивната и диететската индустрија се во подем, а можноста за искористување на добро истражени системи со функционални својства од оваа сфера може да бидат од бенефит за светската популација. Микрокапсулите со етерични масла според USP и Ph.Eur. може да се категоризираат како хербални препарати. Имено, добиените микрокапсули може да се третираат како полуготов продукт, којшто може да се капсулира во капсули со соодветна големина и да се пакува во соодветно примарно пакување за кое ќе биде докажана неговата стабилност.

Сепак, потребно е да се реализираат дополнителни истражувања со цел да:

- се изведат токсиколошки и клинички студии на етеричното масло од портокал за да се проценат максималните дозволени дози на изложување и максимална дневна доза на администрирање, како и несаканите ефекти;
- се истражат дополнителни CQAs (пр. деградациони продукти, резидуални растворувачи, распадливост, микробиолошки квалитет и потенцијални антимикробни својства);
- се оптимизира дополнително процентот на ефикасност на енкапсулација и распределба на големина на честички;
- се изведат студии на стабилност со цел да се утврдат рокот на траење и условите на чување на добиените микрочестички и микрокапсули;
- се подобри аналитичкиот развој со примена на посовремени инструментални техники за карактеризација на употребените супстанции во истражуваните системи;
- се направи соодветен технолошки трансфер на постапките на микроенкапсулација од лабораториски на индустриски услови и се воспостави студија за валидирање на процесите;

*Користена
литература*

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Abang , S., Chan, E.-S., & Poncelet, D. (2012). Effects of process variables on the encapsulation of oil in calcium alginate capsules using an inverse gelation technique. *J. Microencapsul.*, 29(5), 417-428.
- Adrover, A., Paolicelli, P., Petralito, S., Di Muzio, L., Trilli, J., Cesa, S., . . . Casadei, M. A. (2019). Gellan Gum/Laponite Beads for the Modified Release of Drugs: Experimental and Modeling Study of Gastrointestinal Release. *Pharmaceutics*, 11, 187.
- Agnello, S., Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Fiorica , C., & Giammona, G. (2018). Synthesis and evaluation of thermo-rheological behaviour and ionotropic crosslinking of new gellan gum-alkyl derivatives. *Carbohydr. Polym.*, 185, 73–84.
- Agüero, L., Zaldivar-Silva , D., Peña, L., & Dias, M. (2017). Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydr. Polym.*, 168, 32–43.
- Agulhon, P., Markova, V., Robitzer, M., Quignard, F., & Mineva, T. (2012). Structure of Alginate Gels: Interaction of Diuronate Units with Divalent Cations from Density Functional Calculations. *Biomacromolecules*, 13(6), 1899–1907.
- Alemdar, A., & Mohini, S. (2008). Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues: wheat straw and soy hulls. *Bioresource technology*, 99(6), 1664-71.
- Alex, R., & Bodmeier, R. (1990). Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. *J Microencapsul*, 7(3), 347-55.
- Al-Kassas, R., Al-Gohary, O., & Al-Faadhel, M. (2007). Controlling of systemic absorption of gliclazide through incorporation into alginate beads. *Int J Pharm*, 341((1-2)), 230-7.
- Amaral, P. H., Andrade, P. L., & de Conto, L. C. (2019). Microencapsulation and Its Uses in Food Science and Technology: A Review. Bo F. Salaün, *Microencapsulation - Processes, Technologies and Industrial Applications*. London: IntechOpen.
- Ashland. (2017). *Klucel hydroxypropylcellulose: physical and chemical properties*. Ashland.
- Ashland. (2023). *Klucel HPC - Physical and chemical properties*. Повратено од Ashland: https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC_11229_Klucel_HPC.pdf
- Auriemma, G., Russo , P., Del Gaudio, P., García-González , C., Landín, M., & Aquino , R. P. (2020). Technologies and Formulation Design of Polysaccharide-Based Hydrogels for Drug Delivery. *Molecules*, 25, 3156.
- Aziz, F. R., Jai, J., Raslan, R., & Subuki, I. (2016). Microencapsulation of citronella oil by complex coacervation using chitosan-gelatin (b) system: operating design, preparation and characterization. *MATEC Web of Conferences*. Les Ulis: EDP Sciences.
- Babu, J., Sathigari, S., Kumar, T., & Pandit, J. (2010). Formulation of Controlled Release Gellan Gum Macro Beads of Amoxicillin. *Curr. Drug Deliv.*, 7(1), 36–43.
- Baimark, Y., & Srisuwan, Y. (2014). Preparation of alginate microspheres by water in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking. *Advanced Powder Technology*, 25(5), 1541-1546.
- Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Goyary, D., Karmakar, S., & Veer, V. (2013). Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 691-697.
- Bannikova, A., Evteev, A., Pankin, K., Evdokimov, I., & Kasapis, S. (2018). Microencapsulation of fish oil with alginate: In-vitro evaluation and controlled release. *LWT-Food Science and Technology*, 90, 310-315.
- Batista, P. S., de Moraes, A. M., Pintado, M. M., & de Moraes, M. S. (2019). Alginate: Pharmaceutical and Medical Applications. Bo *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices* (стр. 649–691). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Batubara, I., Rahayu, D., Mohamad, K., & Prasetyaningtyas, W. E. (2012). Leydig Cells Encapsulation with Alginate-chitosan: Optimization of microcapsule formation. *J. Encapsulation Adsorpt. Sci.*, 2(2), 15-20.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A., Pinheiro, A., Januário, I., Vicente, A., . . . Delgadillo, I. (2013). Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloid*, 33, 199-206.
- Bennacef, C., Desobry-Banon , S., Probst, L., & Desobry, S. (2021). Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecule. *Food Hydrocoll.*, 118, 106782.
- Bera , H., Mothe, S., Maiti, S., & Vanga, S. (2018). Carboxymethyl fenugreek galactomannan-gellan gum-calcium silicate composite beads for glimepiride delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, 107, 604–614.
- Berchane, N., Jebail, F., Carson, K., Rice-Ficht, A., & Andrews, M. (2006). About mean diameter and size distributions of poly(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres. *J Microencapsul*, 23(5), 539-52.
- Bide, Y., Fashapoyeh, M. A., & Shokrollahzadeh, S. (2021). Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination. *Nature Portfolio*, 11, 17068.

- Birnbaum, D., & Brannon-Peppas, L. (2004). Microparticle Drug Delivery Systems. Bo D. Brown, *Drug Delivery Systems in Cancer Therapy. Cancer Drug Discovery and Development* (стр. 117-135). Totowa: Humana Press.
- Bogatay, M., Mrhar, A., Kristl, F., & Kozjek, F. (1991). Eudragit E microspheres bacampicillin: Preparation by solvent removal methods. *J Microencapsul*, 8, 401-406.
- Boni, F. I., Prezotti, F. G., & Cury, B. S. (2016). Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 42, 1283–1290.
- British Pharmacopoeia. (2022). Granules. Bo British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia* (2023 изд.). Stationery Office.
- Bruschi, M. L. (2015). Mathematical models of drug release. Bo M. L. Bruschi, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (стр. 63-86). Woodhead Publishing.
- Bunchorntavakul, C., & Reddy, R. (2013). Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*, 17(4), 587-607.
- Burgess, D., & Hickey, A. (2007). Microsphere Technology and Applications. Bo J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Third изд., Том 1, стр. 2228-2238). New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Burhan, A., Abdel-Hamid, S., Soliman, M., & Sammour, O. (2019). Optimization of the microencapsulation of Lavender oil by spray drying. *J. Microencapsul.*, 36(3), 250-266.
- Cánepa, C., Imperiale, J., Berini, C., Lewicki, M., Sosnik, A., & Biglione, M. (2017). Development of a Drug Delivery System Based on Chitosan Nanoparticles for Oral Administration of Interferon- α . *Biomacromolecules*, 18(10), 3302-3309.
- Capretto, L., Mazzitelli, S., Luca, G., & Nastruzzi, C. (2010). Preparation and characterization of polysaccharidic microbeads by a microfluidic technique: Application to the encapsulation of Sertoli cells. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 429-435.
- Carbinatto, F., de Castro, A. D., Evangelista, R., & Cury, B. (2014). Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian J Pharm Sci*, 9(1), 27-34.
- Celep, G. S., Demirkaya, A., & Solak, E. K. (2022). Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer. *Current Applied Physics*, 40, 30-42.
- Chandrasekharan, N., Dai, H., Roos, L. T., Evanson, N., Tomsik, J., Elton, T., & Simmons, D. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21), 13926-31.
- Chaturvedi, K., Ganguly, K., More, U., Reddy, K. R., Dugge, T., Naik, B., . . . Noolvi, M. (2019). Sodium alginate in drug delivery and biomedical areas. Bo *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (стр. 59–100). Amsterdam: Elsevier.
- Chiew, A., & Buckley, N. (2021). Acetaminophen Poisoning. *Crit Care Clin*, 37(3), 543-561.
- Chikukwa, M., Walker, R., & Khamanga, S. (2020). Formulation and characterisation of a combination captopril and hydrochlorothiazide microparticulate dosage form. *Pharmaceutics*, 12(8), 172.
- Choonara, Y., Pillay, V., Khan, R., Singh, N., & du Toit, L. (2009). Mechanistic Evaluation of Alginate-HEC Gelisphere Compacts for Controlled Intrastriatal Nicotine Release in Parkinson's disease. *J. Pharm. Sci.*, 98, 2059–2072.
- Chulia, D., Deleuil, M., & Pourcelot, Y. (1994). *Powder Technology and Pharmaceutical Processes*. Elsevier.
- Chung, T., Huang, Y., & Liu, Y. (2001). Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres. *Int J Pharm*, 212(2), 161-169.
- Chung, T.-W., Huang, Y.-Y., Tsai, Y.-L., & Liu, Y.-Z. (2002). Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA microspheres fabricated by emulsion-solvent evaporation process. *J Microencapsul*, 19(4), 463-71.
- Coelho, J., Ferreira, P., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A., Góis, J., & Gil, M. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1, 164-209.
- Crompton, T. (1993). Degree of crystallinity and melting temperature. Bo *Practical Polymer Analysis*. Boston: Springer.
- de Aguir, P., Bourguignon, B., Khots, M., Massart, D., & Phan-Thau-Luu, R. (1995). D-optimal designs. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(2), 199-210.
- de Oliveira, E. R., & Vieira, R. P. (2020). Synthesis and Characterization of Poly(limonene) by Photoinduced Controlled Radical Polymerization. *J Polym Environ*.
- de Souza, H. J., Fernandes, R. V., Borges, S. V., Felix, P. H., Viana, L. C., Lago, A. M., & Botrel, D. A. (2018). Utility of Blended Polymeric Formulations Containing Cellulose Nanofibrils for Encapsulation and Controlled Release of Sweet Orange Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1188–1198.
- Deshmukh, R., & Naik, J. (2016). Optimization of spray-dried diclofenac sodium-loaded microspheres by screening design. *Drying technology*, 34(13), 1593-1603.

- D'Souza, S., Faraj, J., & DeLuca, P. (2005). A model-dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 6(4), E553-64.
- Elkady, O., Tadros, M. I., & El-laithy, H. (2020). QbD Approach for Novel Crosslinker-Free Iontropic Gelation of RisedronateSodium–Chitosan Nebulizable Microspheres: Optimization and Characterization. *AAPS PharmSciTech*, 21(14).
- El-Kamel, A., Al-Gohary, O., & Hosny, E. (2003). Alginate-diltiazem hydrochloride beads: optimization of formulation factors, in vitro and in vivo availability. *J. Microencapsul*, 20(2), 211-225.
- El-Molla, M., & El-Ghorab, A. (2022). Extraction of eco-friendly essential oils and their utilization in finishing polyester fabrics for fragrant and medical textiles. *J. Eng. Fibers Fabr.*, 17, 1-12.
- Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., & Elofsson, U. (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *J Pharm Sci*, 92(4), 900-10.
- EMA. (2014). *Annex II to note for guidance on process validation CHMP/QWP/848/99 and EMEA/CVMP/598/99 non standard processes*. London: EMA.
- EMA. (2016). *Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev1, Corr.1*. Strasbourg: EMA.
- Faidi, A., Lassoued, M. A., Becheikh, M. E., Touati, M., Stumbe, J.-F., & Farhat, F. (2019). Application of sodium-alginate extracted from a Tunisian brown algae *Padina pavonica* for essential oil encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 386-394.
- Farris, E., Brown, D., Ramer-Tait, A., & Pannier, A. (2017). Chitosan-zein nano-in-microparticles capable of mediating in vivo transgene expression following oral delivery. *J Control Release*, 249, 150-161.
- Fatome, M., Courteille, F., Laval, J., & Roman, V. (1987). Radioprotective activity of ethylcellulose microspheres containing WR 2721, after oral administration. *Int J. Radiat. Biol.*, 52(1), 21-29.
- FDA. (2023, 06 29). *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Повратено од <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>
- Fioramonti, S., Stepanic, E., Tibaldo, A., Pavón, Y., & Santiago, L. (2019). Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double layer emulsions. *Food Research International*, 119, 931-940.
- Freitas, S., Hans, M., & Gander, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of controlled release*, 102, 313-332.
- Freytag, T., Dashevsky, A., Tillman, L., Hardee, G., & Bodmeier, R. (2000). Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *J Contr Rel*, 69(1), 197-207.
- Gadzinski, P., Froelich, A., Jadach, B., Wojtyłko, M., Tatarek, A., Białek, A., . . . Osmałek, T. (2023). Iontropic gelation and chemical crosslinking as methods for fabrication of modified-release gellan gum-based drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 15(108).
- Garcia-Contreras, L., Abu-Izza, K., & Lu, R. (1997). Biodegradable cisplatin microspheres for direct brain injection: Preparation and Characterization. *Pharm Dev Technol*, 2(1), 53-65.
- Ghanem, C., Pérez, M., Manautou, J., & Mottino, A. (2016). Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res*, 119-131.
- Giordano, F., Rossi, A., Bettini, R., Savioli, A., Gazzaniga, A., & Novak, C. (2002). Thermal behavior of paracetamol—Polymeric excipients mixtures. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 68, 575-590.
- Goh, C. H., Heng, P. W., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12.
- Gómez-Gaete, C., Retamal, M., Chávez, C., Bustos, P., Godoy, R., & Torres-Vergara, P. (2017). Development, characterization and in vitro evaluation of biodegradable rhein-loaded microparticles for treatment of osteoarthritis. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 96, 390-397.
- Goto, S., Kawata, M., Nakamura, M., Maekawa, K., & Aoyama, T. (1986). Eudragit RS and RL (acrylic esins) microcapsules as pH insensitive and sustained release preparations of ketoprofen. *J Microencapsul.*, 3(4), 293-304.
- Hales, D., Vlase, L., Porav, A. S., Bodoki, A., Barbu-Tudoran, L., Achim, M., & Tomuță, I. (2017). A quality by design (QbD) study on enoxaparin sodium loaded polymeric microspheres for colon-specific delivery. *Eur J Pharm Sci*, 249-361.
- Han, J., Guenier, A.-S., & Salmier, S. (2008). Alginate and Chitosan Functionalization for Micronutrient Encapsulation. *J. Agric. Food Chem.*, 56(7), 2528-2535.
- Hari, P., Chandy, T., & Sharma, C. (1996). Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. *J. Microencapsulation*, 13, 319-329.
- Hayatunnufus, R., Wati, P. G., & Budianto, E. (2019). Preparation, Characterization and Emulsion Efficiency test of simvastatin microencapsulation using polyblend of Poly(lactic) acid and Poly(ϵ -caprolactone). *Materials Science Forum*, 947, 21-25.

- Hazra, A., Dollimore, D., & Alexander, K. (2002). Thermal Analysis Of the evaporation of compound used in aromatherapy using thermogravimetry. *Thermochimica Acta*, 392-393, 221-229.
- Hekmatpou, D., Pourandish, Y., Farahani, P. V., & Parvizrad, R. (2017). The Effect of Aromatherapy with the Essential Oil of Orange on Pain and Vital Signs of Patients with Fractured Limbs Admitted to the Emergency Ward: A Randomized Clinical Trial. *Indian J Palliat Care.*, 23(4), 431-436.
- Hermann, J., & Bodmeier, R. (1998). Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 75-82.
- Higuchi, T. (1961). Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(10), 874-875.
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(12), 1145-1149.
- Higuchi, W. (1962). Analysis of Data on the Medicament Release from Ointments. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(8), 802-804.
- Hinze, J. (1955). Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes. *AICh J*, 1, 289-295.
- Hoo, C., Starostin, N., Paul, W., & Mecartney, M. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanopart Res*, 10(1), 89-96.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydr Polym*, 95(1), 50-6.
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., . . . Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *Int. J. Biol. Macromol.*, 62, 582-588.
- ICH Q10. (2008). *ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system*. Strasbourg: EMA.
- ICH Q11. (2011). *ICH Q11 Development and manufacture of drug substances*. Strasbourg: EMA.
- ICH Q8 (R2). (2009). *ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development - Scientific guideline*. Strasbourg: EMA.
- ICH Q9. (2015). *ICH guideline Q9 on quality risk management*. EMA/CHMP.
- Jelvehgari, M., & Montazam, S. H. (2012). Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation technique using derivatives cellulose and acrylate-methylacrylate copolymer as carriers. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 7(4), 144-152.
- Jelvehgari, M., Barar, J., Valizadeh, H., Shadrou, S., & Nokhodchi, A. (2011). Formulation, characterization and in vitro evaluation of theophylline-loaded Eudragit RS 100 microspheres prepared by an emulsion-solvent diffusion/evaporation technique. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16(6), 637-644.
- Jelvehgari, M., Dastmalch, S., & Nazila, D. (2012). Theophylline-ethylcellulose microparticles: screening of the process and formulation variables for preparation of sustained release particles. *Iran J Basic Med Sci*, 5(1), 608-24.
- Jendrzewska, I., Goryczka, T., Pietrasik, E., Klimontko, J., & Jampilek, J. (2020). X-ray and Thermal Analysis of Selected Drugs Containing Acetaminophen. *Molecules*, 25, 5909.
- Kan, S., Lu, J., Liu, J., Wang, J., & Zhao, Y. (2014). A quality by design (QbD) case study on enteric-coated pellets: Screening of critical variables and establishment of design space at laboratory scale. *AJPS*, 9(5), 268-278.
- Kanaujia, P., Lau, G., Ng, W., Widjaja, E., Schreyer, M., Hanefeld, A., . . . Tan, R. (2011). Investigating the effect of moisture protection on solid-state stability and dissolution of fenofibrate and ketoconazole solid dispersions using PXRD, HSDSC and Raman microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(9), 1026-35.
- Kelner, A., & Schacht, E. (2005). Tailor-made polymers for local drug delivery: release of macromolecular model drugs from biodegradable hydrogels based on poly(ethylene oxide). *J Control Release*, 101(1-3), 13-20.
- Kim, H., & Fassihi, R. (1997). Application of Binary Polymer System in Drug Release Rate Modulation. 2. Influence of Formulation Variables and Hydrodynamic Conditions on Release Kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 323-328.
- Klimová, K., & Leitner, J. (2012). DSC study and phase diagrams calculation of binary systems of paracetamol. *Termochim. Acta*, 550, 59-64.
- Korakianiti, E. (2009, 10 26-27). *New quality paradigm: New quality paradigm: Quality by Design" ICH Q8-9-10*. Повратено од EMEA: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/new-quality-paradigm-quality-design-design-ich-q8-q8-9-10-evdokia-korakianiti_en.pdf
- Korsmeyer, R., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25-35.

- Kulkarni, R., Mangond, B., Mutalik, S., & Sa, B. (2011). Interpenetrating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem–resin complex for controlled release application. *Carbohydr. Polym.*, 83, 1001–1007.
- Kulkarni, R., Nagathan, V., Biradar, P., & Naikawadi, A. (2013). Simvastatin loaded composite polyspheres of gellan gum and carrageenan: In vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 57, 238–244.
- Kumar, S., Kumar, R., & Gandhi, K. (1993). A simplified procedure for predicting d_{max} in stirred vessels. *Chem Eng Sci*, 3092-3096.
- Langenbucher, F. (1972). Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J. of Pharmacy and Pharmacology*, 24(12), 979-981.
- Langer, R., & Peppas, N. (1983). Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. *Journal of Macromolecular Science*, 23, 61-126.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 37(1), 106-126.
- Li, B.-Z., Wang, L.-J., Li, D., Bhandari, B., Li, S.-J., Lan, Y., . . . Mao, Z.-H. (2009). Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *J of Food Eng*, 92, 250-254.
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J of Pharmaceutics*, 363, 26-39.
- Li, Z., & Jiang, W. (2009). Interlayer conformations of intercalated dodecyltrimethylammonium in rectorite as determined by FTIR, XRD, and TG analyses. *Clays Clay Miner.*, 57, 194-204.
- Lipovetskaya, Y. (2010). *Microspheres: technologies and global markets*. Wllesley: BCC Research.
- Liu, Q., Dong, Q., Wang, M., Shi, L., Wu, Y., Yu, X., . . . Kong, W. (2010). Preparation, Characterization, and Pharmacodynamics of Exenatide-Loaded Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Microspheres. *Chem. Pharm. Bull.*, 58(11), 1474-1479.
- Lobo, F. A., de Aguirre, C. L., Silva, M. S., Grillo, R., de Melo, N. F., Oliveira, L. K., . . . Fraceto, L. (2011). Poly(hydroxybutyrate–Co-Hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide: Screening of conditions for preparation, physico-Chemical characterization, and in vitro release studies. *Polymer Bulletin*, 67(3), 479-495.
- Ma, L., & Liu, C. (2010). Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(2), 448-453.
- Maa, Y., & Hsu, C. (1996). Microencapsulation reactor scale-up by dimensional analysis. *J Microencap*, 13, 53-66.
- Maa, Y., & Hsu, C. (1999). Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharm. Dev.*, 4, 233-240.
- Madhusudana Rao, K., Krishna Rao, K., Sudhakar, P., Chowdoji Rao, K., & Subha, M. (2013). Synthesis and Characterization of pH Sensitive Poly (Hydroxy Ethyl Methacrylate-co-acrylamidoglycolic Acid) Based Hydrogels for Controlled Release Studies of 5-Fluorouracil. *J. of Applied Pharma. Sci.*, 62(11), 061-069.
- Mahmoud, A., El-Rasoul, S. A., Auda, S., & Ibrahim, M. (2013). Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. *Saudi Pharm J*, 21, 61-69.
- Mahou, R., & Wandrey, C. (2010). Alginate-Poly(ethylene glycol) Hybrid Microspheres with Adjustable Physical Properties. *Macromolecules*, 43(3), 1371–1378.
- Maia, J., Santana, M., & Re, M. (2004). The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Braz J Chem Eng*, 21, 1-12.
- Mandal, S., Kumar, S., Krishnamoorthy, B., & Basu, S. (2010). Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Bray. J. Pharm. Sci.*, 46(4), 785-793.
- Manjanna, K., Shivakumar, B., & Pramod-kumar, T. (2009). Formulation of oral sustained release aceclofenac sodium microbeads. *Int J Pharmtech Res*, 1(3), 940-952.
- Markets, R. a. (2024b). *Global Nutraceutical Excipients Market by Product Source (Organic Chemicals, Inorganic Chemicals), Functionality (Binders, Colorants, Flavors & Sweeteners), End Product, Formulation, Functionality Application and Region - Forecast to 2028*. Dublin: Research and Markets.
- Martinez, P. F., Sbaite, P., Benites, C., & Maciel, M. R. (2011). Thermal Characterization of Orange, Lemongrass, and Basil Essential Oils. *Chemical engineering transactions*, 24, 463-468.
- Martins, E., Renard, D., Poncelet, D., Davy, J., & Marquis, M. (2015). Oil core microcapsules by inverse gelation technique. *J. Microencapsul.*, 32(1), 86-95.
- Marto, J., Gouveia, L., Gonçalves, L., Gaspar, D., Pinto, P., Carvalho, F., . . . Almeida, A. (2016). A Quality by design (QbD) approach on starch-based nanocapsules: A promising platform for topical drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 143, 177-185.
- Masarudin, M. J., Cutts, S., Evison, B., Phillips, D., & Pigram, P. (2015). Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate

- vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. *Nanotechnol Sci Appl*, 8, 67-80.
- Mateovic, T., Kriznar, B., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2002). The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J Microencap*, 19, 29-36.
- Maximize Market Research. (2021). *Oral Solid Dosage Pharmaceutical Formulation Market: Industry Analysis and Forecast (2021–2027) by Dosage Form, Drug Release Mechanism, Distribution Channel, and Region*. Report.
- Mazzara, M., Ochyl, L., Hong, J., Moon, J., Prausnitz, M., & Schwendeman, S. (2018). Self-healing encapsulation and controlled release of vaccine antigens from PLGA microparticles delivered by microneedle patches. *Bioeng Transl Med*, 4(1), 116-128.
- Meng, F., Ma, G., Liu, Y., Qiu, W., & Su, Z. (2004). Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. *Colloids Surf*, 33(3-4), 177-183.
- Mestiri, M., Puisieux, F., & Benoit, J. (1993). Preparation and characterization of cis-platin-loaded polymethyl methacrylate microspheres. *Int J Pharm*, 89(3), 229-234.
- Michiu, D., Socaciu, M.-I., Fogarasi, M., Jimborean, A. M., Ranga, F., Mureşan, V., & Semeniuc, C. A. (2022). Implementation of an Analytical Method for Spectrophotometric Evaluation of Total Phenolic Content in Essential Oils. *Molecules*, 27, 1345.
- Mididoddi, P., & Repka, M. (2007). Characterization of hot-melt extruded drug delivery systems for onychomycosis. *Eur J Pharm Biopharm*, 66(1), 95-105.
- Mikkelsen, A., & Elgsaeter, A. (1995). Density distribution of calcium-induced alginate gels. A numerical study. *Biopolymers*, 36, 17-41.
- Miyazaki, Y., Onuki, Y., Yakou, S., & Takayama, K. (2006). Effect of temperature-increase rate on drug release characteristics of dextran microspheres prepared by emulsion solvent evaporation process. *Int J Pharm*, 324, 144-151.
- Murtaza, G., Ahmad, M., & Akhtar, N. (2009). Biowaiver study of oral tableted ethylcellulose microcapsules of a BCS class I drug. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 23(2), 175-186.
- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Saparbekova, A., & Miller, R. (2017). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 147-152.
- Narkar, M., Sher, P., & Pawar, A. (2010). Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. *AAPS PharmSciTech.*, 11, 267–277.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen*. Преземено 12 30, 2023 од <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen>
- NCI. (н.д.). *National Cancer Institute: Dictionaries*. Преземено 11 20, 2022 од National cancer institute: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bioactive-compound>
- NIST. (н.д.). *5.5.2.1. D-optimal designs*. Преземено 06 16, 2023 од National Institute of standards and technology: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri521.htm>
- NIST WebBook Chemie SRD 69. (2023). *Acetaminophen*. Преземено 12 30, 2023 од <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103902&Mask=4>
- Noghabi, M. S., & Molaveisi, M. (2019). Microencapsulation optimization of cinnamon essential oil in the matrices of gum Arabic, maltodextrin and inulin by spray-drying using mixture design. *J. Food Process Eng.*, 43(2), e13341.
- Noppakundilokrat, S., Piboon, P., Graisuwan, W., Nuisin, R., & Kiatkamjornwong, S. (2015). Encapsulated eucalyptus oil in ionically cross-linked alginate microcapsules and its controlled release. *Carbohydr Polym*, 131, 23-33.
- Noviendri, D., Jaswir, I., Taher, M., Mohamed, F., Salleh, H. M., Noorbatcha, I. A., . . . Abdullah, A. (2016). Fabrication of Fucoxanthin-Loaded Microsphere(F-LM) By Two Steps Double-Emulsion Solvent Evaporation Method and Characterization of Fucoxanthin before and after Microencapsulation. *J. Oleo. Sci.*, 65(8), 641-653.
- Ozcan, A., & Kandirmaz, E. A. (2018). Poly(vinyl alcohol) - (stearic acid) synthesis and use in lavender oil capsulation. *9th International Symposium on Graphic Engineering and Design* (стр. 189-196). Novi Sad: University of Novi Sad, Faculty of Technical sciences, Department of graphic engineering and design.
- Özdemir, N., & Tilkan, M. (2017). Investigation of the parameters affecting the release of flurbiprofen from chitosan microspheres. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 53(4), e00242.
- Palazzo, F., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Blasi, P., Rossi, C., & Ricci, M. (2013). Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin–palladium complex. *Int. J. Pharm.*, 440(2), 273-282.

- Palmieri, G., Cantalamessa, F., Di Martino, P., Nasuti, C., & Martelli, S. (2002). Lonidamine solid dispersions: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, 28(10), 1241-50.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm*, 309(1-2), 44-50.
- Paris, M., Ramirez-Corona, N., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2020). Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. *Journal of Food Engineering*, 282, 110024.
- Park, K., & Omidian, H. (2010). Introduction to Hydrogels. Bo R. Ottenbrite, K. Park, & T. Okano, *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (стр. 1-16). New York: Springer.
- Park, S.-J., & Kim, S.-H. (2004). Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. *J. Colloid Interface Sci.*, 15(271), 336-341.
- Patel, K., & Patel, M. (2014). Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing nicorandil. *Int J Pharma Investig*, 4(1), 32-37.
- Patil, J., Kamalapur, M., Marapur, S., & Kadam, D. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, 5(1), 241-248.
- Pavelková, M., Kubová, K., Vysloužil, J., Kejdušová, M., Vetchý, D., Celer, V., . . . Kulich, P. (2017). Biological Effects of Drug-Free Alginate Beads Cross-Linked by Copper Ions Prepared Using External Ionotropic Gelation. *AAPS PharmSciTech*, 18, 1343-1354.
- Pawar, S., & Edgar, K. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279-3305.
- Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N. (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polym Int*, 69(1-5).
- Peppas, N., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190(28), 75-81.
- Pérez-Martínez, J., Morillo, E., Maqueda, C., & Ginés, J. (2001). Ethyl cellulose polymer microspheres for controlled release of norfluazon. *Pest Manage Sci*, 57(8), 688-694.
- Ph.Eur. 0049. (2022). *Paracetamol*. Strasbourg: EDQM.
- Ph.Eur. 0337. (2022). *Hydroxypropylcellulose*. Strasbourg: EDQM.
- Ph.Eur. 0625. (2017). Sodium alginate. Bo *Ph.Eur. 11.1* (стр. 3971).
- Ph.Eur. 11.2, 0625 (01/2017). (2017). Bo *European Pharmacopoeia* (Том 11.2). Strasbourg: EDQM.
- Ph.Eur. 1811. (2022). *Sweet orange oil*. Strasbourg: EDQM.
- Ph.Eur. 2.9.3. (2023). *Dissolution test for solid dosage forms*. Strasbourg: EDQM.
- Ph.Eur. 5.17.1. (2023). *Recommendations on dissolution testing*. Strasbourg: EDQM.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (1999). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract: I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, 59(2), 229-242.
- Pillay, V., & Danckwerts, M. (2002). Textural Profiling and Statistical Optimization of Crosslinked Calcium-Alginate-Pectinate Cellulose Acetophthalate Gelisphere Matrices. *J. Pharm. Sci.*, 91, 2559-2570.
- Pogány, J. (2008). ICH pharmaceutical quality system Q10. *WHO Drug Information*, 22(3), 177-181.
- Poncelet, D., Babak, V., Dulieu, C., & Picot, A. (1999). A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification internal ionotropic gelation. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 155(2-3), 171-176.
- Pouchert, C. (1981). *The Aldrich Library of Infrared Spectra*. Милњаукее: Aldrich Chemical Co. Inc.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Razavi, S. H., Shabani, A., & Aubourg, S. (2014). Impact of wall materials on physicochemical properties of microencapsulated fish oil by spray drying. *Food Bioprocess Technol*, 7, 2354-2365.
- Prasad, S. N., Patel, H. K., & Gothoskar, A. (2018). QbD-based development and evaluation of enteric coated mucoadhesive microcapsules of amoxicillin trihydrate as a novel chronotherapeutic approach for treatment of bacterial infections. *Int J Pharm Pharm Sci*, 10(8), 90-100.
- Przybyslawska, M., Amelian, A., & Winnicka, K. (2013). Preparation of ciprofloxacin-encapsulated poly-ε-caprolactone microcapsules by the solvent evaporation technique. *e-Polymers*, 13(1), 030.
- Qi, F., Wu, J., Hao, D., Yang, T., Ren, Y., Ma, G., & Su, Z. (2014). Comparative studies on the influences of primary emulsion preparation on properties of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres. *Pharm. Res.*, 31, 1566-1574.
- Rawat, M., Saraf, S., & Saraf, S. (2007). Influence of selected formulation variables on the preparation of enzyme-entrapped Eudragit S100 microspheres. *AAPS PharmSciTech*, E116.
- Reserach and Markets. (2024a). *Herbal Medicine Global Market Report*. Dublin: Reserach and Markets.

- Ritger, P., & Peppas, N. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23-36.
- Sachen, N., Pushkar, S., Jha, A., & Bhattacharya, A. (2009). Sodium alginate: The wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*, 2(8), 1191-1199.
- Sah, H. (2000). Ethyl formate-alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. *Int J Pharm*, 195, 103-113.
- Salisu, A., Sanagi, M. M., Naim, A. A., Abd, K. J., Ibrahim, W. A., & Abdulganiyu, U. (2016). Alginate graft polyacrylonitrile beads for the removal of lead from aqueous. *Polym. Bull.*, 73(2), 519-537.
- Sartorius. (2017). *MODDE 12 User Guide*. Sartorius Stedim Data Analytics.
- Sellime, S., Younes, I., Ayed, H. B., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., . . . Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *Int J Biol Macromol*, 72, 1358-67.
- Sevda, S., & Rodrigues, L. (2011). The Making of Pomegranate Wine using Yeast immobilized on sodium alginate. *Afr. J. Food Sci.*, 5(5), 299-304.
- Shah, S., Patel, C., & Trivedi, H. (1994). Fenton's reagent-initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto sodium alginate. *J Appl Polym Sci*, 51, 1421-1426.
- Shah, B., Khunt, D., Bhatt, H., Misra, M., & Padh, H. (2016). Intranasal delivery of venlafaxine loaded nanostructured lipid carrier: Risk assessment and QbD based optimization. *JDDST*, 33, 37-50.
- Sheikhlu, M. G., Ravari, N. S., Behrouzi, M., Goodarzi, N., Larijani, R. S., Varshochian, R., . . . Rouini, M. R. (2023). Engineered PLGA microspheres for extended-release of naltrexone: in vitro, in vivo, and IVIVR. *Pharm Dev Technol*, 28(2), 190-199.
- Shiraishi, S., Imai, T., & Otagiri, M. (1993). Controlled-release preparation of indomethacin using calcium alginate gel. *Biol Pharm Bull*, 1164-1168.
- Siepmann, J., & Peppas, N. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 163-174.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydr. Polym.*, 170, 1-14.
- Singh, B., & Kim, K. (2005). Effects of divalent cations on drug encapsulation efficiency of deacylated gellan gum. *J. Microencapsul.*, 22, 761-771.
- Smith, B. (1999). *Infrared Spectral Interpretation: A systematic approach*. CRC Press.
- Soliman, E., El-Moghazy, A., El-Din, M. M., & Massoud, M. (2013). Microencapsulation of essential oils with alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. *J. encapsulation adsorpt. sci.*, 3(1), 48-55.
- Stallmann, H., Faber, C., Bronckers, A., Amerongen, A. N., & Wuisman, P. (2006). In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile BMC. *BMC Musculoskelet. Diord.*, 7(18).
- Straits research*. (2022, 05 01). Преземено 11 05, 2022 од Microspheres MarketInformation by Raw Material (Glass, Polymer, Ceramic), Type (Hollow, Solid), Application (Medical Technology, Paintings & Coatings), and Region — Forecast till 2030: <https://straitresearch.com/report/microspheres-market>
- Subedi, G., Shrestha, A. K., & Shaky, S. (2016). Study of Effect of Different Factors in Formulation of Micro and Nanospheres with Solvent Evaporation Technique. *Open. Pharm. Sci. J.*, 3, 182-195.
- Sullad, A., Manjeshwar, L., & Aminabhavi, T. (2011). Microspheres of carboxymethyl guar gum release of abacavir sulphate: Preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.*, 122(1), 452-460.
- Sutthapitaksakul, L., Thanawuth, K., Dass, C., & Sriamornsak, P. (2021). Optimized Taste-Masked Microparticles for Orally Disintegrating Tablets as a Promising Dosage Form for Alzheimer's Disease Patients. *Pharmaceutics*, 13(7), 1046.
- Takishima, J., Onishi, H., & Machida, Y. (2002). Prolonged intestinal absorption of cephradine with chitosan-coated ethylcellulose microparticles in rats. *Biol Pharm Bull*, 25, 1498-1502.
- Thies, C. (1992). Formation of degradable drug-loaded microparticles by in-liquid drying processes. Bo M. Donbrow, *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy* (стр. 47-71). London: CRC Press.
- Trifković, K., Milišević, N., Djordjević, V., Zdunić, G., Krušić, M. K., Knežević-Jugović, Z., . . . Bugarski, B. (2015). Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: Water sorption and release properties. *J Biomater Appl*, 30(5), 618-631.
- USP. (2022). *Acetaminophen Extended-Release Tablets*. Rockville, MD: USP-NF. doi:https://doi.org/10.31003/USPNF_M205_03_01
- USP-NF. (2022). Pharmaceutical Dosage form. Bo U.S Pharmacopeial Convention Committee of Revision, *USP-NF Online* (44th изд.). United States Pharmacopeial Convention.

- USP-NF. (2021). *Acetaminophen Tablets*. USP-NF. doi:https://doi.org/10.31003/USPNF_M200_05_01
- Uyen, N. T., Hamid, Z. A., Tram, N. X., & Ahmad, N. (2020). Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, *153*, 1035–1046.
- Velmurugan, P., Ganeshan, V., Nishter, N. F., & Jonnalagadda, R. R. (2017). Encapsulation of orange and lavender essential oils in chitosan nanospherical particles and its application in leather for aroma enrichment. *Surfaces and Interfaces*, *9*, 124–132.
- Vilela, J. A., Perrechil, F. d., Picone, C. S., Sato, A. C., & Cunha, R. L. (2015). Preparation, characterization and in vitro digestibility of gellan and chitosan–gellan microgels. *Carbohydr. Polym.*, *117*, 54–62.
- Wanderson da Silva, M., Fernandes de Araujo, J., Feitosa, B., Oliveira, J., Viana Kotzebue, L., Silva Agostini, D., . . . Silva, A. (2021). Lemongrass (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf) essential oil microparticles: Development, characterization, and antioxidant potential. *Food Chem*, *355*.
- Wang, X., Wu, Q., Liu, A., Anadón, A., Rodríguez, J.-L., Martínez-Larrañaga, M.-R., . . . Martínez, M.-A. (2017). Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug Metab Rev*, *49*(4), 395–437.
- Weibull, W. (1951). A Statistical Distribution Function of Wide Applicability. *Journal of Applied Mechanics*, *18*, 293–297.
- Willette, R. (2004). Analgetic agents. Bo J. Block, & J. Beale, *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry* (стр. 761-762). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Yang, C., Tsay, S., & Tsiang, R. (2000). An enhanced process for encapsulating aspirin in ethylcellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion. *J Microencapsul*, *17*, 269–277.
- Yang, Y.-Y., Chung, T.-S., & Ng, N. P. (2001). Morphology, drug distribution and in vitro release profiles on biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, *22*, 231–241.
- Yang, Y.-Y., Chung, T.-S., Bai, X.-L., & Chan, W.-K. (2000). Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci.*, *55*(12), 2223–2236.
- Zapata, F., López-Fernández, A., Ortega-Ojeda, F., Quintanilla, G., García-Ruiz, C., & Montalvo, G. (2021). Introducing ATR-FTIR Spectroscopy through Analysis of Acetaminophen Drugs: Practical Lessons for Interdisciplinary and Progressive Learning for Undergraduate Students. *J. Chem. Educ.*, *98*(8), 2675–2686.
- Zelikin, A., Becker, A., Johnston, A., Wark, K., Turatti, F., & Caruso, F. (2007). A general approach for DNA encapsulation in degradable polymer microcapsules. *ACS Nano*, *1*(1), 63–9.
- Zhang, C., Yang, L., Wan, F., Bera, H., Cun, D., Rantanen, J., & Yang, M. (2020). Quality by Design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery. *Int J of Pharma*, 119441.
- Zhang, H., Tumarkin, E., Peerani, R., Nie, Z., Sullan, R. M., Walker, G., & Kumacheva, E. (2006). Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology. *J. Am. Chem. Soc.*, *128*, 12205–12210.
- Zhao, Q., Gao, Y.-S., Jin, F., & Zhu, L.-Y. (2022). Preparation Process Optimization and Performance Characterization of Feed Plant Essential Oil Microcapsules. *Molecules*, *27*(20), 7096.
- Zhao, X.-H., & Tang, C.-H. (2016). Spray-drying microencapsulation of CoQ10 in olive oil for enhanced water dispersion, stability and bioaccessibility: influence of type of emulsifiers and/or wall materials. *Food Hydrocoll*, *61*, 20–30.

Листа на публикувани трудови поврзани со докторската дисертација

- [1] Tamara Georgievska, Katerina Atkovska, Kiril Lisichkov, *The influence of stirring rate in emulsion solvent evaporation method on biopharmaceutical properties of microparticles containing acetaminophen*, Contributions, Section of Natural, Mathematical and Biotechnical Sciences, MASA, Skopje, (2024) – In Press
- [2] Tamara Georgievska, Katerina Atkovska, Stefan Kuvendziev, Mirko Marinkovski, Erhan Mustafa, Predrag Mišić, Kiril Lisichkov, *Recent advances in microencapsulation of essential oils for textile functionalization with antimicrobial properties*, Advances in applied research on textile and materials – X Proceedings of the 10th International Conference of Applied Research on Textile and Materials (CIRATM), Springer, (2023)
- [3] Tamara Georgievska, Katerina Atkovska, Stefan Kuvendziev, Mirko Marinkovski, Erhan Mustafa, Predrag Mišić, Kiril Lisichkov, *Design of aromatherapy and medical functional textile by microcapsules with green repellents and essential oils*, 15th Scientific-Professional Symposium Textile Science and Economy, Zagreb, pp.156-160, (2023)
- [4] Tamara Georgievska, Kiril Lisičkov, Mirko Marinkovski, Stefan Kuvendziev, *Microencapsulation of active pharmaceutical ingredients in biomaterial encapsulating agents*, Šesti naučno-stručni skup POLITEHNIKA, Belgrad: Akademija tehničkih strukovnih studija Beograd, pp.221-225, (2021)