

DRAGANA PEPIĆ  
MILICA SPASOJEVIĆ  
MARIJA S. NIKOLIĆ  
JASNA ĐONLAGIĆ

Tehnološko-metalurški fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

NAUČNI RAD

UDK 678.7:66.095.262.2:547.216

DOI: 10.2298/HEMIND0806329P

## DOBIJANJE POROZNIH BIODEGRADABILNIH MIKROSFERA POLI(BUTILEN SUKGINATA)

*Cilj ovog rada je bio pronalaženje optimalnih uslova za dobijanje poroznih mikrosfera na bazi biodegradabilnog poli(butilensukcinata), PBS. Neporozne PBS mikrosfere su dobijene emulzionim postupkom uz otparavanje rastvarača u prisustvu poli(vinil alkohola), PVA, kao stabilizatora emulzije. Tokom izrade mikrosfera menjani su uslovi kao što su: brzina mešanja, odnos organska/vodena faza, PBS koncentracija i koncentracija emulgatora (PVA), koji imaju značajan uticaj na veličinu čestica i morfologiju mikrosfera. Skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) utvrđena je veličina mikrosfera, raspodela veličina čestica kao i morfologija površine mikrosfera. Ustanovljeni su optimalni uslovi za dobijanje neporoznih mikrosfera: koncentracija PBS rastvora od 10 mas%, PVA koncentracija od 1 mas%, odnos organska/vodena faza = 1/20 i brzina mešanja 800 min<sup>-1</sup>. Porozne PBS mikročestice su pravljene pri optimalnim uslovima u prisustvu različitog sadržaja heksana i poli(etilenoksida), PEO, kao porogena. Kao rezultat dobijeno je da mikrosfere pokazuju različitu poroznost kao i različitu veličinu pora unutar čestica. Srednja veličina čestica mikrosfera kod kojih je korišćen PEO kao porogen bila je od 100 do 122 μm, a kod mikrosfera sa heksanom kao porogenom srednja veličina čestica se kretala od 87 do 97 μm. Prividna gustina poroznih čestica kod mikrosfera sa PEO kao porogenom bila je u opsegu od 0,16 do 0,23 g/cm<sup>3</sup>, dosta manje od prividne gustine neporoznih mikrosfera, 0,40 g/cm<sup>3</sup>. In vitro degradacioni testovi poroznih mikrosfera su izvođeni u puferskom rastvoru (pH 7) na 37 °C. Posle inkubacije mikrosfera od jednog meseca u puferu ustanovljeno je da dolazi do delimične degradacije polimernih mikrosfera.*

Primena mikrosfera na bazi alifatskih biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera znatno se povećala poslednjih godina u kozmetici, farmaciji i drugim biološkim i medicinskim oblastima. To im omogućava njihova jedinstvena struktura, koja uključuje malu gustinu i mogućnost korišćenja njihovog unutrašnjeg prostora za inkapsulaciju lekova, vitamina, proteina itd. Glavna prednost biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera je u tome što ne postoji potreba za njihovim hiruškim uklanjanjem iz organizma posle njihove primene. Sintetski alifatski poliestri i kopoliestri se mogu koristiti kao nosači za kontrolisano otpuštanje lekova [1,2] i proteina, zbog njihovih dobrih mehaničkih svojstava, netoksičnosti, procesibilnosti, biokompatibilnosti sa ljudskim organizmom i biodegradabilnosti. Iako je broj biodegradabilnih polimera veliki, samo ograničen broj polimera je pogodan kao nosač za kontrolisano doziranje lekova. Postupak kontrolisanog otpuštanja lekova omogućava da se održi terapijska koncentracija leka u telu, određeno vreme i na određenom mestu, otpuštanjem leka predvidivom i kontrolisanom brzinom.

Biodegradabilni polimeri koji se koriste kao nosači za kontrolisano otpuštanje lekova uglavnom se hidrolitički degradiraju mehanizmom erozije na dva različita načina. Erozija se može odvijati po celoj zapremini ili po spoljnoj površini polimerne matrice. Za eroziju po celoj zapremini karakteristično je da se javlja kada je prodiranje vode brže od erozije matrice pa dolazi do gu-

bitka masa, više-manje uniformno po matrici i naziva se homogena erozija. Veličina nosača ostaje ista, dok erozija ne dostigne kritični nivo kada se urušava i menja čitava mikrostruktura. Do površinske erozije dolazi kada je prodiranje vode sporije od erozije matrice pa se materijal gubi samo sa površine nosača. Veličina nosača postepeno opada dok mikrostruktura u unutrašnjosti ostaje neizmenjena.

Pored mnogih alifatskih poliestara, kao što su: poli(laktid), poli(laktid-co-glikolid) i poli(ε-kaporlakton), poli(butilensukcinat) intenzivno je izučavan semi-kristalinični polimer sa mnogim interesantnim svojstvima kao što su biodegradabilnost, procesibilnost u stanju rastopa i hemijska otpornost, a pokazuje i veliku termičku rezistentnost i veću temperaturu topljenja, 116 °C u poređenju sa ostalim biodegradabilnim polimerima [3]. U cilju poboljšanja biodegradabilnih osobina poli(butilensukcinata), PBS, za njegovu specifičnu primenu, sintetisani su razni kopolimeri ovog poliestra koji pokazuju znatno veći stepen degradacije u poređenju sa homopolimerom, poli(butilensukcinatom) [4,5].

Mikrosfere biodegradabilnih homopolimera i kopolimera, najčešće se dobijaju metodama zasnovanim na isparavanju hidrofobnog rastvarača polimera i faznoj separaciji. Ulje-u-vodi (O/W), tehnika sa isparavanjem rastvarača, najrasprostranjeniji je metod mikroenkapsulacije hidrofobnih lekova u polimernu matricu, zahvaljujući relativno lakom procesiranju [1,6,7]. Ona podrazumeva rastvaranje polimera u isparljivom organskom rastvaraču, najčešće metilenhloridu (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) i dispergovanje ili rastvaranje leka u polimernom rastvoru. Ovako dobijena organska faza se ukapava u vodenu fazu, koja sadrži stabilizator najčešće poli(vinil alkohol) ili želatin,

Autor za prepisku: J. Đonlagić, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd.

E-pošta: jasna@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 15. septembar 2008.

Rad prihvaćen: 25. septembar 2008.

uz snažno mešanje do formiranja kapljica. Nemešljivost ove dve faze obezbeđuje nastajanje stabilne emulzije. Uloga stabilizatora je da zaštiti kapljice od koalescencije i koagulacije a samim tim stabilizuje emulziju. Da bi se formirale mikrosfere, organski rastvarač prvo mora da difunduje u vodenu fazu a onda isparava sa međufazne površine voda/vazduh. Taloženje polimera se ostvaruje isparavanjem rastvarača, pri čemu se proces može ubrzati smanjenjem pritiska ili dodatkom nerastvarača. Dobijene mikrosfere očvršćavaju, odvajaju se od vodene faze, peru i suše.

Kada se mikrosfere dobijaju primenom ove tehnike, brojni procesni parametri utiču na finalnu strukturu mikrosfera: izbor rastvarača, stabilizatora, viskoznost faze, odnos dispergovane i kontinualne faze, brzina mešanja, procesna temperatura i vreme. Pažljivom modifikacijom procesnih uslova se mogu dobiti sfere veličine od 10 do nekoliko stotina mikrona. Ukoliko se mikrosfere koriste za kontrolisano otpuštanje leka, bitno je znati kojom se brzinom oslobađa lek iz njegove polimerne matrice. Poznato je da hemijski sastav i struktura polimera, molarna masa kao i morfologija uzorka imaju veliki uticaj na brzinu degradacije matrice. Prisustvo hidrofilnog polimera u polimernoj matrici može da povećava brzinu erozije odnosno degradacije polimerne matrice, a time i otpuštanja leka. Istraživanja na mikrosferama na bazi smeša poli( $\epsilon$ -kaprolaktona), PCL, i hidrofilnog poli(etilen oksida), PEO, pokazala su da je brzina otpuštanje leka veća kod onih čestica sa većim udelom PEO. To je objašnjeno povećanom interakcijom između mikrokapsula koje sadrže hidrofilni polimer i hidrofilnog puferskog rastvora u kojem je vršeno ispitivanje [8].

Takođe, veličina mikrosfera, geometrija i poroznost sfera, kao i okolina (pH i temperatura), utiču na brzinu oslobađanja leka iz mikrosfera. Veličina pora u mikrosferama može da se kontroliše i sastavom polimera, kao što je pokazano na primeru mikrosfera poli(butilensukcinata) dobijenih u prisustvu drugog polimera poli( $\epsilon$ -kaprolaktona). Veličina pora se smanjuje u polimernom nosaču sa povećanjem udela PCL u poroznim PBS mikrosferama, što se odražava na smanjenje brzine otpuštanja leka [9,10].

U okviru ovog rada prikazana je optimizacija uslova dobijanja neporoznih mikrosfera poli(butilen sukcinata), PBS, emulzionim postupkom uz otparavanje lako isparljivog rastvarača. Prethodno sintetisani alifatski poliestar je okarakterisan  $^1\text{H}$  NMR analizom, određivanjem graničnog viskozitetnog broja i gel propusnom hromatografijom (GPC). Koncentracija polimera, koncentracija stabilizatora emulzije, odnos organska/vodena faza i brzina mešanja su faktori koji su varirani da bi se odredili optimalni uslovi za dobijanje neporoznih mikrosfera, tj. kakav je uticaj tih faktora na morfologiju i veličinu čestica. Zatim, porozne mikrosfere su dobijene emulzionim postupkom uz otparavanje rastvarača, pri optimalnim

uslovima, u prisustvu heksana ili PEO kao porogena. Ispitan je uticaj vrste i koncentracije porogena na veličinu i poroznost mikrosfera što je praćeno skenirajućom elektronskom mikroskopijom i određivanjem prividne gustine mikrosfera. *In vitro* degradacija dobijenih mikrosfera je vođena mesec dana u puferskom rastvoru na 37 °C, posle čega je određena prividna gustina mikročestica, a morfologija je izučavana skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Sinteza PBS

Za sintezu poliestra korišćen je postupak izmene alkohola, odnosno transesterifikacija, polazeći od dimetilsukcinata (DMS) i 1,4-butandiolu (BD), uz katalizator titan(IV)-butoksid. Sinteza je vođena na 220 °C, pod sniženim pritiskom, 0,2–0,5 mmHg, uz izdvajanje metanola kao sporednog proizvoda. Dobijeni polimer je ohlađen u atmosferi azota, rastvoren u hloroformu i pretaložen ukapavanjem u ohlađeni metanol. Polimer je sušen na temperaturi od 60 °C, a zatim pod sniženim pritiskom na sobnoj temperaturi.

### Karakterizacija PBS

1. Struktura sintetisanog poliestra je utvrđena  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. Uzorak je rastvoren u deuterisanom hloroformu, a kao referentni standard pri dobijanju spektra korišćen je tetrametilsilan. Spektar je dobijen na aparatu Varian-GEMINI-200 (200 MHz).

2. Polimer je, u pogledu veličine makromolekula, okarakterisan viskozimetrijom razblaženih rastvora, tj. određivanjem graničnog viskozitetnog broja Ubbelohde-ovim viskozimetrom na 25 °C u hloroformu. Vrednost graničnog viskozitetnog broja dobijenog PBS je iznosila 64,5  $\text{cm}^3/\text{g}$ .

3. Gel-propusnom hromatografijom (GPC) određena je veličina i raspodela veličine molekula na aparatu Waters 2414 na 30 °C. Molarna masa srednja po brojnoj zastupljenosti,  $M_n$ , PBS je iznosila 16170 g/mol, a molarna masa srednja po masenoj zastupljenosti,  $M_w$ , je iznosila 40690 g/mol, dok je stepen polidisperznosti bio 2,51.

### Dobijanje mikrosfera

Određena količina polimera je rastvorena u hloroformu (organska faza) i pomešana sa rastvorom PVA (Fluka,  $M_w = 130000$  g/mol) u vodi (vodena faza) u zadanom odnosu. Faze se mešaju 22 časa, na atmosferskom pritisku i sobnoj temperaturi pri određenoj brzini mešanja pri čemu dolazi do isparavanja rastvarača tj. hloroforma. Sve se potom procedi, ispere vodom nekoliko puta i suši.

Pri dobijanju poroznih mikrosfera primenjena je slična procedura, a kao porogeni su korišćeni heksan i poli(etilen oksid), PEO.

## Karakterizacija mikrosfera

### Analiza veličine i raspodele veličina mikrosfera i pora

Morfologija i veličina mikrosfera je ispitivana pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) JEOL JSM 5800. Dobro osušeni uzorci su, uz rotiranje, prevučeni tankim slojem Pd-Pt legure i mikrostruktura je posmatrana na SEM-u pri povećanju napona od 20 kV. Da bi odredili unutrašnju morfologiju sfera, veličnu i raspodelu veličina pora, uzorci su ohladjeni pomoću tečnog azota i nasumično sečeni žiletom. Za određivanje veličina dobijenih mikrosfera korišćen je program Image J.

### Određivanje prividne gustine mikrosfera

Za određivanje prividne gustine korišćene su staklene kapilare sa zatopljenim krajem. Zapremina kapilare se određuje merenjem mase kapilare pre i posle punjenja sa vodom poznate gustine (pomoću šprica) i izračunava na osnovu jednačine:

$$V = w_v / \rho_v$$

gde je  $V$  – zapremina kapilare,  $w_v$  – masa vode i  $\rho_v$  – gustina vode na sobnoj temperaturi.

Merenjem mase kapilare pre i posle punjenja suvim praškastim uzorkom polimera i na osnovu prethodno određene zapremine kapilare, prividna gustina se određuje na osnovu jednačine:

$$\rho = w/V$$

gde je  $\rho$  – prividna gustina,  $w$  – masa uzorka u kapilari i  $V$  – zapremina kapilare.

### Test hidrolitičke degradacije

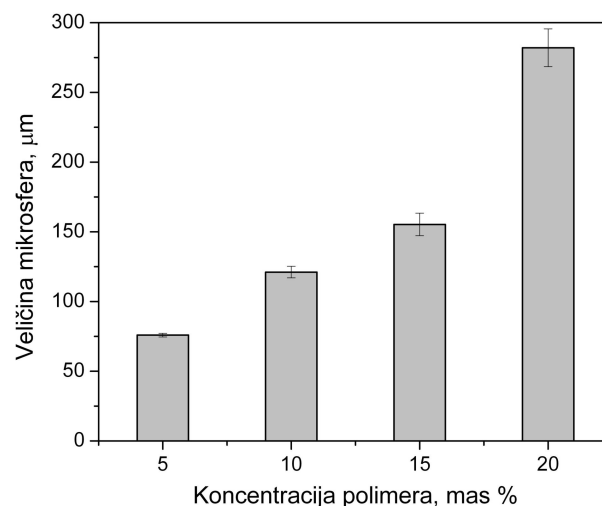
Hidrolitička degradabilnost [2,11] dobijenih poroznih i neporoznih mikrosfera je rađena u fosfatnom puferском rastvoru, pH 7,00, u inkubatoru na 37 °C. Određena količina uzorka mikrosfera (50 mg) potopljena je u puferски rastvor u epruveti i ostavljena na datoj temperaturi mesec dana, pri čemu je puferски rastvor menjan svakih sedam dana. Posle zadatog vremena inkubacije polimerne mikrosfere su ispirane destilovanom vodom i sušene do konstantne mase. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je analizirana morfologija mikrosfera posle mesec dana inkubacije, a određena je i prividna gustina degradiranih mikročestica.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Dobijanje neporoznih mikrosfera

Pri izradi neporoznih PBS mikrosfera ispitivani su uticaji pojedinih parametara na veličinu i morfologiju mikrosfera. Pri variranju jednog parametra, neophodno je ostale parametre izrade držati konstantnim. Analiziran je uticaj koncentracije rastvora polimera, koncentracije emulgatora u vodenoj fazi, odnos organska/vodena faza kao i uticaj brzine mešanja.

Da bi ispitali uticaj koncentracije polimera [12] na veličinu dobijenih mikrosfera, mikrosfere su sintetisane pri različitim koncentracijama polimera u rastvoru od 5 do 20 mas%. Na slici 1 date su vrednosti srednjeg prečnika mikrosfera u zavisnosti od koncentracije polimera. Na slici 2 prikazani su SEM mikrografi dobijenih PBS mikrosfera.



Slika 1. Zavisnost srednjeg prečnika mikrosfera od promene koncentracije polimera u organskoj fazi.

Figure 1. Dependence of the average size of the microcapsules as a function of the polymer concentration.

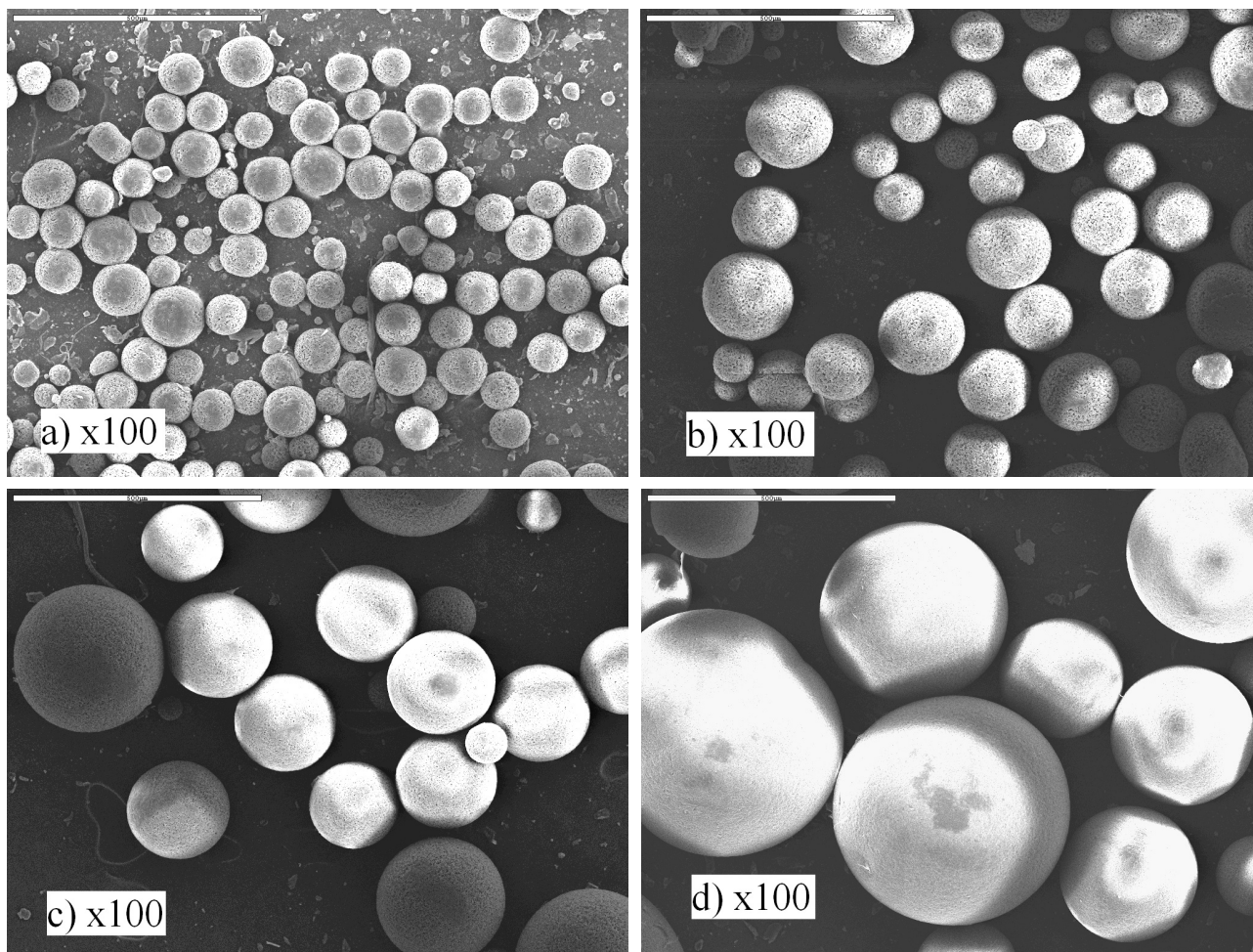
Uočeno je da sa povećanjem koncentracije polimera od 5 do 20 mas% srednji prečnik dobijenih mikrosfera raste od 75 do 282 μm. Što je koncentracija polimera veća, teže se razbija viskozna organska faza, a samim tim nastaju kapljice koje su krupnije, a iz njih i krupnije mikrosfere.

Da bi ispitali uticaj koncentracije stabilizatora emulzije [8,9,12] PVA, na veličinu dobijenih mikrosfera, mikrosfere su sintetisane pri različitim koncentracijama PVA od 0,5 do 2 mas%.

Ustanovljeno je da je prečnik čestica opadao od 121 do 86 μm sa porastom koncentracije upotrebljenog emulgatora (slika 3). Pošto emulgator utiče na efikasnost dispergovanja organske faze i stabilizuje dispergovane čestice, onda će i sa povećanjem koncentracije emulgatora nastati manje i stabilnije mikrosfere. Srednja veličina mikrokapsula postaje sve manja sa povećanjem koncentracije emulgatora zbog suzbijanja agregacije dispergovanih čestica usled dejstva odbojne sile emulgatora.

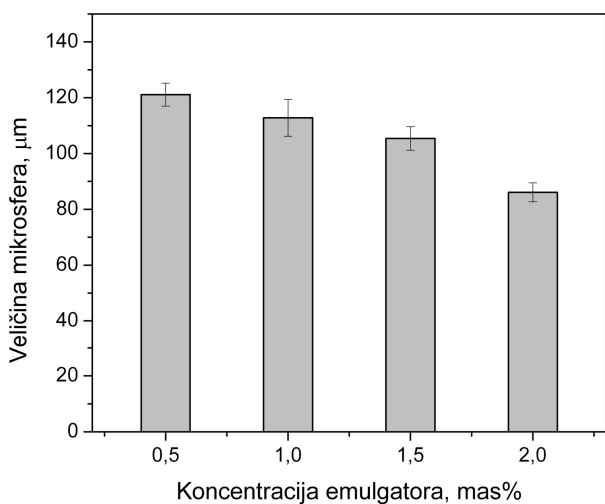
Da bi ispitali uticaj odnosa organske i vodene faze [12] na veličinu dobijenih mikrosfera, mikrosfere su sintetisane pri različitim odnosima organske i vodene faze od 1/25 do 1/10, pri konstantnim ostalim parametrima.

Sa povećanjem udela organske faze srednji prečnik mikrosfera je rastao od 101 do 143 μm (slika 4). Dobijeni rezultat se može objasniti činjenicom da, pri konstantnoj masi polimera, sa smanjenjem zapremine vode-



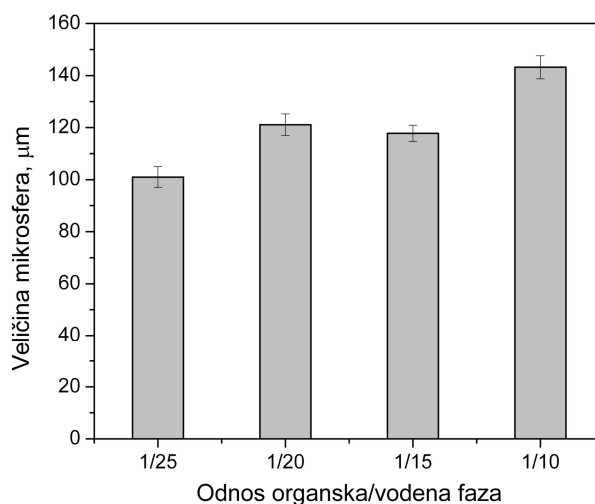
Slika 2. SEM slike mikrosfera dobijenih pri koncentraciji emulgatora 0,5 mas%, odnosu  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}=1/20$ , brzini mešanja  $600 \text{ min}^{-1}$  i koncentraciji polimera u organskoj fazi (a) 5 mas%, (b) 10 mas%, (c) 15 mas% i (d) 20 mas%.

Figure 2. SEM photographs of microcapsules prepared with concentration of emulsifier 0.5 mass%,  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  ratio 1/20, stirring rate  $600 \text{ min}^{-1}$  and the polymer concentration in the organic phase (a) 5 mass% (b) 10 mass% (c) 15 mass% and (d) 20 mass%.



Slika 3. Zavisnost srednjeg prečnika mikrosfera od promene koncentracije emulgatora.

Figure 3. Dependence of the average size of the microcapsules as a function of the concentration of emulsifier.



Slika 4. Zavisnost srednjeg prečnika mikrosfera od promene odnosa organska/vodena faza.

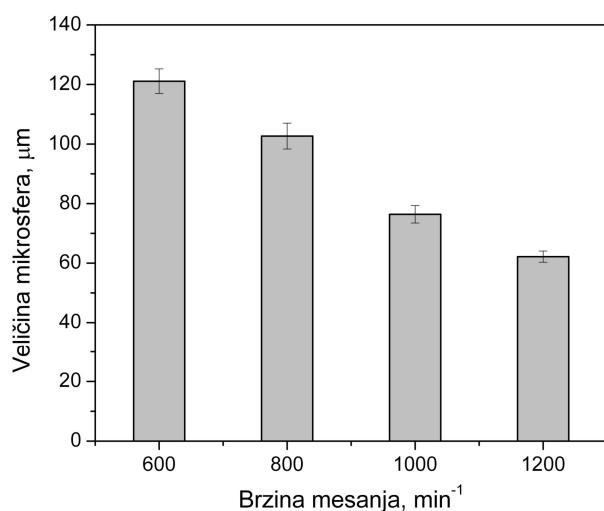
Figure 4. Dependence of the average size of the microcapsules as a function of the organic/aqueous ratio.

ne faze raste viskoznost. Povećana viskoznost otežava razbijanje organske faze, a usled toga nastaju krupnije kapljice a od njih i krupnije mikrosfere.

Da bi se ispitao uticaj brzine mešanja [8,12] na veličinu mikrosfera, pri dobijanju mikrosfera varirane su brzine mešanja pri konstantnim ostalim parametrima (slika 5).

Uočeno je da pri promeni brzine mešanja od 600 do 1200  $\text{min}^{-1}$  dolazi do opadanja prečnika mikrosfera od 121 do 62  $\mu\text{m}$ . Što je veća brzina mešanja veća je i energija koja razbija emulziju u male kapljice, pa su i nastale kapljice manje a samim tim i mikrosfere koje od njih nastaju. Iako se pri većim brzinama mešanja dobijaju manje sfere, velike brzine nisu povoljne jer se sfere deformišu, a to nije poželjno za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova.

Takođe, analizom histograma, izučavan je uticaj procesnih parametara na veličinu i širinu raspodele veličina dobijenih mikrosfera. Tako, na primer, sa slike 6 može se uočiti da su najzastupljenije mikrosfere veličine iz-



Slika 5. Zavisnost srednjeg prečnika mikrosfera od promene brzine mešanja.

Figure 5. Dependence of the average size of the microcapsules as a function of the stirring rate.

među 80 i 90  $\mu\text{m}$  (oko 31,6%), nešto su manje zastupljene mikrosfere veličine od 70 do 80  $\mu\text{m}$  (21,3%) i mikrosfere veličine od 90 do 100  $\mu\text{m}$  (oko 18,4%). Veće mikrosfere, kao i manje od pomenutih, imaju zastupljenost manju od 10%.

Analizom dobijenih rezultata određeni su optimalni uslovi za dobijanje mikrosfera. Poželjno je da mikrosfere budu što manje, ali pri tome se mora voditi računa da one ne smeju izgubiti svoj oblik. Kao optimalna izabrana je brzina 800  $\text{min}^{-1}$ . Optimalni uslovi za izradu neporoznih mikrosfera biodegradabilnog alifatskog poli-

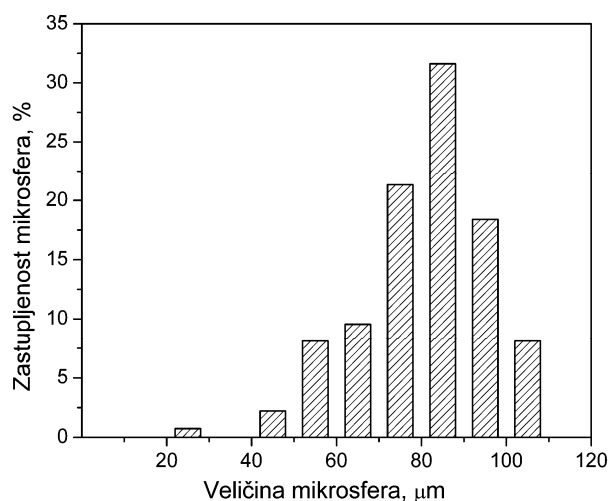
estra, PBS, su: koncentracija polimera u hloroformu 10 mas%, koncentracija stabilizatora emulzije, PVA, 1 mas%, a odnos organske i vodene faze,  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O} = 1/20$ .

### Dobijanje poroznih mikrosfera

Porozne mikrosfere su pravljene pod prethodno ustanovljenim optimalnim uslovima u prisustvu porogena. Shematski prikaz dobijanja poroznih mikrosfera je dat na slici 7. Ispitivana je zavisnost poroznosti mikrosfera od upotrebljenog porogena, poli(etilen oksida) [8] i heksana [12], i koncentracije porogena ili odnosa rastvarača i nerastvarača, kao što je to prikazano u tabeli 1.

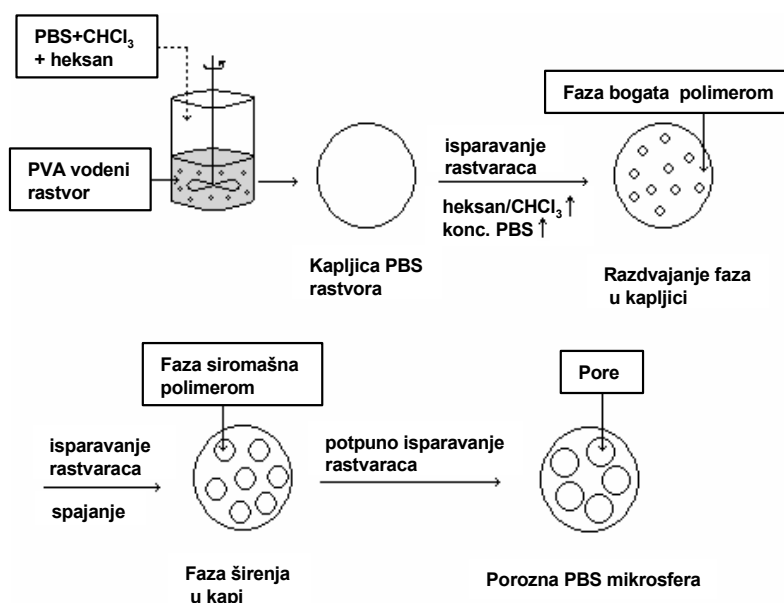
#### Dobijanje poroznih mikrosfera korišćenjem heksana kao porogena

Porozne mikrosfere se mogu dobiti upotrebom heksana kao nerastvarača za polimer, koji je mešljiv sa hloroformom, rastvaračem za polimer. PBS se rastvara u zadatoj smeši rastvarača i nerastvarača, a zatim se dobijeni rastvor dodaje kontinualnoj vodenoj fazi koja sadrži



Slika 6. Histogram raspodele veličina mikrosfera (koncentracija PVA 0,5 mas%, odnos  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O} = 1/20$ , brzina mešanja 600  $\text{min}^{-1}$  i koncentracija polimera u organskoj fazi 5 mas%).  
Figure 6. Particle size distribution histogram of the microspheres with concentration of PVA 0.5 mass%,  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  ratio 1/20, stirring rate 600  $\text{min}^{-1}$  and the polymer concentration in the organic phase 5 mass%.

PVA, uz mešanje. Organska faza se mešanjem razbija u veliki broj malih kapljica. Za ovo vreme organski rastvarači isparavaju, s tim što hloroform isparava brže od heksana, a kao posledica toga se menja odnos ova dva rastvarača i koncentracija polimera. Kada ove dve veličine dostignu određenu vrednost, dolazi do razdvajanja faza. Tokom daljeg odvijanja procesa, postepeno raste i spaja se faza odgovorna za nastajanje pora – faza siromašna polimerom. Na kraju, faza siromašna polimerom formira pore okružene polimernim matriksom nastalim od faze bogate polimerom.



Slika 7. Shematski prikaz dobijanja poroznih mikrosfera.  
Figure 7. Schematic illustration of the porous microspheres formation.

Tabela 1. Eksperimentalni uslovi pri izradi PBS mikrosfera, srednji prečnik mikrosfera, prividna gustina pre i posle degradacije  
Table 1. The fabrication conditions the preparation of PBS microspheres, the average size of the microcapsules, the apparent density before and after degradation

Uzorak	Odnos $\text{CHCl}_3$ /heksan	Sadržaj PEO u organskoj fazi, mas%	Srednji prečnik mikrosfera $\mu\text{m}$	Prividna gustina $\text{g/cm}^3$	Prividna gustina <sup>a</sup> $\text{g/cm}^3$
MS-1		30	122,6±0,6	0,23	0,25
MS-2		50	105,1±0,6	0,16	0,24
MS-3		70	100,4±0,4	-	-
MS-4	8/2		88,0±0,2	0,45	-
MS-5	9/1		97,7±0,3	0,59	-
MS-6	9,5/0,5		95,8±0,2	0,63	0,66
Bez porogena	-	-	87,3±0,4	0,40	0,43

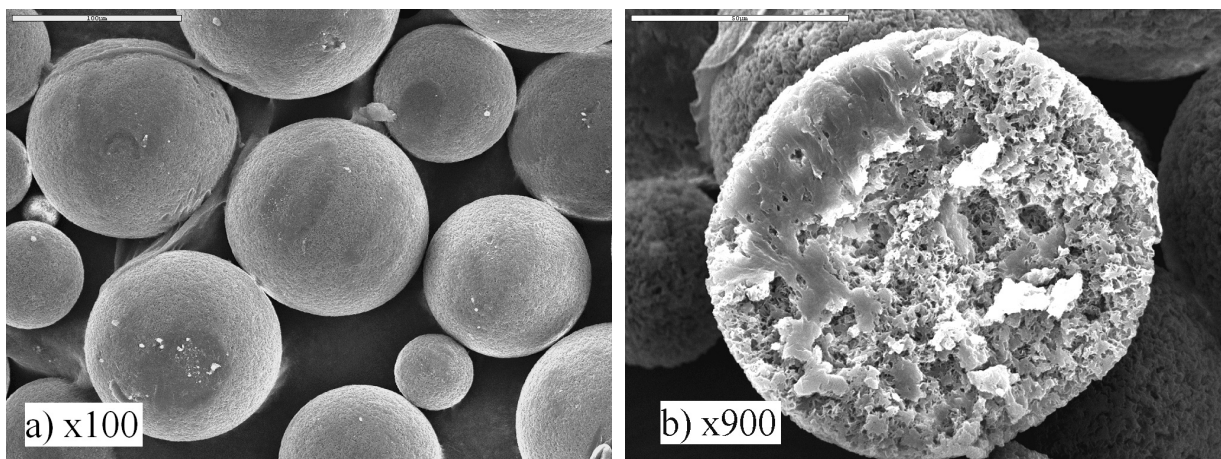
<sup>a</sup>Posle mesec dana degradacije u puferskom rastvoru

Na slici 8a prikazane su porozne mikrosfere polimera koje su nastale upotrebom heksana kao porogena pri odnosu rastvarač/nerastvarač ( $\text{CHCl}_3$ /heksan) = 8/2. Uočeno je da su mikrokapsule sferne i da se morfologija površine mikrosfera menja sa odnosom rastvarač/nerastvarač. Sa smanjenjem sadržaja nerastvarača, odnosno povećanjem odnosa rastvarač/nerastvarač povećava se hrapavost površine mikrosfera, što se može pripisati različitoj isparljivosti hloroforma i heksana, koji imaju značajnu ulogu u formiranju površine mikrosfera. Porozne mikrosfere sadrže mnogo šupljina i malih pora na površini. Mikrosfere dobijene bez dodatka porogena imaju velike šupljine na površini, bez malih pora. Prisustvo malih pora kod poroznih mikrosfera je posledica uklanjanja nerastvarača.

Morfologija poprečnog preseka mikrosfera PBS je takođe analizirana pomoću SEM mikroskopije. Poprečni presek poroznih PBS mikrosfera dobijenih u prisustvu heksana kao porogena je prikazan na slici 8b.

Mikrosfere napravljene sa odnosom rastvarač/nerastvarač ( $\text{CHCl}_3$ /heksan) = 8/2, odnosno sa najvećom količinom nerastvarača pored malih unutrašnjih pora poseduju i velike pore. Kod uzorka dobijenog sa odnosom rastvarač/nerastvarač ( $\text{CHCl}_3$ /heksan) = 9/1 primećeno je da pored kompaktnih poroznih mikrosfera postoje i sfere sa formiranom ljuskom. Neke su bile šuplje, a kod nekih u unutrašnjosti su se nalazile manje sfere. Dalje sa smanjenjem sadržaja nerastvarača, pri odnosu rastvarač/nerastvarač ( $\text{CHCl}_3$ /heksan) = 9,5/0,5 dobijene su kompaktnije mikrosfere sa manjim sadržajem malih pora.

Na osnovu dobijenih vrednosti prividne gustine, koje su prikazane u tabeli 1 može se zaključiti da kako odnos rastvarač/nerastvarač ( $\text{CHCl}_3$ /heksan) raste odnosno smanjuje se sadržaj nerastvarača, prividna gustina raste od 0,45 do 0,63  $\text{g/cm}^3$ . To se javlja usled toga što se sa smanjenjem odnosa  $\text{CHCl}_3$ /heksan ubrzava proces razdvajanja faza i razdvojene faze imaju više vremena da rastu i spajaju se pa samim tim nastaju i veće pore. Što su pore veće, mikrosfere imaju manju prividnu gustinu.



Slika 8. SEM slike poroznih mikrosfera sa heksanom pri odnosu rastvarač/nerastvarač = 8/2; (a) spoljasnji izgled mikrosfera; (b) unutrašnjost mikrosfera.

Figure 8. SEM photographs of porous microcapsules with hexane prepared with the good solvent/non-solvent ratio 8/2; (a) exterior of microspheres; (b) interior morphology.

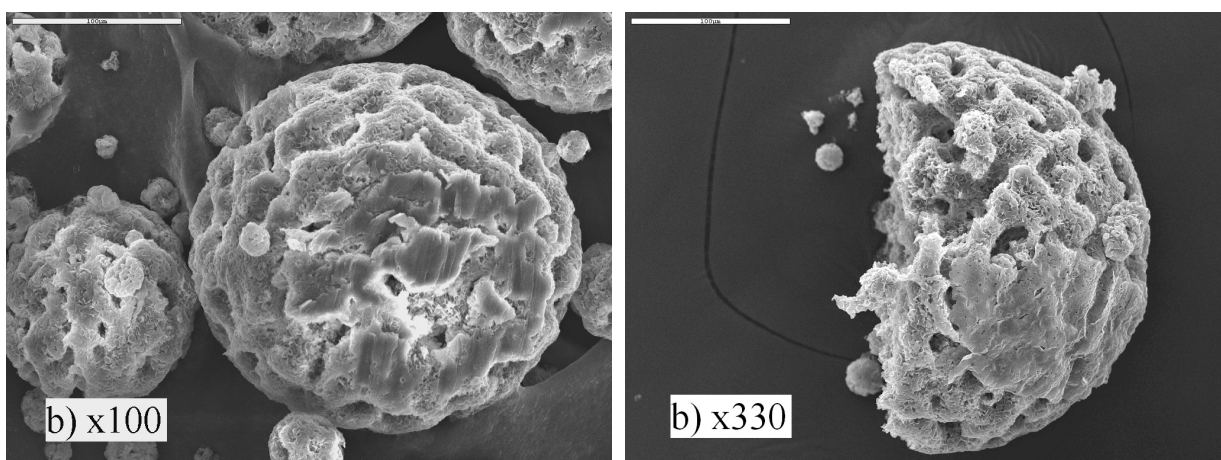
Vrednosti srednjeg prečnika poroznih čestica dobijenih u prisustvu heksana kretale su se od 88 do 98  $\mu\text{m}$ , pri čemu se prečnik mikrosfera povećao u poređenju sa prečnikom čestica bez porogena.

#### Dobijanje poroznih mikrosfera korišćenjem PEO kao porogena

Porozne mikrosfere se mogu dobiti upotrebom vodorastvornog poli(etilen oksida), PEO. PBS i PEO se u zadatom odnosu rastvaraju u hloroformu, a zatim se dobijeni rastvor dodaje, uz mešanje kontinualnoj vodenoj fazi koja sadrži PVA. Organska faza se mešanjem razbija u veliki broj malih kapljica. Na kontaktu kapljica i vodene faze isticanje vode praćeno je uticanjem rastvarača, koje izaziva razdvajanje faza, u fazu bogatu i fazu siromašnu PEO. Tokom uklanjanja rastvarača, vodorastvoran PEO prelazi u spoljnu vodenu fazu ostavljajući PBS domene. Uklanjanjem dovoljne količine rastvarača nastaju porozne strukture PBS.

Na slici 9a prikazane su porozne mikrosfere polimera koje su nastale upotrebom 30 mas% PEO kao porogena. Mikrosfere napravljene u prisustvu najmanje količine porogena imaju izrazito neravnu i talasastu površinu sa dobro definisanim porama. Povećanjem sadržaja PEO porogena neravnine na površini sfera postaju manje uočljive.

Na slici 9b prikazan je mikrograf preseka poroznih mikrosfera sintetisanih u prisustvu 30 mas% PEO. Uzorak napravljen sa 30 mas% PEO ima izrazito poroznu strukturu u kojoj su se veće i manje pore mestimično spojile u kanale, dok uzorak napravljen u prisustvu 50 mas% PEO ima sunderastu strukturu sa većim brojem manjih pora ravnomerno raspoređenih po uzorku. Na osnovu dobijenih vrednosti prividne gustine (tabeli 1) može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije PEO kao porogena prividna gustina opada. Prividna gustina poroznih mikrosfera PBS napravljenih u prisustvu 30 i



Slika 9. SEM slike poroznih mikrosfera sa 30 mas% PEO; (a) spoljašnjost mikročestica; (b) unutrašnja morfologija.

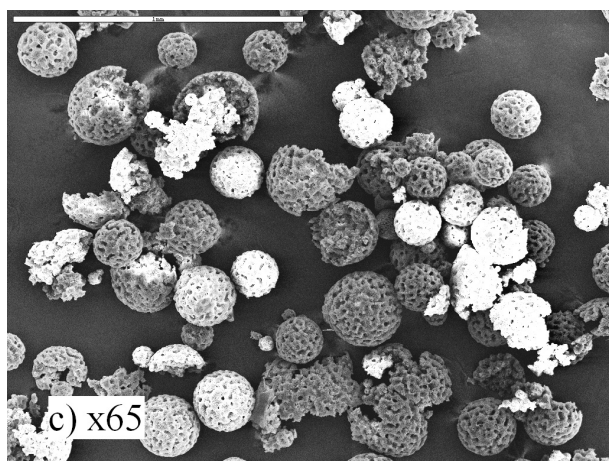
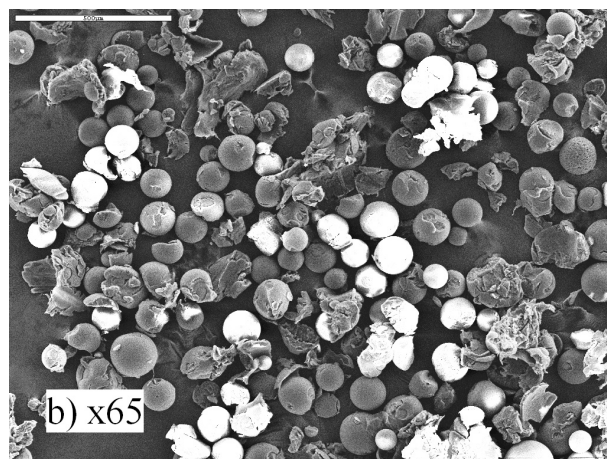
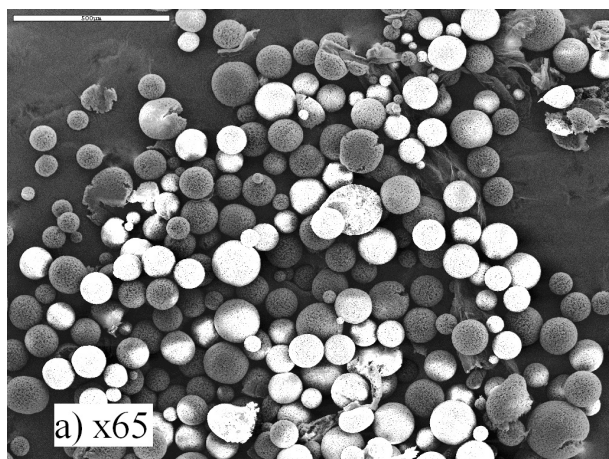
Figure 9. SEM photographs of the porous microcapsules with 30 mass% of PEO; (a) exterior of the microspheres; (b) interior morphology.

50 mas% PEO kao porogena iznosila je 0,23 odnosno 0,16 g/cm<sup>3</sup>. Veći deo uzorka koji je dobijen pri koncentraciji porogena od 70 mas% bio je slepljen i nije bilo moguće odrediti njegovu prividnu gustinu.

Vrednosti srednjeg prečnika poroznih čestica dobijenih u prisustvu PEO su se kretale u opsegu od 100 do 122 μm, pri čemu je prečnik mikrosfera opadao sa porastom sadržaja PEO.

### Hidrolitička degradacija

Hidrolitička degradacija mikrosfera PBS praćena je inkubacijom u fostatnom puferskom rastvoru na temperaturi od 37 °C tokom četiri nedelje. Na osnovu SEM mikrografa tretiranih uzoraka može se videti da kod neporoznih mikrosfera nije došlo do promene u morfologiji mikročestica i da su sfere ostale kompaktne nakon degradacionog testa u puferskom rastvoru (slika 10).



Slika 10. SEM slike mikrosfera posle mesec dana degradacije u puferu; (a) neporozne mikrosfere, (b) porozne mikrosfere sa heksanom pri odnosu rastvarač/nerastvarač = 9,5/0,5 i (c) porozne mikrosfere sa 30 mas% PEO.

Figure 10. SEM photographs of the microcapsules after 1 month of degradation in buffer; (a) non-porous microspheres (b) porous microspheres with hexane prepared with the good solvent/non-solvent ratio 9.5/0.5 (c) porous microspheres with 30 mass% PEO.

Kod poroznih mikrosfera, takođe, nisu se mogle primetiti promene na površini mikročestica, kako kod poroznih mikrosfera dobijenih u prisustvu PEO, tako i kod mikročestica sa heksanom kao porogenom. Na SEM slikama mogu se uočiti izdrobljene mikrosfere kod svih mikročestica posle mesec dana inkubacije u puferskom rastvoru. Posebno se to može uočiti kod poroznih mikrosfera sa heksanom kao porogenom pri odnosu rastva-

rač/nerastvarač = 9,5/0,5 (slika 10b) i kod poroznih mikrosfera sa 30 mas% PEO (slika 10c), kod kojih je i pre izlaganja degradaciji postojala najviše razvijena površina.

U tabeli 1 su prikazane prividne gustine mikrosfera pre i posle hidrolitičke degradacije. Vrednosti prividne gustine rastu kod svih mikrosfera posle degradacije. Kod mikrosfera bez porogena ta vrednost se povećala od 0,40 do 0,43 g/cm<sup>3</sup>. Kod mikrosfera koje su pravljene u prisustvu 30 mas% PEO vrednost prividne gustine se povećala sa 0,23 na 0,25 g/cm<sup>3</sup>, a kod mikrosfera sa 50 mas% PEO ta vrednost je značajno porasla sa 0,16 na 0,24 g/cm<sup>3</sup>. Mikrosfere koje su napravljene u prisustvu heksana kao porogena, odnos rastvarač/nerastvarač = 9,5/0,5, u testu degradacije pokazale su promenu vrednosti prividne gustine sa 0,63 na 0,66 g/cm<sup>3</sup>. Povećanje vrednosti prividne gustine mikrosfera se može ob-

jasniti povećanom krtošću mikrosfera stajanjem u puferskom rastvoru, što je posledica boljeg pakovanja mikrosfera u kapilarama zbog postojanja izdrobljenih mikrosfera.

### ZAKLJUČAK

Za izradu neporoznih mikrosfera biodegradabilnog alifatskog poliestra, PBS, može uspešno da se koristi



postupak otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije. Pri optimizaciji uslova izrade neporoznih PBS mikrosfera ustanovljeno je: da je srednji prečnik čestica rastao sa povećanjem koncentracije polimera i sa povećanjem udela organske faze, a da se veličina čestica smanjivala sa povećanjem koncentracije upotrebljenog stabilizatora emulzije i sa povećanjem brzine mešanja.

Optimalni uslovi za izradu neporoznih mikrosfera PBS bili su: koncentracija polimera u hloroformu 10 mas%, koncentracija stabilizatora emulzije, PVA, 1 mas%, odnos organske i vodene faze,  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O} = 1/20$  i brzina mešanja od  $800 \text{ min}^{-1}$ .

Porozne mikrosfere PBS su pravljene pri optimalnim uslovima korišćenjem heksana ili poli(etilen oksida), PEO, kao porogena. Sa smanjenjem sadržaja nerastvarača (heksana), povećavale su se vrednosti za prividnu gustinu mikrosfera od 0,45 do 0,63  $\text{g/cm}^3$ . Vrednosti srednjeg prečnika čestica kretale su se od 88 do 98  $\mu\text{m}$ , pri čemu se prečnik mikrosfera povećao u poređenju sa prečnikom čestica bez porogena. Sa smanjenjem sadržaja porogena, heksana, povećava se hrpa-vost površine mikrosfera.

Mikrosfere napravljene sa 30 mas% PEO imale su izrazito poroznu strukturu u kojoj su se veće i manje pore mestimično spojile u kanale, dok su mikrosfere napravljene u prisustvu 50 mas% PEO imale sunderastu strukturu sa većim brojem manjih pora koje su ravnomerno raspoređene po uzorku. Vrednost prividne gustine poroznih mikrosfera PBS napravljenih u prisustvu 30 i 50 mas% PEO iznosila je 0,23 odnosno 0,16  $\text{g/cm}^3$ . Vrednosti srednjeg prečnika poroznih čestica dobijenih u prisustvu PEO kretale su se u opsegu od 100 do 122  $\mu\text{m}$ , pri čemu se prečnik mikrosfera smanjivao sa porastom sadržaja PEO. Takođe, sa povećanjem sadržaja PEO porogena neravnine na površini sfera postaju manje uočljive.

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da se oba porogena, i heksan i PEO, mogu koristiti za izradu poroznih mikrosfera. Variranjem količine dodatog heksana može se uticati na poroznost i veličinu pora. Ukoliko se kao porogen koristi PEO, sadržaj ne treba da prelazi 50 mas% jer pri većim dolazi do slepljivanja čestica. Mikrosfere PBS dobijene u prisustvu PEO kao porogena imale su veću poroznost i veće dimenzije od mikrosfera napravljenih u prisustvu heksana.

Posle inkubacije mikrosfera u trajanju od jednog meseca u puferu, ustanovljeno je da dolazi do delimične degradacije polimernih mikrosfera, što se manifestovalo povećanjem broja dezintegrisanih, tj. smrvljenih mikrosfera.

## LITERATURA

- [1] U. Edlund, A.-C. Albertsson, *Adv. Polym. Sci.* **157** (2002) 67-112.
- [2] F. Barbato, M.I.L. Rotonda, G. Maglio, R. Palumbo, F. Quaglia, *Biomaterials* **22** (2001) 1371-1371.
- [3] T. Fujimaki, *Polym. Degrad. Stab.* **59** (1998) 209-214.
- [4] D. Pepić, E. Zagar, M. Zigon, A. Krzan, M. Kunaver, J. Djonlagić, *Eur. Polym. J.* **44** (2008) 904-917.
- [5] M.S. Nikolić, J. Djonlagić, D. Pepić, *J. Appl. Polym. Sci.* **106** (2007) 1777-1786.
- [6] P.B. O'Donnell, J.W. McGinity, *Adv. Drug Delivery Rev.* **28** (1997) 25-42.
- [7] M. Li, O. Rouaudand, D. Poncelet, *Int. J. Pharm.* **363** (2008) 26-39.
- [8] S.-J. Park, K.-S. Kim, S.-H. Kim, *Colloid Surf., B: Biointerf.* **43** (2005) 238-244.
- [9] S.-J. Park, Y.-M. Lee, S.-K. Hong, *Colloid Surf., B: Biointerf.* **47** (2006) 211-215.
- [10] S. Freiberg, X. X. Zhu, *Int. J. Pharm.* **282** (2004) 1-18.
- [11] F. Quaglia, L. Ostacolo, G. Nese, G. De Rosa, M.I. La Rotonda, R. Palumbo, G. Maglio, *Macromol. Biosci.* **5** (2005) 945-954.
- [12] Y. Hong, C. Gao, Y. Shi, J. Shen, *Polymer Adv. Tech.* **16** (2005) 622-627.

**SUMMARY****PREPARATION OF BIODEGRADABLE POROUS POLY(BUTYLENE SUCCINATE) MICROSPHERES**

Dragana Pepić, Milica Spasojević, Marija S. Nikolić and Jasna Djonlagić

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade

Scientific paper

The aim of this study was to determine the optimal conditions for the fabrication of porous microspheres based on poly(butylene succinate), PBS. The biodegradable non-porous PBS microspheres were prepared by the oil-in-water (o/w) emulsion solvent evaporation method using poly(vinyl alcohol), PVA, as the surfactant. Fabrication conditions, such as stirring rate, organic/aqueous ratio, PBS concentration and surfactant (PVA) concentration, which have an important influence on both the particle size and the morphology of the microspheres, were varied. Scanning electron microscopy, SEM, observations confirmed the size, size distribution and surface morphology of the microspheres. The optimal conditions for the preparation of the non-porous microspheres were found to be: concentration the PBS solution, 10 mass%; PVA concentration, 1 mass%; the organic/aqueous ratio  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O} = 1/20$  and stirring rate 800 rpm. Porous PBS microspheres were fabricated under the optimal conditions using various amounts of hexane and poly(ethylene oxide), PEO, as porogens. The influence of the amount of porogen on the pore size and the particle size was investigated using SEM and the apparent density. The microspheres exhibited various porosities and the pore sizes. The average particle size of the microspheres with PEO as the porogen was from 100 to 122  $\mu\text{m}$  and that of the microspheres with hexane as the porogen was from 87 to 97  $\mu\text{m}$ . The apparent density of the porous microspheres with PEO as the porogen, from 0.16 to 0.23  $\text{g}/\text{cm}^3$ , was much smaller than the non-porous microspheres, 0.40  $\text{g}/\text{cm}^3$ . In the *in vitro* degradation experiments, the porous microspheres were incubated in phosphate buffer solution (pH 7) at 37 °C. After incubating for one month, the microspheres showed significant extent of the hydrolytic degradation of the porous PBS microspheres.

Key words: Porous microspheres • Poly(butylene succinate) • Emulsion solvent evaporation method • Poly(ethylene oxide) • Hexane • *In vitro* degradation

Ključne reči: Porozne mikrosfere • Poli(butilensukcinat) • Emulzioni postupak uz otparavanje rastvarača • Poli(etilen oksid) • Heksan • *In vitro* degradacija