

DRAGANA S. PEPIĆ
DARINKA R. ANĐELKOVIĆ
MARIJA S. NIKOLIĆ
SVETLANA D. GRUJIĆ
JASNA A. ĐONLAGIĆ

Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu,
Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 66.063.1:661.12:615.213.06

DOI: 10.2298/HEMIND101117073P

OPTIMIZACIJA USLOVA DOBIJANJA MIKROSFERA NA BAZI BIODEGRADABILNOG POLI(ϵ -KAPROLAKTONA) ZA KONTROLISANO OTPUŠTANJE KARBAMAZEPINA

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja uslova dobijanja mikrosfera biodegradabilnog poli(ϵ -kaprolaktona) tehnikom otparavanja rastvarača iz emulzije, na veličinu i raspodelu veličina mikrosfera. Polazne emulzije rastvora polimera u vodi formirane su pri velikim brzinama mešanja tokom formiranja emulzije u opsegu od 10000 do 23000 min^{-1} , radi dobijanja mikrosfera malih prečnika. Varirana je brzina mešanja prilikom formiranja emulzije, dužina trajanja emulgovanja velikim brzinama mešanja i udeo stabilizatora emulzije, poli(vinil alkohola). Veličina i raspodela veličina polimernih mikrosfera određivana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. U polimerne mikrosfere inkapsuliran je lek karbamazepin iz grupe antiepileptika i određivana je efikasnost inkapsulacije, kao i profil otpuštanja leka u puferskom rastvoru metodom tečne hromatografije sa UV spektroskopijom. Takođe je izučavana kinetika otpuštanja karbamazepina korišćenjem različitih modela s ciljem ispitivanja mehanizma otpuštanja leka iz mikrosfera dobijenih pri različitim uslovima.

Sintetski biodegradabilni polimerni materijali predstavljaju značajno polje istraživanja u oblasti razvoja polimernih matrica za kontrolisanu dostavu i otpuštanje lekova ili drugih biološki aktivnih supstanci. Uobičajeni sistemi za unošenje leka u organizam, preko tableta ili intravenozno ubrizgavanje leka, podrazumevaju unošenje cele neophodne porcije odjednom, što često može biti blizu toksične vrednosti. S druge strane, neophodno je konstantno unošenje nove količine leka u kratkim vremenskim intervalima, što podrazumeva i veliku fluktuaciju koncentracije leka u organizmu. Terapeutski efekat se može najbolje postići kada bi se koncentracija leka održavala konstantnom što duži vremenski period. To je bio glavni razlog da se u ranim 70-im godinama prošlog veka intenzivno krene u istraživanje kontrolisanog otpuštanja lekova. Alifatski biodegradabilni poliestri su pogodni za izradu matrica u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova. Ovi polimeri zadržavaju svojstva određeni period, da bi kasnije degradirali u netoksične rastvorne molekule koji se izlučuju iz organizma [1,2]. Posebno izučavani polimer za ovu primenu je alifatski poliestar poli(ϵ -kaprolakton), PCL, [2–6] kao i njegovi kopolimeri [7,8] i blende [9], zbog njihove biodegradabilnosti, biokompatibilnosti i propustljivosti za male molekule. PCL je hidrofoban, semikristalan polimer sa niskom temperaturom topljenja u opsegu od 59 do 64 °C u zavisnosti od stepena kristaliničnosti i niskom temperaturom ostakljivanja (–60 °C). Dobro je rastvorljiv u većini uobičajenih organskih rastvarača, kao što su hloroform, dihlormetan i toluen, dok se ne rastvara u alkoholima i dietiletru [10]. Hidrolitička degradacija PCL je veoma spora u poređenju sa drugim alifatskim poliestrima, što ga čini pogodnim za korišćenje u

sistemima za otpuštanje leka pri dužim vremenskim intervalima, i do godinu dana. Profil otpuštanja leka iz matrica na bazi PCL može se modifikovati umešavanjem sa drugim biodegradabilnim polimerima, jer PCL pokazuje odličnu kompatibilnost sa različitim polimerima. Takođe, za razliku od degradacije poli(laktida) i poli(glikolida), promena pH sredine i mogućnost dobijanja kisele sredine pri razgradnji PCL je zanemarljiva [11].

Polimerne matrice napravljene od PCL za kontrolisano otpuštanje leka su najčešće u obliku nano- i mikročestica. Najviše korišćene metode za dobijanje polimernih nano- i mikrosfera su metoda uz otparavanje organskog rastvarača iz emulzije polimera u vodi i tehnika sprej-sušenja [10,12–14]. Emulziona tehnika ulje u vodi se zasniva na isparavanju hidrofobnog rastvarača iz emulzije pri čemu se formiraju mikrosfere i inkapsulira hidrofobni lek zarobljen u polimernoj matrici. Ova metoda podrazumeva rastvaranje polimera u organskom rastvaraču, a zatim rastvaranje ili dispergovanje leka u dobijenom polimernom rastvoru. Tako dobijena organska faza se pri određenoj brzini mešanja ubacuje u vodenu fazu, pri čemu se formira emulzija. Otparavanjem rastvarača iz kapljica organske faze dobijaju se inkapsulirane polimerne sfere. U zavisnosti od uslova, pre svega brzine mešanja, dobiće se veće ili manje sfere, tj. čestice koje mogu biti nano ili mikro dimenzija. Sve sfere čiji je prečnik u opsegu od 1 do 1000 nm spadaju u nanosfere, dok su mikrosfere reda veličine od 1 do 1000 μm [15]. Postoje nano- i mikročestice, odnosno nano- i mikrokapsule u zavisnosti da li je inkapsulirani lek dispergovan u polimernoj matrici ili se nalazi u jezgri čestica okružen polimernim omotačem. Za razliku od mikrosfera koje se mogu koristiti samo oralno, veličina nanosfera dozvoljava i njihovo intravenozno korišćenje. Male dimenzije nanosfera takođe omogućavaju ciljanu dostavu farmakološki aktivnih supstanci na određena mesta jednostavnim injektovanjem [10].

Autor za prepisku: M.S. Nikolić, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: nima@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 17. novembar 2010

Rad prihvaćen: 25. novembar 2010

Na veličinu i uniformnost sfera, a samim tim i na profil otpuštanja leka, utiču ne samo odabrana metoda pripreme, već i mnogi drugi faktori: molarna masa polimera, stepen kristaliničnosti polimera, termička istorija polimera i udeo drugog polimera kada se radi o blendama. Na veličinu i raspodelu veličina sfera dobijenih metodom otparavanja rastvarača iz emulzije utiču vrsta i koncentracija emulgatora, zapremina i koncentracija rastvora polimera, brzina mešanja i dužina homogenizovanja tokom formiranja emulzije [16–20].

Yang i saradnici su ispitivali uticaj koncentracije emulgatora u vodenoj fazi na veličinu mikrosfera na bazi poli(D,L-laktid-*co*-glikolne kiseline) 65/35 i poli(ϵ -kapolaktona) [21]. Kao emulgator je korišćen poli(vinil alkohol), PVA, a njegov udeo u vodenoj fazi je iznosio 0,05, 0,1 i 0,5 mas.%. Ovim eksperimentima je ustanovljeno da se sa porastom udela PVA smanjuje prečnik mikrosfera. S obzirom na to da je korišćen PVA polimer velike molarne mase, njegovo prisustvo u vodenoj fazi može povećati viskozitet emulzije čime bi se otežalo razbijanje emulzije u manje kapi, pa bi se time dobile sfere većih dimenzija. S druge strane, PVA deluje stabilizujuće na stvorene kapi, sprečavajući njihovo slepljivanje, što dovodi do stvaranja sfera manjih prečnika. Na osnovu niza eksperimenata, Yang i saradnici su zaključili da je stabilizujuće dejstvo PVA dominantnije pri većim koncentracijama i da dovodi do smanjenja veličine mikrosfera sa povećanjem koncentracije PVA. Slično su zapazili i Park i saradnici [22] analizirajući uticaj udela poli(etilen oksida) na profil otpuštanja eritromicina iz mikrosfera napravljenih od poli(ϵ -kapolaktona). U tom radu je izučavan i uticaj različitih vrsta emulgatora, koncentracije emulgatora, kao i brzine mešanja na prečnik biodegradabilnih mikrosfera i efikasnost inkapsulacije leka. Rezultati ovih ispitivanja su pokazali da se prečnik mikrosfera na bazi PCL smanjuje sa povećanjem brzine mešanja u celom opsegu primenjenih brzina mešanja. Veličina sfera opada i sa povećanjem koncentracije emulgatora želatina u opsegu od 1 do 5 mas.%, dok dalje povećanje koncentracije emulgatora može voditi aglomeraciji i povećanju prečnika dobijenih sfera.

Uticaj brzine mešanja na veličinu nosača leka, kao i raspodelu veličina čestica, izučavan je u mnogim radovima [16,18,21–23]. To je jedan od ključnih faktora koji obezbeđuje energiju za dispergovanje organske faze u vodenoj fazi. Sa povećanjem brzine mešanja opada prečnik sfera, pa je stoga pri pravljenju sfernih matrica neophodno optimizovati brzinu mešanja da bi se dobile sfere željenih dimenzija i raspodele veličina.

Na karakteristike nano- i mikrosfera može uticati i vreme homogenizovanja tokom formiranja emulzije. Ovaj parametar je posebno bitan kod metoda za dobijanje nanoemulzija, kao što je homogenizovanje pod pritiskom. Lamprecht i saradnici su u svom istraživanju [24] pratili

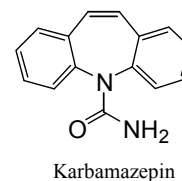
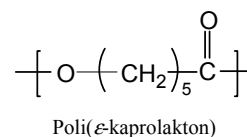
uticaj dužine trajanja homogenizovanja, pri formiranju emulzije u homogenizatoru pod pritiskom, na veličinu i raspodelu veličina nanosfera izrađenih korišćenjem dva biorazgradiva polimera poli(D,L-laktid-*co*-glikolne kiseline) 50/50 i poli(ϵ -kapolaktona). Zapaženo je da se sa povećanjem dužine homogenizovanja do 3 min smanjuje polidisperznost, bez značajne promene prečnika nanosfera. Međutim, nakon 3 min dolazi do rasta kako polidisperznost tako i veličina sfera. To je objašnjeno smanjenjem stabilnosti emulzije sa povećanjem vremena homogenizovanja, što uključuje pojavu nekontrolisane koalescencije kapi, koja vodi povećanju i prečnika čestica i polidisperznosti.

Cilj ovog rada je bio ispitivanje optimalnih uslova za dobijanje mikrosfera na bazi biodegradabilnog poli(ϵ -kapolaktona) za kontrolisano otpuštanje karbamazepina, leka iz grupe antiepileptika. Mikrosfere su dobijene emulzionim postupkom uz otparavanje rastvarača, pri čemu je u koraku dobijanja emulzije korišćen homogenizator velike snage koji može razviti brzine mešanja u opsegu od 10000 do 23000 min^{-1} . Ispitivano je kako brzina mešanja tokom formiranja emulzije homogenizatorom velike snage, dužina trajanja mešanja velikim brzinama pri formiranju emulzije i koncentracija emulgatora, PVA, utiču na veličinu i raspodelu veličina čestica. Za odabrane procesne parametre u mikrosfere je inkapsuliran karbamazepin i određivana je efikasnost inkapsulacije, kao i profil otpuštanja leka.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijali

Za dobijanje mikrosfera korišćen je sintetisani polimer poli(ϵ -kapolakton) čije su srednje molarne mase određene gel propusnom hromatografijom iznosile $M_n = 14370 \text{ g mol}^{-1}$ i $M_w = 33500 \text{ g mol}^{-1}$. Kao emulgator je uzet poli(vinil alkohol), PVA, ($M_w = 130000 \text{ g mol}^{-1}$, Fluka). Inkapsuliran je karbamazepin, lek koji se koristi kod lečenja epilepsije (Hemofarm i Zorka-Pharma, $M = 236 \text{ g mol}^{-1}$). Na slici 1 date su strukturne formule



Slika 1. Strukturne formule PCL i karbamazepina.
Figure 1. Structural formulas of PCL and carbamazepine.

polimera poli(ϵ -kaprolaktona) i leka karbamazepina. Za rastvaranje polimera i leka korišćen je dihlormetan (Acros Organics), a za pravljenje vodene faze upotrebljavana je destilovana voda.

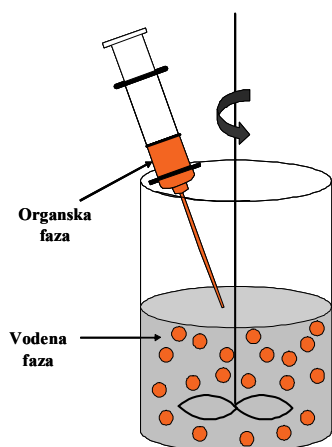
Izrada mikrosfera

Mikrosfere su dobijene emulzionim postupkom uz otparavanje lako isparljivog rastvarača, dihlormetana. Pravljenje su mikrosfere bez leka pri različitim parametrima procesa, da bi se ispitao uticaj ovih parametara na veličinu i raspodelu veličina mikrosfera. Tokom izrade mikrosfera korišćen je 10 mas.% rastvor polimera u svim ogledima.

Parametri koji su varirani tokom pravljenja mikrosfera bez leka su: brzina mešanja tokom formiranja emulzije (tj. tokom homogenizovanja) homogenizatorom velike snage (10000, 18000 i 23000 o min⁻¹), vreme homogenizovanja pri velikim brzinama mešanja (5, 10 i 15 min) i koncentracija emulgatora (0,2, 0,5 i 1,0 mas.%).

Postupak

Organska ili uljana faza je formirana tako što je određena količina PCL (0,500 g) rastvorena u određenoj zapremini dihlormetana (5 ml), a zatim je pomoću pipete dodata u pripremljeni vodeni rastvor emulgatora PVA (100 ml). Dve faze su mešane određeno, unapred odabrano vreme upotrebom homogenizatora (ULTRA TURRAX® T 18 basic, IKA®), koji omogućava upotrebu velikih brzina mešanja, a zatim je, tokom otparavanja rastvarača, mešanje nastavljeno pri brzini od 1000 o min⁻¹ (mešalica RW 20, Janke & Kunkel, IKA-WERK), tokom 21 h. Shematski prikaz dobijanja emulzije za pripremu mikročestica je ilustrovan na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz dobijanja mikrosfera.
Figure 2. Schematic illustration of the microspheres formation.

Mešanjem velikim brzinama stvaraju se sitne kapi organske faze u vodenoj fazi, a otparavanjem lako isparljivog rastvarača iz organske faze ovako formirane emulzije, tokom naknadnog mešanja malim brzinama,

formiraju se mikrosfere. Nakon toga, dobijene mikrosfere su odvojene centrifugiranjem od vodene faze (4500 o min⁻¹ u trajanju od 15 min) uz naknadno ispiranje određenom količinom destilovane vode i dodatnim centrifugiranjem pod istim uslovima. Na kraju, mikročestice se suše u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi.

Mikrosfere sa različitim sadržajem karbamazepina su pripremane pri odabranim uslovima. Izrada inkapsuliranih mikrosfera je podeljena u dve serije. U prvoj seriji je korišćen 1 mas.% rastvor PVA, pri brzini mešanja tokom homogenizovanja 18000 o min⁻¹ u trajanju od 5 min. Pri otparavanju rastvarača emulzija je mešana brzinom 1000 o min⁻¹ tokom 21 h. Druga serija mikrosfera je pravljenja bez korišćenja homogenizatora, s ciljem dobijanja mikrosfera većih prečnika. Odabrani parametri za ovu seriju su bili 0,5 mas.% rastvor PVA i mala brzina mešanja od 1000 o min⁻¹ tokom formiranja emulzije, kao i tokom otparavanja rastvarača u trajanju od 22 h. Količina leka je varirana za obe serije i iznosila je 10 i 15 mas.% računato na masu polimera.

Izrada inkapsuliranih mikrosfera je slična opisanom postupku, samo što je u uljanoj fazi, tj. pripremljenom rastvoru polimera, rastvorena određena količina leka, karbamazepina (0,05 i 0,075 g).

Karakterizacija mikrosfera

Analiza veličine i raspodele veličina mikrosfera

Veličina i morfologija mikrosfera ispitivana je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa, SEM (JEOL JSM 5800). Za posmatranje mikrosfera SEM-om neophodno je da se mikrosfere prevuku slojem Pd-Pt legure. SEM slike su analizirane pomoću programa ImageJ merenjem prečnika oko 200 mikrosfera, a rezultati su poslužili za određivanje srednjeg prečnika čestica i raspodele veličina mikrosfera.

Efikasnost inkapsulacije i kontrolisano otpuštanje leka

Efikasnost inkapsulacije i količina otpuštenog leka karbamazepina određivani su pomoću tečne hromatografije u sprezi sa UV spektroskopijom, HPLC-UV. Za određivanje efikasnosti inkapsulacije uziman je vodeni uzorak filtrata zaostalog nakon izrade i ispiranja mikrosfera i pomoću HPLC-UV merena je količina zaostalog karbamazepina. Dobijena količina leka u filtratu je jednaka razlici ukupne količine unetog leka i inkapsulirane količine leka. Efikasnosti inkapsulacije se određuje prema sledećoj formuli:

$$\text{Efikasnost inkapsulacije (\%)} = \frac{\text{Masa leka u mikrosferama}}{\text{Teorijska masa leka u mikrosferama}} \times 100$$

Eksperiment kontrolisanog otpuštanja leka je rađen na svim uzorcima inkapsuliranih mikrosfera, a da bi se simulirali *in vivo* uslovi korišćen je neutralni fosfatni pufer na 37 °C. Rađene su po dve probe, pri čemu je za

svaku korišćeno po 30 mg uzorka u 50 ml pufera. U određenim vremenskim intervalima uziman je uzorak puferskog rastvora (0,5 ml), čijom je analizom određen sadržaj otpuštenog karbamazepina pomoću HPLC–UV. Nakon svakog uzorkovanja, sudovi su dopunjavani istom zapreminom svežeg pufera. Za tečno-hromatografsku analizu korišćen je Surveyor LC sistem (Thermo Fisher Scientific, Waltham), sa Zorbax Eclipse® XDB-C18 kolonom (Agilent Technologies). Mobilna faza protoka $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ sastojala se od metanola i dejonizovane vode. Hromatografska analiza je izvršena izokratski uz sastav mobilne faze od 60% metanola i 40% dejonizovane vode. U LC sistem je unošeno $10 \mu\text{l}$ uzorka. UV spektri su dobijeni pomoću Surveyor PDA detektora. Na UV spektru karbamazepina javljaju se tri apsorpciona maksimuma na talasnim dužinama 210, 240 i 285 nm. Najintenzivnija apsorpcija je na talasnoj dužini $\lambda = 210 \text{ nm}$ i ona je korišćena za kvantitativno određivanje količine otpuštenog leka.

REZULTATI I DISKUSIJA

Veličina i raspodela veličina mikrosfera bez leka

Pri izradi mikrosfera na bazi PCL emulzionom tehnikom uz otparavanje rastvarača, menjani su različiti

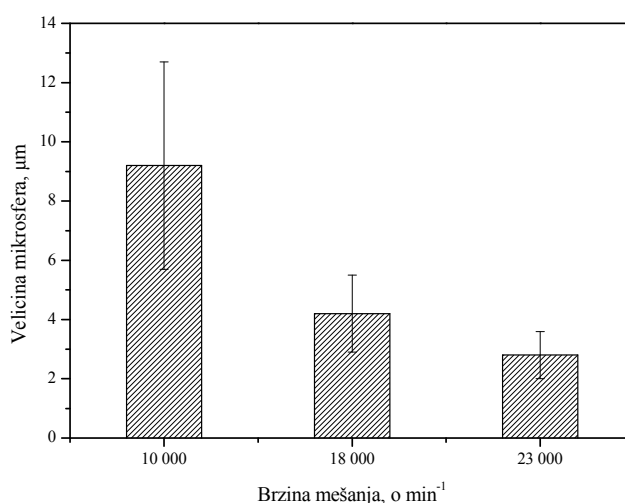
parametri kako bi se ispitao njihov uticaj na veličinu i raspodelu veličina mikrosfera. Analiziran je uticaj brzine i dužine trajanja mešanja tokom formiranja emulzije, kao i uticaj koncentracije emulgatora u vodenoj fazi. Tokom svih eksperimenata koncentracija polimera u organskoj fazi je bila 10 mas.%, dok je odnos organska/vodena faza bio 1/20. Vrednosti parametara (brzina mešanja tokom pripreme emulzije, tj. tokom homogenizovanja, dužina trajanja homogenizovanja velikim brzinama i koncentracija emulgatora) koji su varirani u različitim ogledima dati su u tabeli 1, gde su predstavljene i vrednosti srednjih prečnika dobijenih mikrosfera. U svim slučajevima dobijene su neporozne, glatke mikročestice sfernog oblika bez većih nepravilnosti.

Uticaj brzine homogenizovanja

Za ispitivanje uticaja brzine mešanja tokom homogenizovanja organske (uljane) faze u vodenoj fazi sa 1,0 mas.% emulgatora korišćen je homogenizator velike snage, pri različitim brzinama mešanja. Pravljeni su mikrosfere pri brzinama mešanja tokom homogenizovanja od 10000, 18000 i 23000 o min^{-1} , pri konstantnom vremenu homogenizovanja od 5 min. Promena srednjeg prečnika mikrosfera je prikazana na slici 3. Sa povećanjem brzine mešanja tokom homogenizovanja, dolazi do

Tabela 1. Uticaj različitih parametara na veličinu mikrosfera
Table 1. The effect of different parameters on the microspheres diameter

Brzina mešanja tokom homogenizovanja o min^{-1}	Dužina trajanja homogenizovanja min	Koncentracija emulgatora mas. %	Prečnik mikrosfera μm
10000	5	1	$9,2 \pm 3,5$
18000	5	1	$4,2 \pm 1,3$
23000	5	1	$2,8 \pm 0,8$
18000	10	1	$4,2 \pm 1,7$
18000	15	1	$3,2 \pm 1,2$
18000	5	0,2	$4,6 \pm 2,7$
18000	5	0,5	$4,4 \pm 1,7$



Slika 3. Zavisnost srednjeg prečnika mikrosfera od brzine mešanja tokom formiranja emulzije.

Figure 3. Average diameter of microspheres as a function of stirring rate during formation of the emulsion.

smanjenja vrednosti prečnika sfera. Pri brzinama mešanja od 10000, 18000 i 23000 o min⁻¹ srednji prečnik mikrosfera iznosio je 9,2, 4,2 i 2,8 μm.

Preliminarna ispitivanja su pokazala da su veličine mikrosfera dobijenih bez korišćenja homogenizatora velike snage pri formiranju emulzije značajno veće. Kada je upotrebljena brzina mešanja za formiranje emulzije bila samo 1000 o min⁻¹, veličina mikrosfera na bazi PCL je bila preko 100 μm, slično kao u slučaju drugih biodegradabilnih poliestara, kao što je poli(butilen sukcinat) [25]. Ovo pokazuje da brzina mešanja ima veliki uticaj na prečnik mikrosfera, i da je korišćenjem homogenizatora za postizanje velikih brzina mešanja (preko 10000 o min⁻¹) omogućeno dobijanje mikročestica čiji je srednji prečnik manji od 10 μm.

Uticaj vremena homogenizovanja

Radi ispitivanja uticaja dužine trajanja homogenizovanja pri velikim brzinama mešanja na veličinu čestica, napravljene su mikrosfere uz variranje dužine trajanja homogenizovanja od 5, 10 i 15 min, dok je brzina mešanja tokom homogenizovanja iznosila 18000 o min⁻¹. Sa povećanjem dužine trajanja homogenizovanja nije uočen pravilan trend promene srednjih prečnika, za razliku od brzine mešanja koja je ključna kada se radi o dimenzijama mikročestica. Vrednost srednjeg prečnika za 5 i 10 min homogenizovanja pri velikim brzinama mešanja je bila 4,2 μm, dok je pri najdužem vremenu homogenizovanja (15 min) ta vrednost bila manja i iznosila je 3,2 μm (tabela 1). Takođe, duže homogenizovanje ne utiče značajno na raspodelu veličina mikrosfera. Za dobijanje mikrosfera manjih dimenzija bolje je koristiti veće brzine mešanja tokom homogenizovanja pri kraćim vremenima mešanja velikim brzinama, čime bi bila izbegnuta eventualna mogućnost degradacije polimera koja je moguća pri dužim vremenima homogenizovanja.

Uticaj koncentracije PVA

Oblik i veličina mikrosfera se može menjati variranjem udela stabilizatora emulzija. Mikrosfere su dobijene na već opisan način, s tim što su pored promene koncentracije emulgatora ostali parametri bili konstantni: brzina mešanja i vreme homogenizovanja velikim

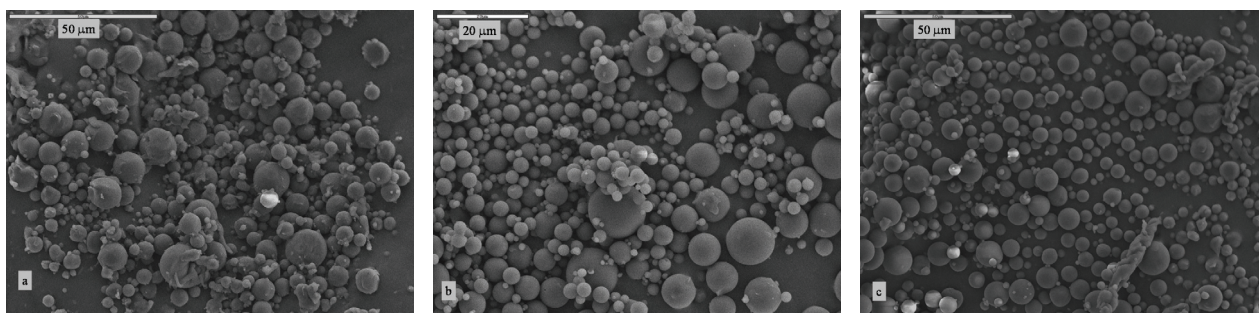
brzinama mešanja (18000 o min⁻¹, 5 min). Vrednosti srednjeg prečnika sfera imaju blagu tendenciju opadanja od 4,6 do 4,2 μm, sa porastom udela PVA od 0,2 do 1,0 mas.%, (tabela 1). Međutim, SEM slike (slika 4) pokazuju da udeo emulgatora ima značajan uticaj na stabilnost dobijenih čestica. Pri malim koncentracijama PVA od 0,2 mas.% uočeno je da su mikrosfere nepravilnijeg oblika i da su sklonije stvaranju aglomerata (slika 4a), što nije uočeno kod čestica dobijenih korišćenjem veće količine stabilizatora emulzije, 0,5 i 1,0 mas.% (slike 4b i 4c). Emulgator omogućava efikasniju disperziju organske faze, kao i stabilizaciju nastalih mikrosfera. Prema tome, veća koncentracija emulgatora omogućava dobijanje manjih i stabilnijih mikrosfera.

Na osnovu niza eksperimenata koji su izvedeni s ciljem dobijanja mikrosfera željenih prečnika i raspodele veličina čestica, odabrani su sledeći parametri za izradu inkapsuliranih mikrosfera: koncentracija emulgatora od 1,0 mas.%, brzina homogenizovanja od 18000 o min⁻¹ i vreme homogenizovanja od 5 min. Na slici 5 prikazan je histogram mikrosfera bez leka koje su dobijene pri ovim uslovima. Najzastupljenije su mikrosfere prečnika između 4 i 5 μm (oko 32%), zatim slede sfere sa dimenzijama od 3 do 4 μm (oko 29%), a čestice veličine 2–3 μm i 5–6 μm zastupljene su sa po 15%. Veće i manje mikrosfere su zastupljene manje od 4%.

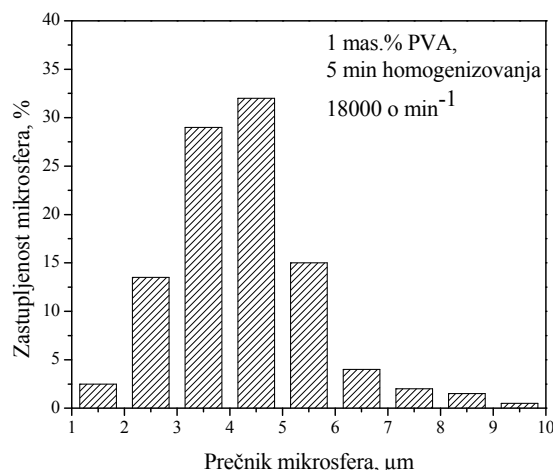
Mikrosfere inkapsulirane karbamazepinom

Za proučavanje kontrolisanog otpuštanja leka iz polimernih mikrosfera u ovom radu korišćen je karbamazepin, lek iz grupe antiepileptika.

Pri odabranim uslovima (1,0 mas.% PVA, brzina mešanja 18000 o min⁻¹ tokom formiranja emulzije u trajanju od 5 min) izrađene su mikrosfere sa 10 i 15 mas.% leka računato na masu polimera (tabela 2, uzorci PCL-H-10 i PCL-H-15). Određena je veličina dobijenih mikrosfera, kao i efikasnost inkapsulacije i analiziran je profil otpuštanja karbamazepina iz ovih mikrosfera. Radi poređenja profila otpuštanja leka iz malih mikrosfera (prečnika ispod 10 μm) i iz mikrosfera značajnije većih prečnika, pripremljene su i inkapsulirane mikrosfere bez korišćenja homogenizatora pri malim brzinama mešanja od 1000 o min⁻¹ (tabela 2, uzorci PCL-10 i PCL-15).



Slika 4. SEM slike mikrosfera dobijenih pri različitim udelima PVA: a) 0,2, b) 0,5 i c) 1,0 mas.%.
Figure 4. SEM photographs of the microspheres obtained with different amount of PVA: a) 0.2, b) 0.5 and c) 1.0 mass%.



Slika 5. Histogram raspodele veličina mikrosfera dobijenih pri uslovima: 1,0 mas.% PVA, 5 min homogenizovanja i brzina homogenizovanja 18000 o min^{-1} .

Figure 5. Histogram of particle size distribution of the microspheres prepared under the conditions: 1.0 mass% PVA, homogenization time of 5 min and stirring rate of 18000 rpm.

Tabela 2. Veličina mikrosfera inkapsuliranih karbamazepinom i efikasnost inkapsulacije
Table 2. Diameter of the drug encapsulated microspheres and the encapsulation efficiency

Uzorak	Brzina mešanja tokom homogenizovanja o min^{-1}	Koncentracija leka mas. %	Efikasnost inkapsulacije %	Prečnik mikrosfera μm
PCL-H-10	18000	10	69	$3,0 \pm 0,9$
PCL-H-15	18000	15	80	$4,0 \pm 1,6$
PCL-10	1000	10	71	$112,1 \pm 38,3$
PCL-15	1000	15	81	$109,5 \pm 31,1$

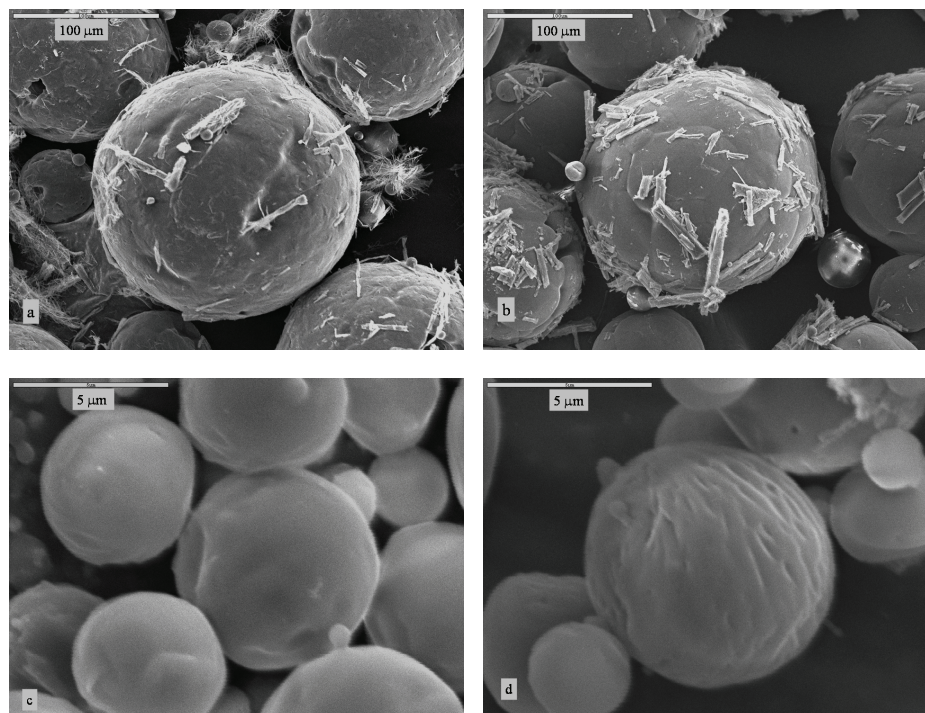
Inkapsulirane mikrosfere dobijene korišćenjem homogenizatora imaju srednje prečnike 3–4 μm , dok mikrosfere dobijene bez korišćenja homogenizatora imaju prečnike preko 100 μm . Pored razlike u veličini, uočene su i razlike u izgledu mikrosfera dobijenih pri različitim uslovima (slika 6).

Dok se kod mikrosfera koje su dobijene pri malim brzinama mešanja u postupku formiranja emulzije bez korišćenja homogenizatora (slike 6a i 6b) mogu jasno uočiti depoziti kristala leka na površini, to nije slučaj kod mikrosfera koje su dobijene korišćenjem homogenizatora (slike 6c i 6d). Mikrosfere dobijene bez homogenizatora imaju brazde i šupljine na svojoj površini, dok su mikrosfere dobijene uz korišćenje homogenizatora na površini glatke.

Efikasnost inkapsulacije

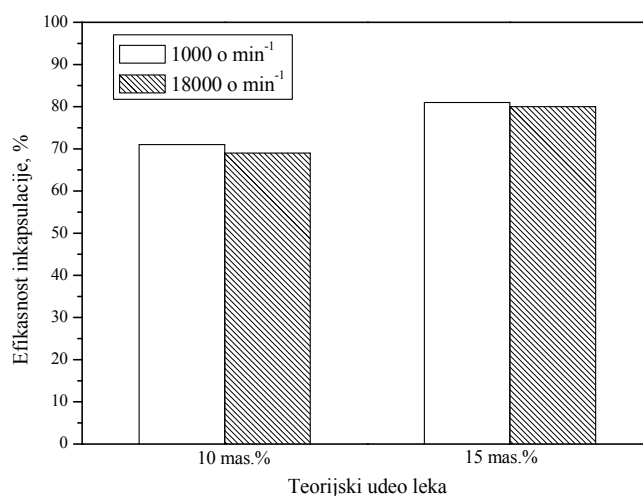
Izbor metode za pravljenje inkapsuliranih mikrosfera određen je, pre svega, rastvorljivošću leka koji se upotrebljava. Metoda ulje u vodi uz otparavanje rastvarača je primenjena upravo zbog male rastvorljivosti karbamazepina u vodi [26]. S obzirom na to da se lek nalazi u organskoj fazi, posle dispergovanja te faze u vodenoj, i nakon otparavanja rastvarača, najveća količina leka bi trebalo da se nalazi u dobijenim sferama. Slika 7 pokazuje kako se menja efikasnost inkapsulacije sa

promenom udela leka u organskoj fazi i sa brzinom mešanja pri formiranju emulzije. Efikasnost inkapsulacije raste kako raste udeo leka u uljanoj fazi, kako kod velikih mikrosfera (dobijenih pri malim brzinama mešanja tokom homogenizovanja) tako i kod mikrosfera čiji je prečnik svega nekoliko mikrona (dobijenih pri velikim brzinama mešanja tokom homogenizovanja). Kako se povećava teorijski udeo leka od 10 do 15 mas.%, efikasnost inkapsulacije se povećava od 71 do 81% kada su u pitanju mikrosfere sa prečnicima preko 100 μm , odnosno od 69 do 80% kada se radi o mikrosferama prečnika od 3 do 4 μm . Procenat inkapsuliranog leka je znatno manji kod mikrosfera koje su dobijene postupkom uz primenu homogenizatora za postizanje velikih brzina mešanja. Ovo ukazuje da korišćenje homogenizatora (tj. različite brzine mešanja tokom formiranja emulzije) nema uticaja na količinu inkapsuliranog leka, iako utiče na distribuciju leka u polimernoj matrici. Činjenica da se u mikrosferama dobijenim sa ili bez korišćenja homogenizatora nalazi približno ista količina leka, dok SEM analiza pokazuje da se na površini mikrosfera dobijenih bez korišćenja homogenizatora nalaze veći depoziti kristala karbamazepina, upućuje na pretpostavku da je lek u slučaju malih mikrosfera dobijenih uz korišćenje homogenizatora, ravnomernije inkorporiran u polimernu matricu.



Slika 6. SEM slike PCL mikrosfera sa različitim udelima leka dobijene pri različitim brzinama homogenizovanja: a) PCL-10, b) PCL-15, c) PCL-H-10 i d) PCL-H-15.

Figure 6. SEM photographs of PCL microspheres with different drug amount prepared with different stirring rates: a) PCL-10, b) PCL-15, c) PCL-H-10 i d) PCL-H-15.



Slika 7. Efikasnosti inkapsulacije za različite uzorke mikrosfera.

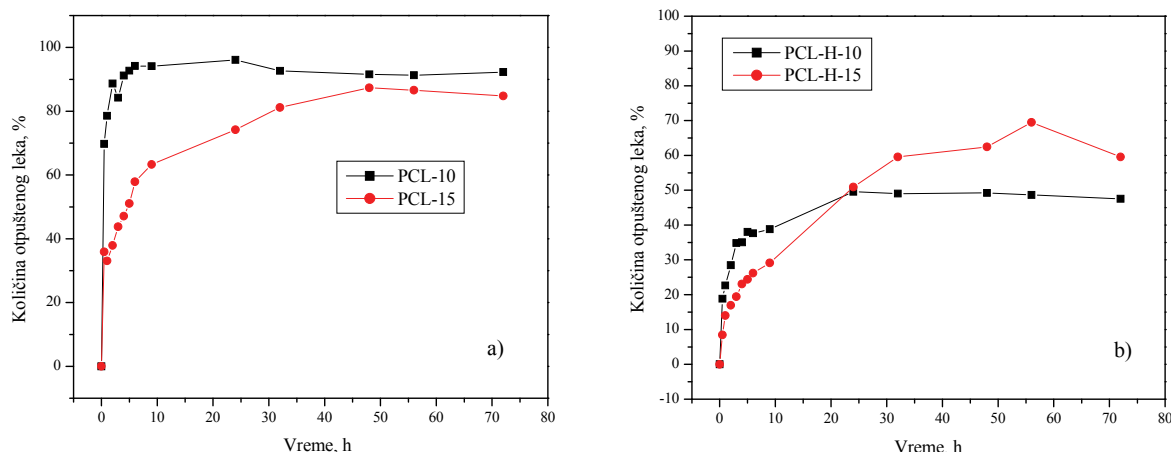
Figure 7. Encapsulation efficiency for different microspheres' samples.

In vitro otpuštanje karbamazepina

In vitro kumulativne krive otpuštanja karbamazepina iz mikrosfera u puferском rastvoru pri pH 7 na 37 °C prikazane su na slici 8. Dosadašnja ispitivanja su pokazala da je ukupna količina otpuštenog leka u određenom vremenskom intervalu obrnuto proporcionalna veličini mikrosfera, zbog smanjenja difuzionog puta i povećanja specifične površine kod manjih mikrosfera

[27]. Međutim, rezultati ovog rada pokazuju da veće mikrosfere otpuste više leka u spoljašnju puferску sredinu od manjih mikrosfera u toku 72 h trajanja ogleda.

To se može objasniti različitom distribucijom karbamazepina u polimernoj matrici kod mikrosfera dobijenih sa ili bez korišćenja homogenizatora, tj. pri velikim ili malim brzinama mešanja tokom formiranja emulzije (slika 6). U slučaju mikrosfera dobijenih korišćenjem homogenizatora, gde nisu uočeni depoziti leka na površini mikrosfera, lek napušta mikrosfere difuzijom



Slika 8. Profili otpuštanja karbamazepina iz mikrosfera dobijenih bez korišćenja homogenizatora (a) i uz korišćenje homogenizatora (b).
Figure 8. Carbamazepine release profiles from the microspheres obtained with the use of the homogenizer (a) and without the homogenizer (b).

kroz polimernu matricu, za šta je potrebno duže vreme. Kod mikrosfera koje su dobijene pri malim brzinama mešanja, bez korišćenja homogenizatora, kristali karbamazepina se nalaze i na površini sfera, tako da se u ovom slučaju karbamazepin lakše otpušta iz mikrosfera rastvaranjem u okolnom medijumu. Tako se za određeni vremenski period više leka otpusti iz većih mikrosfera (PCL-10, PCL-15) u poređenju sa mikrosferama dobijenim korišćenjem homogenizatora (PCL-H-10, PCL-H-15), kod kojih je lek bolje inkorporiran u polimernu matricu.

Postojanje kristala leka na površini mikrosfera je verovatno razlog velikog skoka početne koncentracije otpuštenog leka (oko 70%) kada se radi o velikim mikrosferama sa 10 mas% karbamazepina (slika 8a). Količina otpuštenog leka raste još neko vreme do oko 95%, da bi posle 10 h trajanja eksperimenta procenat otpuštenog leka ostao gotovo nepromenjen. Nešto drugačija slika je kod mikrosfera sličnih dimenzija, koje imaju veću količinu inkapsuliranog leka, 15 mas.%. Kod njih je manji početni skok količine otpuštenog leka, oko 35%, posle čega procenat otpuštenog leka raste ravnomerno sa vremenom otpuštanja. Plato u kom nema promene koncentracije otpuštenog leka se dostiže posle 50 h i iznosi oko 85% od ukupne količine inkapsuliranog leka.

Profil otpuštanja leka kod mikrosfera čije su dimenzije od 3–4 μm prikazan je na slici 8b. Može se uočiti da je profil otpuštanja leka iz manjih mikrosfera sa 10 mas% leka sličan profilu otpuštanja kao kod mikrosfera prečnika iznad 100 μm sa 15 mas.% leka. I ovde postoji početni skok koncentracije otpuštenog leka, ali je taj skok znatno manji u odnosu na prethodni slučaj, i iznosi oko 20%, posle čega je otpuštanje leka sporije i dostiže maksimum od oko 50%. Profil otpuštanja leka iz mikrosfera malih dimenzija sa 15 mas.% leka nema izražen početni skok koncentracije leka. Otpuštanje leka

je ravnomernije kod ovih mikrosfera u poređenju sa svim ostalim uzorcima, a plato koncentracije karbamazepina se dostiže posle oko 30 h trajanja ogleda i iznosi oko 65% od ukupne količine inkapsuliranog leka.

Kinetika otpuštanja leka

Kinetika otpuštanja leka iz polimerne matrice zavisi od mehanizma otpuštanja leka i može biti difuziono kontrolisana, kontrolisana interakcijama matrice sa rastvaračem ili hemijski kontrolisana. Ovo su tri idealna slučaja kod kojih je brzina otpuštanja dominantno određena difuzijom leka kroz polimernu matricu, interakcijom rastvarača sa matricom, kao što je bubrenje, ili kinetikom hemijskih procesa kao što su degradacija polimerne matrice ili raskidanje hemijskih veza između nosača i leka, kada je on hemijski vezan za polimer. U realnim sistemima mehanizam otpuštanja leka je često kombinacija navedenih idealnih slučajeva. PCL je biodegradabilan polimer koji sporo hidrolitički degradira, pa se može smatrati da ne dolazi do značajnije degradacije polimerne matrice za vreme trajanja eksperimenta kontrolisanog otpuštanja od 72 h, odnosno može se zanemariti otpuštanje leka uzrokovano degradacijom mikrosfera. Kinetika otpuštanja leka je ispitana na svim uzorcima korišćenjem različitih matematičkih modela otpuštanja leka: kinetika nultog reda (jednačina (1)), kao i Higuchi (jednačina (2)) i Peppas-ov model (jednačina (3)) [28–30]:

$$Q = k_0 t \quad (1)$$

$$Q = k_H t^{0.5} \quad (2)$$

$$Q = k_P t^n \quad (3)$$

Veličina Q predstavlja frakciju otpuštenog leka u vremenu t , dok su k_0 , k_H i k_P odgovarajuće konstante brzina otpuštanja leka prema navedenim modelima.

Tabela 3. Kinetički parametri otpuštanja karbamazepina iz mikrosfera
 Table 3. Kinetic parameters of carbamazepine release from the microspheres

Uzorak	Nulti red		Higuchi model		Peppas model		
	k_0	R	k_H	R	n	k_p	R
PCL-H-10	0,064	0,791	0,164	0,936	0,273	0,234	0,977
PCL-H-15	0,043	0,899	0,108	0,987	0,413	0,125	0,987
PCL-10	0,162	0,616	0,427	0,808	-	-	-
PCL-15	0,094	0,845	0,239	0,945	0,220	0,361	0,922

Posmatran je početni interval otpuštanja leka u trajanju od 9 h. U tabeli 3 predstavljene su vrednosti kinetičkih parametara dobijenih fitovanjem krivih otpuštanja leka korišćenjem različitih matematičkih modela, kao i faktori korelacije R dobijeni pri fitovanju podataka prema različitim modelima.

Idealni slučaj kontrolisanog otpuštanja leka bio bi onaj u kome otpuštanje leka prati kinetiku nultog reda, odnosno u jedinici vremena se otpusti uvek ista količina leka. U slučaju otpuštanja karbamazepina iz PCL mikrosfera dobijeno je loše slaganje sa kinetikom nultog reda (R vrednosti su bile u opsegu od 0,616 do 0,899). Analiza ostalih kinetičkih parametara pokazuje dobro slaganje sa Higuchi i Peppas modelom otpuštanja leka. Dobro slaganje profila otpuštanja leka sa Higuchi modelom, koji je postavljen na osnovu drugog Fick-ovog zakona, upućuje na to da je otpuštanje leka uglavnom kontrolisano difuzijom leka kroz polimernu matricu. Konstante brzina otpuštanja karbamazepina dobijene iz Higuchi modela pokazuju manje vrednosti za mikrosfere prečnika 3–4 μm , odnosno upućuju na sporije otpuštanje leka iz malih mikrosfera u poređenju sa sferama prečnika preko 100 μm . Ovo je u saglasnosti sa pretpostavkom na koju upućuju SEM slike uzoraka da se kod manjih mikrosfera lek pretežno nalazi u polimernoj matrici iz koje sporije, difuzijom odlazi u spoljašnju sredinu. Peppas model se uobičajeno koristi za procenu mehanizma otpuštanja leka i validan je samo za interval u kome se otpusti prvih 60% leka. U slučaju velikih mikrosfera sa 15 mas.% leka nije bilo moguće primeniti Peppas model, jer je interval u kome se otpusti 60% leka u slučaju ovih mikrosfera bio izuzetno kratak (za 30 min se otpusti više od 60% leka). Peppas model je opštiji od Higuchi modela i ukazuje na mehanizam otpuštanja leka iz polimerne matrice preko vrednosti parametra n . Parametar n ima različite granične vrednosti za razne vrste geometrija matrica. Vrednost parametra n za otpuštanje leka iz sfernih matrica pokazuje da li je u pitanju Fick-ova difuzija, ako je $n < 0,43$. Vrednost $n = 1$ ukazuje da je transport leka kontrolisan relaksacijom makromolekulskih lanaca usled interakcija sa rastvaračem (kinetika nultog reda), dok vrednosti ovog parametra u opsegu $0,43 < n < 1$ upućuju na kombinaciju ova dva mehanizma, što se naziva anomalni transport leka kroz polimernu matricu [28]. Vrednosti parametra n dobijene iz Peppas modela ukazuju da je u slučaju

otpuštanja karbamazepina iz PCL mikrosfera u pitanju Fick-ova difuzija, nezavisno od veličine mikrosfera i od načina na koji je lek inkorporiran u polimernu matricu.

ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada prikazano je dobijanje biodegradabilnih mikrosfera poli(ϵ -kapolaktona) emulzionim postupkom uz otparavanje rastvarača. Pri izradi mikrosfera, promena koncentracije emulgatora, brzina mešanja i dužina trajanja homogenizovanja velikim brzinama mešanja su uticali na veličinu mikrosfera. Najveća promena veličine mikrosfera dobijena je u slučaju promene brzine mešanja tokom homogenizovanja. Tada su dimenzije mikrosfera smanjivale od 9,2 do 2,8 μm sa povećanjem brzina mešanja tokom homogenizovanja od 10000 do 23000 o min^{-1} . Koncentracija emulgatora je imala manji uticaj na dimenzije sfera pri čemu se veličina mikrosfera blago smanjivala sa povećanjem koncentracije emulgatora, a takođe je uočeno da su pri najmanjoj koncentraciji emulgatora nastale čestice nepravilnijeg oblika, koje su sklonije pravljenju aglomerata. Promenom dužine trajanja homogenizovanja nije uočena pravilna tendencija u promeni prečnika mikrosfera.

Pri odabranim uslovima dobijene su mikrosfere inkapsulirane karbamazepinom (10 i 15 mas.% leka), uz korišćenje homogenizatora (18000 o min^{-1}), čiji su prečnici bili 3–4 μm . Paralelno je rađena i inkapsulacija mikrosfera pri malim brzinama mešanja (1000 o min^{-1}) tokom formiranja emulzije, pri čemu su dobijene mikrosfere imale znatno veće prečnike, preko 100 μm .

Efikasnost inkapsulacije je bila u opsegu od 69 do 81% i rasla je kako je rastao udeo leka u uljanoj fazi, a nije se bitno razlikovala kod uzoraka dobijenih pri različitim brzinama mešanja tokom formiranja emulzije.

Pored razlike u veličini mikrosfera dobijenih sa ili bez korišćenja homogenizatora, uočena je i različita distribucija leka u polimernoj matrici, što je znatno uticalo na profil otpuštanja leka iz ovih mikrosfera. Na površini mikrosfera dobijenih bez korišćenja homogenizatora uočeni su depoziti karbamazepina, što je uticalo na postojanje početnog naglog skoka koncentracije leka pri otpuštanju, kao i na veće ukupne količine otpuštenog leka u posmatranom vremenskom intervalu. Kod mikrosfera dobijenih uz korišćenje homogenizatora, lek je ravnomernije inkorporiran u polimernu matricu, usled čega se

ravnomernije otpušta, bez početnog skoka koncentracije leka kod nekih uzoraka.

Kinetički parametri iz primenjenih modela za otpuštanje leka pokazuju da je mehanizam transporta leka kroz polimernu matricu difuziono kontrolisan i dobijene vrednosti konstanti brzina otpuštanja pokazuju da se u početnim intervalima lek sporije otpušta iz mikrosfera dobijenih uz korišćenje homogenizatora.

Zahvalnica

Ovo istraživanje je deo projekata „Sinteza i karakterizacija polimera i polimernih (nano)kompozita definisane molekulske i nadmolekulske strukture“ (br. 142023) i „Razvoj metoda za separaciju, predkoncentrisanje, određivanje i uklanjanje zagađivača okoline“ (br. 142002) finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

REFERENCES

- [1] U. Edlund, A. Albertsson, Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, *Adv. Polym. Sci.* **157** (2002) 67–12.
- [2] V. Coccoli, A. Luciani, S. Orsi, V. Guarino, F. Causa, P. Netti, Engineering of poly(ϵ -caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic, *J. Mater. Sci. Mater. M.* **19** (2008) 1703–711.
- [3] J.-C. Jeong, J. Lee, K. Cho, Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release* **92** (2003) 249–258.
- [4] X. Wang, Y. Wang, K. Wei, N. Zhao, S. Zhang, J. Chen, Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release, *J. Mater. Process. Tech.* **209** (2009) 348–354.
- [5] M. Hombreiro Pérez, C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, A. Astier, M. Hoffman, R. Bodmeier, P. Maincent, The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug, *J. Control. Release* **65** (2000) 429–438.
- [6] D.R. Chen, J.Z. Bei, S.G. Wang, Polycaprolactone microparticles and their biodegradation, *Polym. Degrad. Stabil.* **67** (2000) 455–459.
- [7] S. Zhou, X. Deng, H. Yang, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials* **24** (2003) 3563–3570.
- [8] X. Wei, C. Gong, M. Gou, S. Fu, Q. Guo, S. Shi, F. Luo, G. Guo, L. Qiu, Z. Qian, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system, *Int. J. Pharm.* **381** (2009) 1–8.
- [9] S.-J. Park, Y.-M. Lee, S.-K. Hong, Release behaviors of porous poly(butylene succinate)/poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing indomethacin, *Colloid. Surface B* **47** (2006) 211–215.
- [10] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *Int. J. Pharm.* **278** (2004) 1–23.
- [11] M.A. Woodruff, D.W. Huttmacher, The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* **35** (2010) 1217–1256.
- [12] P.B. O'Donnell, J.W. McGinity, Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **28** (1997) 25–42.
- [13] J.K. Vasir, K. Tambwekar, S. Garg, Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system, *Int. J. Pharm.* **255** (2003) 13–32.
- [14] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* **21** (2000) 2475–2490.
- [15] A.A. Moshfeghi, G.A. Peyman, Micro- and nanoparticles, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **57** (2005) 2047–2052.
- [16] Y.Z. Guoqiang Yu, Xudong Shi, Zhanshuang Li, Zhihua Gan, Surface property and in vitro biodegradation of microspheres fabricated by poly(ϵ -caprolactone-*b*-ethylene oxide) diblock copolymers, *J. Biomed. Mater. Res.* **84A** (2008) 926–939.
- [17] R.L. Cleek, K.C. Ting, S.G. Eskin, A.G. Mikos, Microparticles of poly(D,L-lactic-*co*-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) blends for controlled drug delivery, *J. Control. Release* **48** (1997) 259–268.
- [18] Y. Hong, C. Gao, Y. Shi, J. Shen, Preparation of porous polylactide microspheres by emulsion-solvent evaporation based on solution induced phase separation, *Polym. Advan. Technol.* **16** (2005) 622–627.
- [19] G. Fontana, M. Licciardi, S. Mansueto, D. Schillaci, G. Giammona, Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake, *Biomaterials* **22** (2001) 2857–2865.
- [20] S. Freiberg, X.X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.* **282** (2004) 1–18.
- [21] Y.-Y. Yang, T.-S. Chung, N.P. Ng, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials* **22** (2001) 231–241.
- [22] S.-J. Park, K.-S. Kim, S.-H. Kim, Effect of poly(ethylene oxide) on the release behaviors of poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing erythromycin, *Colloids Surfaces B* **43** (2005) 238–244.
- [23] E. Esposito, R. Cortesi, C. Nastruzzi, Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, *Biomaterials* **17** (1996) 2009–2020.
- [24] A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hombreiro Pérez, C.M. Lehr, M. Hoffman, P. Maincent, Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique, *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 177–182.
- [25] D. Pepić, M. Spasojević, M.S. Nikolić, J. Djonlagić, Preparation of biodegradable porous poly(butylene succinate) microspheres, *Hem. Ind.* **62** (2008) 329–338.
- [26] H. Lee, S.-A. Park, H. Sah, Surfactant effects upon dissolution patterns of carbamazepine immediate release tablet, *Arch. Pharm. Res.* **28** (2005) 120–126.

- [27] S. Roy, M. Pal, B. K. Gupta, Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation, *Pharm. Res.* **9** (1992) 1132–1136.
- [28] P. Ritger, N. Peppas, 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, *J. Control. Release* **5** (1987) 23–36.
- [29] P. Costa, J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2001) 123–133.
- [30] N.S. Barakat, M.A. Radwan, In vitro performance of carbamazepine loaded to various molecular weights of poly (D,L-lactide-co-glycolide), *Drug Deliv.* **13** (2006) 9–18.

SUMMARY

OPTIMIZATION OF PREPARATION CONDITIONS OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) MICROSPHERES FOR CONTROLLED RELEASE OF CARBAMAZEPINE

Dragana S. Pepić, Darinka R. Anđelković, Marija S. Nikolić, Svetlana D. Grujić, Jasna A. Đonlagić

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Poly (ϵ -caprolactone), PCL, is an aliphatic polyester suitable for controlled drug release due to its biodegradability, biocompatibility, non-toxicity and high permeability to many therapeutic drugs. This study investigates the effect of the preparation parameters on the size and the morphology of the PCL microspheres and on the release profile of carbamazepine from these microspheres. The PCL microspheres were prepared using oil-in-water (o/w) emulsion solvent evaporation method with the poly(vinyl alcohol), PVA, as the emulsion stabilizer. The influence of the stirring rate applied during the emulsion formation, the homogenization time and the emulsifier concentration on diameter and size distribution of the microspheres was analyzed by scanning electron microscope (SEM). The initial emulsion was formed applying high stirring rates of 10000, 18000 and 23000 rpm, for homogenization times: 5, 10 and 15 min. The diameter was strongly influenced by the stirring rate, and the average particle size decreased from 9.2 to 2.8 μm with the increase of the stirring rate. Increasing the amount of PVA in the water phase from 0.2 to 1 mass% improved stabilization of the oil droplets and led to a slight decrease of the average particle diameter. Drug-loaded microspheres were prepared by the same technique using different amounts of carbamazepine (10 and 15 mass%), under given conditions (1.0 mass% PVA, stirring rate of 18000 rpm for a period of 5 min of emulsion formation). Additionally, microspheres were prepared by applying low stirring rate of 1000 rpm with 10 and 15 mass% of the drug. The SEM analysis showed that microspheres created with 18000 rpm stirring rate, had average diameters of 3–4 μm , and the microspheres prepared with 1000 rpm stirring rate were larger than 100 μm . It was also observed that, in the case of the large microspheres, carbamazepine was deposited on their surfaces, while the small microspheres had smooth surfaces without observable drug crystals. The encapsulation efficiency and the release behaviour of the carbamazepine were examined using high performance liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy (HPLC–UV). The drug encapsulation efficiencies were in the range from 69 to 81%, and were increasing with the increase of the amount of carbamazepine in both series. *In vitro* release experiments were carried out in the phosphate buffer solution (pH 7) at 37 °C. The release rate was influenced by the microspheres size and morphology. The larger microspheres released more carbamazepine (85–95%) compared to the small ones (50–65%) for the same period. This behavior was attributed to the different drug distribution in the PCL matrix. Different mathematical models were used to describe drug release kinetics. It was concluded that the mechanism of the carbamazepine release from the microspheres was diffusion-controlled, independent on the type of microspheres. The kinetic parameters showed that the release of carbamazepine was slower from the smaller microspheres, probably as a result of more even distribution of the drug in the polymer matrix.

Ključne reči: Izrada mikrosfera • Poli(ϵ -kaprolakton) • Emulzioni postupak uz otparavanje rastvarača • *In vitro* otpuštanje leka • Karbamazepin
Key words: Microspheres preparation • Poly(ϵ -caprolactone) • Emulsion Solvent evaporation method • *In vitro* drug release • Carbamazepine