

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena R. Mudrić

Doktorska disertacija

**RAZVOJ ČVRSTIH FARMACEUTSKIH OBLIKA
NA BAZI GASTRORETENTIVNIH
FLOTIRAJUĆIH NOSAČA SA
INKAPSULIRANIM EKSTRAKTOM KORENA
LINCURE (*GENTIANA LUTEA* L.,
GENTIANACEAE)**

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jelena R. Mudrić

Doctoral dissertation

**DEVELOPMENT OF SOLID
PHARMACEUTICAL FORMS BASED ON
GASTRORETENTIVE FLOATING CARRIERS
WITH ENCAPSULATED GENTIAN ROOT
EXTRACT (*GENTIANA LUTEA* L.,
GENTIANACEAE)**

Belgrade, 2024

MENTORI

Dr sc. Jelena Đuriš, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Katarina Šavikin, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ljiljana Đekić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Bojana Vidović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Teodora Janković, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

Dr sc. Nada Ćujić Nikolić, viši naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

U Beogradu, _____

Želela bih da se zahvalim svojim učiteljima, nastavnicima, profesorima, kolegama, prijateljima i članovima porodice, koji su me svojom podrškom i primerom nadahnuli da istražujem, saznajem i radim sa puno ljubavi i elana. Ova doktorska disertacija plod je naših zajedničkih zalaganja.

*Posebno bih želela da se zahvalim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. Ploviti kroz ovu životnu etapu sa vama bilo je lakše, lepše, pa čak i zabavnije, jer se iza broja 007 krije jedno čudesno mesto gde se radi, ali i mašta, raduje i ohrabruje. Neizmerno sam zahvalna **prof. dr Svetlani Ibrić** na ukazanom poverenju, na tome što mi je svojom energičnošću i entuzijazmom otvorila nove vidike i dala vetar u leđa. Veliko hvala **prof. dr Ljiljani Đekić** na značajnom doprinosu koji je dala izradi ove doktorske disertacije svojom predanošću i marljivim radom u toku eksperimentalne faze, korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije, ali i podršci i toplini na ovom izazovnom putu. Posebnu zahvalnost dugujem **dr Đorđu Medareviću** na uloženom trudu, nesebičnoj pomoći i konstruktivnim savetima koji su doprineli boljem sagledavanju i razumevanju formulisanih lipidnih sistema. Veliko zadovoljstvo mi je bilo raditi sa **mag. farm. Mirjanom Krstić** i **mag. farm. Jelenom Đoković**, pored vas mi ni neuspešne formulacije nisu teško pale. Hvala mojoj dragoj kolegici **mag. farm. Ivani Kurćubić** što je sa mnom prijateljski delila stečeno znanje o karakterizaciji mukoadhezivnih sistema. **Prof. dr Bojani Vidović** i **mag. farm. med. biohem. Tijani Ilić** sam neizmerno zahvalna na posvećenom vremenu, velikoj motivaciji i trudu koji su uložile u izradu ove doktorske disertacije, a posebno u delove koji se tiču antioksidativne aktivnosti. Uživala sam u traganju za oku nevidljivim strukturama, koje sam uspela da sagledam u prijatnoj atmosferi Katedre za botaniku uz pomoć **prof. dr Violete Slavkovske** kojoj se iskreno zahvaljujem na uloženom trudu.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojim kolegama i prijateljima iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Imati takve kolege pravo je bogatstvo, hvala što ste mi snažan oslonac i što nesebično delite znanje i iskustvo koje imate. Posebno hvala **dr Nebojši Menkoviću** koji mi je bez zadržke prenosio ljubav prema lekovitom bilju i znanje o lincuri koje je godinama sakupljao. Pored njega sam naučila da se formula koja donosi uspeh sastoji iz radoznalosti deteta, upornosti i predanog rada i truda. Od samog početka mi je bila čast sarađivati sa **dr Teodorom Janković**, koja je izvrstan naučnik, ali i učitelj. Njene konstruktivne kritike, smernice, detaljna razmatranja, diskusije i otvorenost za sva moja „ali“ pitanja značajno su unapredile ovu doktorsku disertaciju, a meni kao mladom istraživaču su bile od velike koristi. Mojoj dragoj kolegici **dr Nadi Čujić Nikolić** sam neizmerno zahvalna na tome što je od samog početka verovala u mene i što je pravi timski igrač, koji je spreman da podeli znanje i iskustvo, pomogne u teorijskom i praktičnom radu i povuče napred baš onda kada treba. Mojim mladim kolegama **dr Milici Radan**, **mag. farm. Nemanji Krgoviću** i **mag. farm. Milošu Jovanoviću** sa kojima na moju veliku radost blisko sarađujem sam iznad svega zahvalna što me podstiču da napredujem i stremim ka boljem, a učešćem u eksperimentalnom radu i korisnim sugestijama dali su veliki doprinos izradi ove doktorske disertacije.*

*Mojim mentorima **dr Katarini Šavikin** i **prof. dr Jeleni Đuriš** sam neizmerno zahvalna što su me zajedničkim snagama vodile kroz ovo nezaboravno i ponekad izazovno putovanje, koje je zahtevalo da sazrevam na ličnom i profesionalnom nivou. Prof. Jeleni sam beskrajno zahvalna što svojom predanošću, posvećenošću, blagošću, smirenošću i nesebičnošću predstavlja pravi primer u ljudskom i profesionalnom smislu. Kaći koja je uvek tu, nenametljiva, hvala na ukazanom poverenju, ljudskosti, stalnom usmeravanju, korisnim savetima i podršci u svim etapama izrade ove doktorske disertacije.*

Beskrajno hvala mojoj porodici, Nikoli za podršku i razumevanje, Sofiji za neiscrpnu motivaciju, mojim roditeljima Branki i Radetu za bezgraničnu ljubav i posvećenost.



Mojím rodičeljima

Razvoj čvrstih farmaceutskih oblika na bazi gastroretentivnih flotirajućih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*)

Sažetak

Koren lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*) se primenjuje kao tradicionalni biljni lek kod kratkotrajnog gubitka apetita i blagih dispeptičnih/gastrointestinalnih problema. Smatra se da su za povoljno delovanje ekstrakta korena lincure (EKL) lokalno na nivou gastrointestinalnog trakta i sistemski odgovorna bioaktivna jedinjenja iz grupa sekoiridoida, ksantona i iridoida. Genciopikrozid (GP), dominantno bioaktivno jedinjenje u EKL ima nisku biološku raspoloživost, kratko poluvreme eliminacije i neadekvatnu stabilnost pri pH vrednostima karakterističnim za donje delove gastrointestinalnog trakta.

Stoga, cilj ovog istraživanja obuhvatao je optimizaciju ekstrakcije korena lincure i razvoj tableta i kapsula na bazi gastroretentivnih lipidnih nosača sa inkapsuliranim EKL.

U okviru prve faze istraživanja pokazano je da se visok sadržaj GP, izogentizina i fenolnih jedinjenja iz korena lincure može ekstrahovati korišćenjem vodeno-etanolnog rastvora koncentracije 49 % (v/v) pri temperaturi od 65 °C, kada je odnos droga/rastvarač 1:40, a trajanje ekstrakcije iznosi 129 minuta. Veštačke neuronske mreže su bile pouzdanije i efikasnije u predviđanju i modelovanju ispitivanih odgovora u odnosu na metodologiju površine odgovora. U okviru druge faze istraživanja su dobijeni gastroretentivni nosači (čvrste lipidne mikročestice) adekvatnih karakteristika u koji je inkapsuliran EKL inovativnom metodom koja je podrazumevala liofilizaciju dvostrukih (voda/ulje/voda) emulzija sa čvrstim lipidom (Gelucire 43/01®). U okviru treće faze razvijene su tablete i kapsule na bazi gastroretentivnih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure primenom koncepta dizajna kvaliteta. Odabrane formulacije su okarakterisane visokim prinosom (> 92 %) i efikasnošću inkapsulacije (> 95 %), kao i zadovoljavajućim mehaničkim karakteristikama. Stabilnost ovih formulacija je bila adekvatna, s obzirom da su očuvani visok sadržaj genciopikrozida tokom 18 meseci i antioksidativna aktivnost tokom 12 meseci prirodnog starenja. Rezultati *in vitro* testa su pokazali da su formulisane tablete i kapsula flotirale duže od 6 sati. Pored toga, tablete su posedovale i mukoadhezivna svojstva, te se njihova gastroretencija zasnivala na dualnom mehanizmu. Rezultati ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja GP iz odabrane formulacije tableta pokazali su da je postignuto bifazno oslobađanje (29,04 % za 45 minuta i 67,95 % za 6 sati). U slučaju odabrane formulacije kapsula postignuto je produženo oslobađanje GP (30,56 % za 45 minuta i 100,57 % za 6 sati). Takođe, uočeno je da je u slučaju kapsula tokom ovog testa formirana disperzija nanoasocijata već nakon 15 minuta, pri čemu je indeks polidisperznosti bio manji od 0,250, što bi moglo da bude od značaja sa aspekta povećanja biološke raspoloživosti. Rezultati testa *in vitro* digestije su ukazali da gastrični i intestinalni enzimi mogu značajno uticati na oslobađanje GP iz formulisanih tableta i kapsula na bazi lipidnih gastroretentivnih nosača.

Dobijeni rezultati ukazuju da je optimizovan proces ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz korena lincure i da je razvijen postupak kojim je moguće dobiti tablete i kapsule na bazi gastroretentivnih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure.

Ključne reči: optimizacija ekstrakcije, veštačke neuronske mreže, metodologija površine odgovora, genciopikrozid, čvrste lipidne mikročestice, dvostruke emulzije, koncept dizajna kvaliteta, lipidni gastroretentivni nosači, tablete, tvrde kapsule, *in vitro* digestija.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

Development of solid pharmaceutical forms based on gastroretentive floating carriers with encapsulated gentian root extract (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*)

Abstract

Gentian (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*) root is used as a traditional herbal medicinal product for temporary loss of appetite and mild dyspeptic/gastrointestinal disorders. Systematic and local gastrointestinal (GI) actions of gentian root extract are associated mainly with the presence of secoiridoid compounds, xanthenes as well as iridoids. Gentiopicroside (GP), the dominant bioactive compound in gentian root extract, has a low bioavailability, short elimination half-life and inadequate stability at pH values in the lower part of the GI tract.

Therefore, the aim of the research was the optimization of gentian root extraction and the development of tablets and capsules based on gastroretentive carriers with encapsulated gentian root extract.

In the first phase of the research, it was shown that the high content of GP, isogentisine and phenolic compounds was extracted from gentian roots using a water-ethanol solution (49 %, v/v) at a temperature of 65 °C, when the drug/solvent ratio was 1: 40, and the duration of the extraction is 129 minutes. The prediction capacity of the model obtained by using artificial neural networks (ANN) was superior in comparison with models obtained by using response surface methodology (RSM). In the second phase of the research, a suitable gastroretentive carrier (solid lipid microparticles) with encapsulated gentian root extract was obtained by an innovative method that involved lyophilization of double (water/oil/water) emulsion with the solid lipid (Gelucire 43/01®). In the third phase, tablets and capsules based on gastroretentive carriers with encapsulated gentian root extract were developed using the quality by design (QbD) approach. Selected tablet and capsule formulations were characterized with high yield (> 92 %) and encapsulation efficiency (> 95 %) of GP, as well as appropriate mechanical properties. The results showed that the high gentiopicroside content (during 18 months) and antioxidant activity (during one year) were preserved, indicating that the stability of the selected formulations was high. The flotation of tablets and capsules lasted longer than 6 hours. Furthermore, tablets showed mucoadhesive properties, and thus gastroretention of tablets was based on a dual mechanism. Results of the *in vitro* release study have shown that the dissolution of GP from the selected tablet formulation was biphasic (29.04 % in 45 minutes; 67.95 % in 6 hours). Prolonged release of GP (30.56 % in 45 minutes; 100.57 % in 6 hours) from selected capsules formulation was achieved. It was shown that during this test dispersion of nanoassociates was formed after 15 minutes, while the polydispersity index was less than 0.250 in the case of capsules, that may be beneficial for a prospective increase of bioavailability. The results of the *in vitro* digestion test indicated that influence of gastric and intestinal enzymes on the release of GP could be significant in the case of formulated lipid-based gastroretentive tablets and capsules.

The obtained results implied that extraction of bioactive compounds from gentian root was optimized. Also, capsules and tablets based on gastroretentive carriers with encapsulated gentian root extract were developed.

Keywords: extraction optimization, artificial neural networks, response surface methodology, gentiopicroside, solid lipid microparticles, double emulsions, quality by design, lipid-based gastroretentive carriers, tablets, hard capsules, *in vitro* digestion.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical technology

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Lincura (<i>Gentiana lutea</i> L.).....	2
1.1.1 Rod <i>Gentiana</i>	2
1.1.2 Opis i rasprostranjenost vrste <i>Gentiana lutea</i>	3
1.1.3 Hemijski sastav korena lincure i biofarmaceutske karakteristike genciopikrozida	4
1.1.3.1 Iridoidi	4
1.1.3.2 Ksantoni.....	6
1.1.4 Upotreba	7
1.1.5 Pregled bioloških aktivnosti i farmakoloških dejstava	8
1.2 Primena koncepta dizajna kvaliteta u fazi razvoja farmaceutskeg proizvoda sa ekstraktom korena lincure.....	11
1.3 Ekstrakcija biljnog materijala	13
1.3.1 Eksperimentalni dizajn	14
1.3.2 Statistička procena modela	16
1.3.3 Veštačke neuronske mreže	17
1.4 Gastroretentivni terapijski sistemi	19
1.4.1 Fiziološke karakteristike želuca.....	19
1.4.2 Formulacioni pristupi	23
1.4.2.1 Mukoadhezivni sistemi.....	24
1.4.2.2 Sistemi kontrolisani gustinom (flotirajući i potapajući sistemi).....	25
1.4.2.3 Ekspandirajući sistemi.....	27
1.4.2.4 Magnetni sistemi.....	27
1.4.2.5 Dualni sistemi.....	27
1.4.3 Karakterizacija gastroretentivnih terapijskih sistema	28
1.5 Mikroinkapsulacija	29
1.6 Dvostruke emulzije.....	33
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36
3. EKSPERIMENTALNI DEO	38
3.1 Prva faza istraživanja – Optimizacija procesa ekstrakcije korena lincure	39
3.1.1 Materijali	39
3.1.1.1 Biljni materijal.....	39
3.1.2 Metode	39
3.1.2.1 Postupak ekstrakcije	39
3.1.2.2 Skrining parametara ekstrakcije	39
3.1.2.3 Optimizacija korišćenjem metodologije površine odgovora	40
3.1.2.4 Veštačke neuronske mreže.....	42
3.1.2.5 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	42

3.1.2.6 Kvantitativna HPLC analiza	42
3.1.3 Rezultati i diskusija	43
3.1.3.1 Skrining faktora koji utiču na proces ekstrakcije genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola.....	43
3.1.3.2 Optimizacija ekstrakcije primenom metodologija površine odgovora	44
3.1.3.3 Modelovanje odgovara primenom veštačkih neuronskih mreža (ANN)	51
3.2 Druga faza istraživanja – Razvoj gastroretentivnog nosača sa mikroinkapsuliranim ekstraktom korena lincure.....	53
3.2.1 Materijali	53
3.2.2 Metode	53
3.2.2.1 Priprema ekstrakta korena lincure	53
3.2.2.2 Priprema dvostrukih emulzija.....	53
3.2.2.3 Karakterizacija dvostrukih emulzija	55
3.2.2.4. Priprema praškova	55
3.2.2.5 Karakterizacija praškova	56
3.2.2.6 Priprema tableta	57
3.2.2.7 Karakterizacija tableta	57
3.2.3 Rezultati i diskusija	60
3.2.3.1 Razvoj dvostrukih emulzija	60
3.2.3.2 Karakterizacija praškova	62
3.3 Treći faza istraživanja – Razvoj gastroretentivnih tableta i kapsula sa mikroinkapsuliranim ekstraktom korena lincure	76
3.3.1 Materijali	76
3.3.2 Metode	76
3.3.2.1 Priprema ekstrakta korena lincure	76
3.3.2.2 Procena rizika	76
3.3.2.3 Priprema dvostrukih emulzija.....	76
3.3.2.4 Priprema praška	77
3.3.2.5 Izrada tableta.....	77
3.3.2.6 Izrada kapsula	77
3.3.2.7 Karakterizacija dvostrukih emulzija	77
3.3.2.8 Karakterizacija praška	78
3.3.2.9 Karakterizacija tableta i kapsula.....	79
3.3.2.10 Statistička obrada rezultata	80
3.3.3 Rezultati i diskusija	81
3.3.3.1 Procena rizika	84
3.3.3.2 Karakterizacija emulzije	87
3.3.3.3 Karakterizacija praškovova	89
3.3.3.4 Karakterizacija tableta	94

3.3.3.5 Karakterizacija kapsula.....	102
4. ZAKLJUČAK.....	109
4.1 Zaključci prve faze istraživanja.....	110
4.2 Zaključci druge faze istraživanja.....	111
4.3 Zaključci treće faze istraživanja	112
4.4 Sveobuhvatni zaključak.....	113
5. LITERATURA	114
Biografija.....	133

1. UVOD

1.1 Lincura (*Gentiana lutea* L.)

1.1.1 Rod *Gentiana*

Familija *Gentianaceae* obuhvata oko 100 rodova i 1800 vrsta biljaka rasprostranjenih u celom svetu. Biljke iz ove familije su jednogodišnje ili višegodišnje većinom zeljaste biljke, koje rastu u različitim klimatskim i vegetacionim uslovima, uključujući tropske šume i savane, šume umerenog pojasa i prerijske, arktičke i alpske regione (1). Smatra se da je familija dobila naziv po ilirskom caru Genciju, koji je prema Dioskoridu koristio biljke roda *Gentiana* L. za lečenje kuge još 167 godine pre nove ere (2). *Gentiana* L. je najveći rod koji obuhvata oko 400 vrsta (Slika 1). Pripada redu *Gentianales*, nadredu *Gentiananae*, podklasi *Asteridae*, klasi *Magnoliopsida* (3). Vrstama roda *Gentiana* pripadaju višegodišnje, ređe jednogodišnje ili dvogodišnje biljke, koje imaju uspravno, a neke i poganjano stablo sa obično naspramnim listovima i krupnim aktinomorfnim cvetovima. Cvetovi su najčešće plave boje, a sreću se i žuti, crveni, beli i zeleni (4). Većina vrsta raste u planinskim krajevima na visinama preko 1000 m nadmorske visine. Stanište najvećeg broja vrsta je u Aziji (312 vrsta), dok manji broj raste u Severnoj i Centralnoj Americi (35 vrsta) i Evropi (27–29 vrsta), a retke su u Južnoj Americi (3 vrste), Africi (2 vrste, samo u Maroku) i Australiji (1 vrsta) (5).

Mnoge biljke ovog roda (*Gentiana lutea* L., *Gentiana olivieri* Griseb; *Gentiana scabra* Bunge; *Gentiana kurroo* Royle; *Gentiana asclepiadea* L.; *Gentiana cruciata* L.; *Gentiana rigescens* Franch) se koriste kao lekovite širom sveta. Tradicionalno se najčešće upotrebljavaju u svrhu povećanja apetita, lečenja gastrointestinalnih tegoba, metaboličkih bolesti (dijabetes), urinarnih i menstrualnih problema, kao sredstvo sa analgetičkim, antireumatskim i antimikrobnim delovanjem. Do sada je u biljkama roda *Gentianae* identifikovano oko 600 bioaktivnih jedinjenja, kojima se pripisuju mnogobrojne biološke aktivnosti. Delovanje lekovitih biljaka ovog roda najčešće se dovodi u vezu sa prisutnim jedinjenjima iz grupe iridoida, ksantona i flavonoida (6).



Slika 1. Predstavnici roda *Gentiana*: A) *G. dahurica*; B) *G. straminea*; C) *G. crassicaulis*; D) *G. robusta*; E) *G. siphonantha*; F) *G. dendrologi*; G) *G. waltonii*; H) *G. tibetica*; I) *G. lhassica*; J) *G. officinalis*; preuzeto iz Mirzaee i sar. (2).

1.1.2 Opis i rasprostranjenost vrste *Gentiana lutea*

Jedna od najpoznatijih vrsta roda *Gentiana* je *Gentiana lutea* L. (Slika 2), čiji koren (*Gentianae radix*) predstavlja oficinalnu drogu u mnogim farmakopejama (7–9), a pored toga se tradicionalno koristi od davnina. U literaturi se navode četiri podvrste *G. lutea* 1) subsp. *lutea* 2) subsp. *monserratii* 3) subsp. *vardjanii* i 4) subsp. *symphiandra*, koja dominira na teritoriji R. Srbije (10). U našem narodu *G. lutea* najčešće je poznata kao lincura (žuta lincura), dok Tucakov navodi da se sreću i sledeći nazivi: vladisavka, gencijan, gorčica, sviščak, cvič, košutina brada, trava od srdobolje, raven, srčenjak, linejura, itd. (11).



Slika 2. Izgled vrste *Gentiana lutea* L., preuzeto iz Akbar (12).

Lincura je višegodišnja zeljasta biljka, koja raste na planinskim livadama i pašnjacima, proplancima i retkim šumama centralne i južne Evrope, Male Azije i zapadne Azije, najčešće na krečnjačkim, a u manjoj meri i na silikatnim i serpentinskim podlogama (7,10,13). U Srbiji lincura samoniklo raste na Maljenu, Mokroj gori, Divčibarama, Zlatiboru, Stolu, Staroj planini, Suvoj planini i na Prokletijama (14). Stablo je uspravno, nerazgranato, visoko 1 do 2 m. Listovi su naspramni, prizemni na drškama, širokoeliptični, plavičastozeleni, meki. U gornjem delu stabla, listovi su sedeći, jajasti, zašiljeni, pri osnovi srasli u rukavac. Nervatura listova je paralelna. Cvetovi su žuti, u mnogocvetnim zbijenim cvastima, bočno postavljenim u odnosu na stabljiku. Krunica je deljena na pet do šest lancetastih režnjeva, a čašica je bela, opnasta. Koren i rizom starijih biljaka mogu biti dužine preko 1 m i težine do 7 kg (svež). Rizom je kratak, grana se na veći broj dugih, debelih korenova. Plod je kupasta čaura (15). Treba napomenuti da lincura izgledom podseća na čemeriku (*Veratrum album* L., *Melanthiaceae*), koja je vrlo otrovna. Ključna razlika je u tome što su kod čemerike listovi naizmenični, dok su kod lincure naspramni (13).

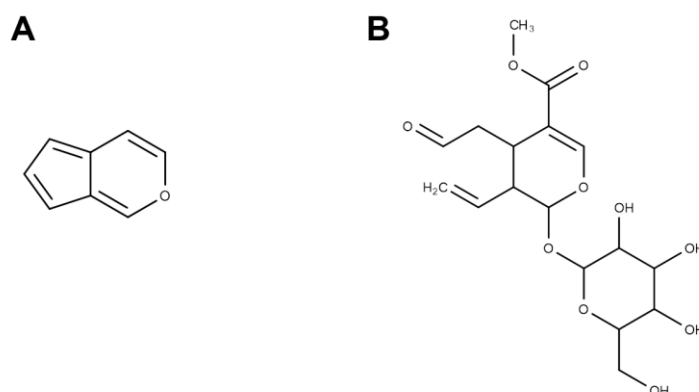
Nažalost, usled intezivne i nekontrolisane eksploatacije, kako u Srbiji, tako i u većem delu Evrope, opstanak lincure u prirodnim staništima je ugrožen i iz tog razloga je stavljena pod zaštitu (13,16). Lincura se danas plantažno gaji u Nemačkoj i Francuskoj, kao i u planinskim predelima južnih i jugozapadnih delova naše zemlje, a u cilju dobijanja korena koji se koristi u proizvodnji alkoholnih pića i farmaceutskih proizvoda (13,17).

1.1.3 Hemijski sastav korena lincure i biofarmaceutske karakteristike genciopikrozida

Brojna bioaktivna jedinjenja su identifikovana u ekstraktima korena lincure, a najvećim delom su klasifikovana kao sekoiridoidi, iridoidi i ksantoni (18). Iz korena lincure je izolovan i alkaloid gencijanin, za koji se smatra da nastaje tokom procesa sušenja droge (19). U manjoj količini su prisutni i fitosteroli i fenolne kiseline (20). Pored bioktivnih jedinjenja u korenu lincure su prisutni i ugljeni hidrati (30–55 %), uključujući monosaharide (glukoza i fruktoza), disaharide (saharoza i genciobioza), trisaharide (2,5–8 % gentianoza) i polisaharide (pektin, inulin), kao i male količine etarskog ulja (0,1–0,2 %) i aminokiselina (13). Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u korenu lincure u mnogome zavisi od klimatskih i geografskih uslova, kao i sezone u kojoj je izvršeno sakupljanje korena, ali i od toga da li je u pitanju koren samonikle ili gajene biljke (7).

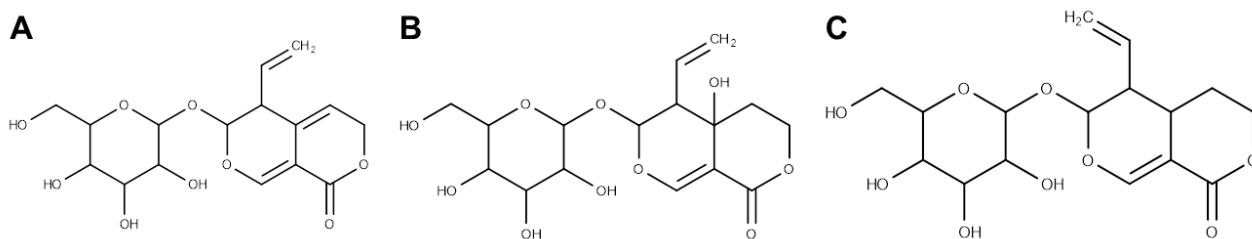
1.1.3.1 Iridoidi

Iridoidi su monoterpenska biciklična jedinjenja, koja su derivati iridana, ciklopentan-(c)-pirana (Slika 3). Jedinjenja ovakve strukture su prvi put izolovana iz mrava roda *Iridomirmex*, pa su iridoidi trivijalni naziv dobili po njima. Prisutni su u mnogim biljkama, a najčešće se sreću u biljkama familija *Gentianaceae*, *Lamiaceae*, *Oleaceae*, *Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*. Iridoidima se smatraju pravi iridoidi, sekoiridoidi i valepotrijati, kao i aminoderivati, koji su zapravo alkaloidi. Naziv sekoiridoidi potiče od latinske reči "*seco, secare*" što znači prekinuti, jer ova jedinjenja imaju otvoren osnovni iridoidni prsten između C-7 i C-8 (4,21,22). Sekoiridoidni heterozidi najčešće nastaju vezivanjem šećera (D-glukoze) za C-1 aglikona, a kao i većina drugih heterozida lokalizovani su u vakuolama parenhimskih ćelija i rastvoreni su u ćelijskom soku (19).

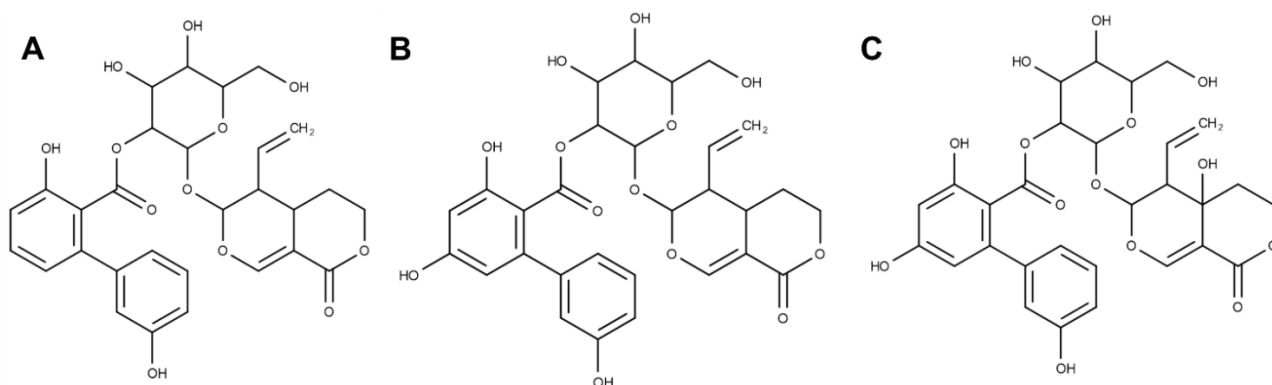


Slika 3. A) ciklopentan-(c)-piran; B) strukturna formula sekologanina.

Gorak ukus korena lincure potiče upravo od sekoiridoidnih heterozida, zbog čega se ova droga tradicionalno primenjuje kao gorko sredstvo (*Amara pura*). Istraživanja pokazuju da je genciopikrozid dominantno jedinjenje (1,85–9,53 %), dok je sadržaj svercijamarina (0,08–0,45 %) i sverozida (0,05–0,35 %) nešto niži. Pored navedenih sekoiridoidnih jedinjenja (Slika 4), lincura sadrži i specifične bifenilne derivate, tj. estre sekoiridoidnih heterozida sa bifenilnim kiselinama (Slika 5). Ova jedinjenja nose prefiks amaro (amarosverin, amaropanin i amarogencin), a amarogencin (0,01–0,07 %) je poznat kao jedno od jedinjenja sa najvećim indeksom gorčine, koji iznosi 58 000 000 (13,19). Takođe, u korenu lincure je identifikovana i loganska kiselina, koja ima strukturu iridoida (18).



Slika 4. Sekoiridoidni heterozidi prisutni u korenu lincure: A) genciopikrozid; B) svercijamarin; C) sverozid.



Slika 5. Bifenilni derivati sekundarnih heterozida: A) amaropandin; B) amarogencin; C) amarosverin.

Poslednjih godina sve veća pažnja se pridaje istraživanjima koja se bave proučavanjem farmakoloških aktivnosti genciopikrozida, a u okviru kojih je pokazano da genciopikrozid poseduje hepatoprotektivno delovanje (23), antiinflamatornu aktivnost (24), kao i antioksidativno (25), analgetičko (26), antitumorsko (27), spazmolitičko (28) i prokinetičko delovanje (29).

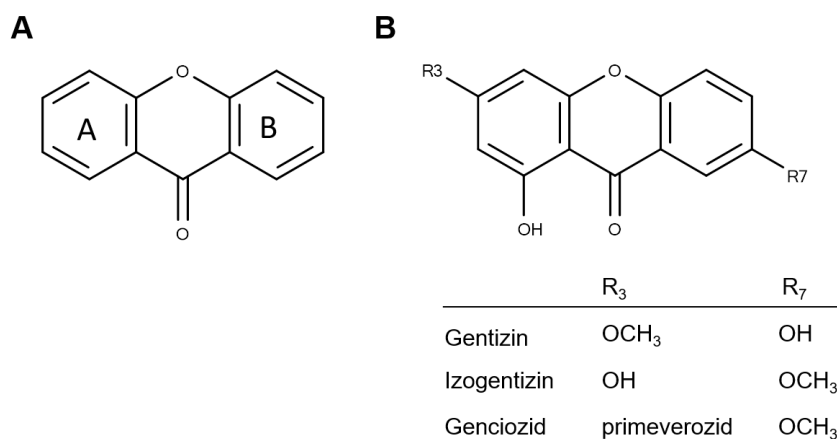
Literaturni podaci ukazuju da su secoiridoidi nestabilni. Tačnije, primećeno je da je genciopikrozid nestabilan u alkoholnim rastvorima i da je tokom skladištenja na temperaturi od 25 °C i 40 °C njegov sadržaj značajno opao tokom 6 meseci (30). Pored toga, niska biološka raspoloživost i kratko poluvreme eliminacije ograničavaju delovanje dominantnog bioaktivnog jedinjenja prisutnog u korenu lincure, te je sugerisano da postoji potreba za čestim doziranjem, kao i razvojem formulacija koje omogućavaju usporeno oslobađanje genciopikrozida. Biološka raspoloživost genciopikrozida primenjenog kod pacova u dozi od 100 mg/kg je bila vrlo niska (10,3 %), dok je kod miševa bila nešto viša (39,6 %), a doza je iznosila 150 mg/kg (31,32). Smatra se da razlog niske biološke raspoloživosti pomenutog jedinjenja može biti to što genciopikrozid podleže ekstenzivnom metabolizmu prvog prolaza i/ili izraženom metabolizmu koji vrše bakterije intestinalne mikrobiote i/ili niskoj apsorpciji u gastrointestinalnom traktu (31,33,34). Interesantno je da je u studiji na pacovima pokazano da je biološka raspoloživost genciopikrozida prisutnog u dekaktu korena lincure bila gotovo dvostruko veća u poređenju sa izolovanim genciopikrozidom, što znači da druga jedinjenja prisutna u dekaktu doprinose apsorpciji genciopikrozida (33). Ova činjenica govori u prilog tome da sa farmakokinetičkog aspekta ekstrakt ima prednost u odnosu na izolovani genciopikrozid, jer se na taj način pospešuje apsorpcija i povećava se biološka raspoloživost genciopikrozida.

Takođe, uočeno je da se veće koncentracije genciopikrozida u želudcu, crevima i jetri postižu nakon peroralne nego nakon intravenske primene iste doze, što znači da peroralni put primene predstavlja put izbora kada je reč o preparatima sa ekstraktom korena lincure od kojih se očekuje povoljan efekat na gastrointestinalni trakt. Međutim, poluvreme eliminacije nakon peroralne primene bilo je relativno kratko i iznosilo je 2,8 sati (32). Na osnovu *in vitro* istraživanja, zaključeno da je genciopikrozid stabilan u želucu, tankom crevu i jetri, dok u uslovima karakterističnim za debelo crevo dolazi do intenzivne degradacije ovog jedinjenja (35). Studija na Caco-2 ćelijama je pokazala

da se apsorpcija genciopikrozida odvija pasivnim transportom, dok P-glikoprotein podstiče eliminaciju genciopikrozida (36), pri čemu treba imati u vidu da je ovaj efluksni transporter manje zastupljen u gornjim partijama gastrointestinalnog trakta. Prilikom razvoja proizvoda sa ekstraktom korena lincure važno je razmotriti rastvorljivost i permeabilnost genciopikrozida, jedinjenja klase 3 biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BSK), koje se dobro rastvara u vodi (7,65 g/100 g na 23 °C), ali ima nisku permeabilnost ($\log P$ -1,21), te usled toga njegova apsorpcija može biti smanjena (37).

1.1.3.2 Ksantoni

Ksantoni su polifenolna jedinjenja dibenzo- γ -pironske strukture (Slika 6). U korenu lincure se nalaze u formi glukozida i mono- ili polimetilovanih etara, a usled njihovog prisustva koren je karakteristične žute boje. Ova jedinjenja privlače sve veću pažnju zbog toga što pokazuju antioksidativno, antibakterijsko, antitumorsko i hepatoprotektivno delovanje (7). Ksantoni identifikovani u korenu lincure su izogentizin (0,03–0,48 %) i njegov pozicioni izomer gentizin, kao i metilgentizin, gentizein, 1-hidroksi-3,7-dimetoksiksanton, 1,3,7-trimetoksiksanton, dihidroksi-1,3-dimetoksi-2,7-ksanton, gentizin-1-O-primverozid i gentiozid 7-O-primverozid (13). Za razliku od sekoiridoida istraživanja pokazuju da su ksantoni stabilni u alkoholnim rastvorima (30).



Slika 6. A) osnovna struktura ksantona; B) ksantoni prisutni u korenu lincure.

1.1.4 Upotreba

U važećoj Evropskoj farmakopeji se navodi da oficinalnu drogu *Gentianae radix* (Slika 7) čine osušeni komadi korena lincure (*Gentiana lutea* L.). Nakon sušenja koren je nepravilno cilindričnog oblika, različitih dužina (obično 5–15 cm), prečnika 5–40 mm. Koren je uzdužno naboran i na površini se mestimično uočavaju ožiljci. Rizom i koren su krhki, a poznato je da brzo upijaju vlagu iz vazduha, te lako postaju fleksibilni. Površina je žućkasto-braon ili sivkasto-braon boje, poprečni presek je žućkaste ili crvenkasto-žute boje, pri čemu je važno da droga ne dobije crvenkasto-braon boju, što ukazuje na neodgovarajući kvalitet sirovine (38). Koren se vadi u jesen i suši se odmah nakon sakupljanja, kako ne bi došlo do fermentacije. Fermentacija za posledicu ima smanjenje sadržaja bioktivnih jedinjenja, kao i tamnjenje sirovine tj. dobijanje prethodno pomenute crvenkasto-braon boje (7). Prema zahtevima Ph. Eur. 11.0 neophodno je da indeks gorčine droge bude minimalno 10 000, kao i da vodenom ekstrakcijom bude ekstrahovano najmanje 33 % mase droge, a da ukupni pepeo bude najviše 6 %. Prema monografiji Evropske agencije za lekove koren lincure se može primenjivati kao (39):

- 1) osušena usitnjena droga za pripremu čaja (infuza), 1–3 puta dnevno po 0,6–2 g u 150 ml vode;
- 2) suvi ekstrakt (odnos mase droga i ekstrakta 4,5–5,5:1, etanol 53 % v/v) 2–3 puta dnevno po 240 mg;
- 3) tečni ekstrakt (odnos mase droga i ekstrakta 1:1, etanol 45 % v/v) 2–4 puta dnevno po 1 g;
- 4) tinktura (odnos droga/rastvarač 1:5, etanol 70 % v/v) 1–3 puta dnevno po 1 ml.

Kako su biljni preparati koji sadrži koren lincure prisutni na evropskom tržištu više od 30 godina, Komitet za biljne lekovite proizvode (engl. *Committee on Herbal Medicinal Products* – HMPC) objavio je monografiju o tradicionalnoj upotrebi, prema kojoj se koren lincure primenjuje kao tradicionalni biljni lek kod kratkotrajnog gubitka apetita i blagih dispeptičnih/gastrointestinalnih poremećaja. Prema navedenim monografijama koren lincure se u svrhu lečenja navedenih indikacija upotrebljava peroralnim putem, pola sata pre obroka u slučaju tečnih preparata (čaj, tečni ekstrakt i tinktura), dok je preporuka da se suvi ekstrakt koristi sat vremena pre obroka. Ovu drogu treba primenjivati najduže 14 dana, nakon čega je potrebno konsultovati lekara ili farmaceuta (39).

O medicinskom značaju lincure na našem podneblju je prof. Tucakov zabeležio da je u dinarskim krajevima naš narod posebno verovao u isceliteljsku moć lincure, što je i sam smatrao za opravdano, jer navodi da: „Lincura neće nikome naškoditi, a bezmalo svakome će pomoći“. Tradicionalno se u našim krajevima koren lincure primenjuje tako što se stavlja u rakiju ili se kuva, a koristi se za jačanje organizma, kod problema sa digestivnim traktom, kašljem ili zbog bolova u grudima, kao i kod groznice (11).

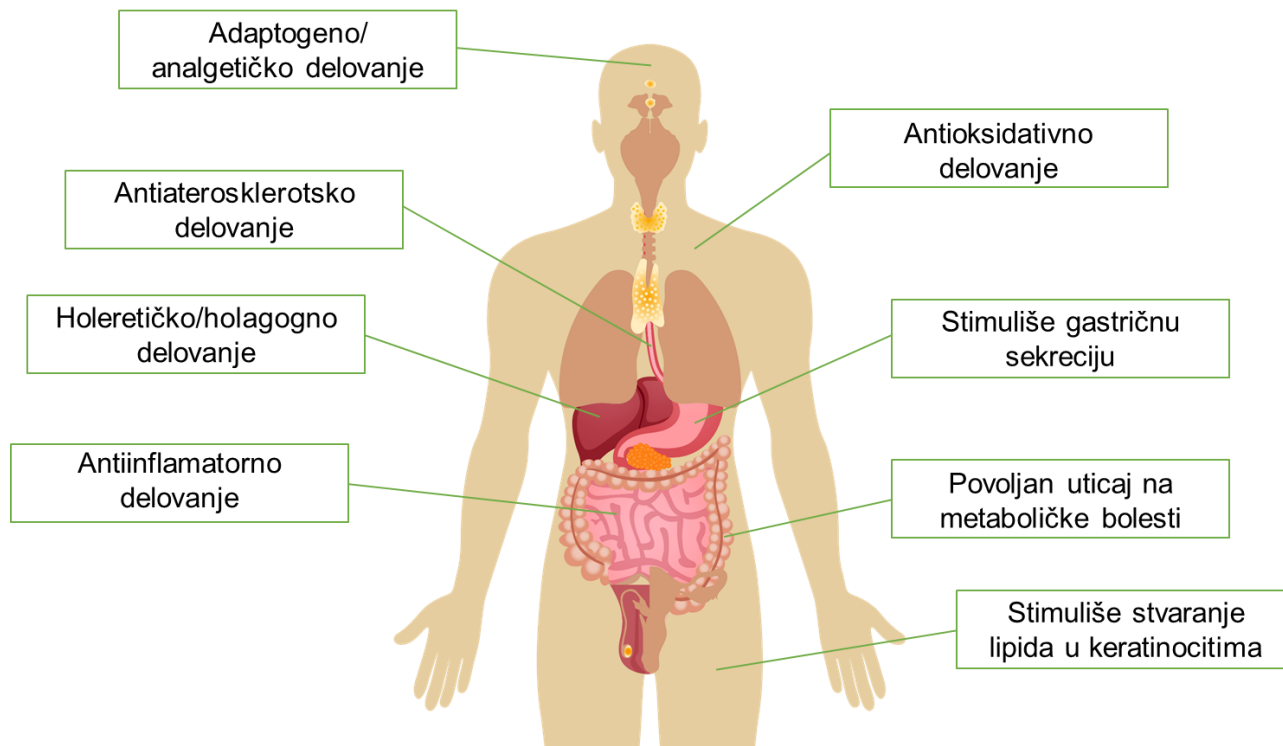
Velike količine korena lincure koriste se u industriji alkoholnih pića, za izradu rakija, likera i aperitiva (19).



Slika 7. A) Koren lincure nakon vađenja; B) Usitnjen osušen koren lincure (droga *Gentianae radix*), preuzeto iz Prakash i sar. (40).

1.1.5 Pregled bioloških aktivnosti i farmakoloških dejstava

Dosadašnja naučna istraživanja govore u prilog tome da koren lincure ostvaruje plejotropne efekte na nivou čitavog organizma (Slika 8), uključujući antioksidativnu, antiinflamatornu, antimikrobnu i antiaterosklerotsku aktivnost, kao i antihipertenzivno, hepatoprotektivno i povoljno delovanje kod metaboličkih bolesti, kao što su gojaznost i dijabetes (7).



Slika 8. Protektivna delovanja ekstrakta korena lincure.

Rezultati većeg broja *in vitro*, kao i *in vivo* istraživanja pokazuju da koren lincure poseduje **antioksidativnu aktivnost**. Tako je, metodom elektronske paramagnetne rezonantne spektroskopije utvrđeno da metanolni ekstrakt korena lincure na dozno zavisani način neutrališe superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), kao i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikale u *in vitro* uslovima (41). Antioksidativna aktivnost korena lincure potvrđena je i sposobnošću redukcije feri jona, kao i ABTS⁺ jona (jona azinobis-etilbenzotiazolin-sulfonske kiseline) (42,43). Interesantno je da na antioksidativnu aktivnost ekstrakata korena lincure utiču i uslovi ekstrakcije. Poređenjem aktivnosti ekstrakata dobijenih nakon ekstrakcije korena lincure vodom, etanolom (50 %) i metanolom (50 %) pokazano je da izbor rastvarača utiče na antioksidativnu aktivnost ekstrakta. Zaključeno je da alkoholni (etanolni ili metanolni) ekstrakti korena lincure poseduju izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na vodeni ekstrakt. Ovaj podatak se objašnjava time što su za antioksidativnu aktivnost ekstrakta korena lincure pre svega odgovorna polifenolna jedinjenja, koja hidrofobnim ili vodoničnim vezama stupaju u interakciju sa polisaharidima i proteinima prisutnim u biljnom materijalu, te su manje polarni ekstragensi bili efikasniji u odnosu na vodu. Međutim, poznajući toksične efekte metanola jasno je da etanol kao opšte priznata bezbedna (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) supstanca predstavlja rastvarač izbora u slučaju preparata koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Pored toga, u *in vivo* testu na ćelijama gljivice *Saccharomyces cerevisiae* pokazano je da je na antioksidativnu aktivnost ekstrakta korena lincure značajno uticala i pH vrednost sredine. Tačnije, utvrđeno je da kisela sredina povoljno utiče na ispoljavanje antioksidativne aktivnosti vodenog ekstrakta korena lincure, pri čemu je zabeleženo da je prooksidativni potencijal bio manji nego u baznoj sredini (42). Ovi podaci ukazuju da uslovi ekstrakcije značajno utiču na antioksidativni potencijal lincure, kao i da je etanol rastvarač izbora, a da kisela sredina povoljno utiče na ispoljavanje

antioksidativnog delovanja korena lincure, što je značajno sa aspekta izbora tipa nosača i mesta oslobađanja ekstrakta korena lincure iz farmaceutskog oblika. U *in vivo* studiji izvedenoj na pacovima primenom etanolnog ekstrakta korena lincure (1 g/kg dnevno) umanjena su oštećenja tkiva testisa izazvana oksidativnim stresom usled primene ketokonazola, a takođe smanjena je i reproduktivna toksičnost. Uočeno je smanjenje koncentracije katalaza i malondialdehida, kao i smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze (44). S obzirom da je balans između produkcije slobodnih radikala, koji nastaju kao ćelijski metaboliti i njihove eliminacije vrlo značajan za održavanje homeostaze organizma, utvrđena antioksidativna može doprineti očuvanju normalnih funkcija organizma.

Antiinflamatorno delovanje etanolnog (1000 mg/kg) i petroletarskog ekstrakta (1000 mg/kg) korena lincure na *in vivo* modelu edema šape pacova indukovane karagenanom bilo je uporedivo sa efikasnošću natrijum-diklofenaka (13,5 mg/kg), pri čemu nisu uočeni toksični efekti ekstrakta korena lincure. Pored toga, etanolni ekstrakt korena lincure (1000 mg/kg) pokazao je uporediv antiinflamatorni efekat sa indometacinom (25 mg/kg) na modelu edema uha miša (45). Na osnovu rezultata dobijenih u studiji izvedenoj na miševima sugerisano je da metanolni ekstrakt korena lincure ispoljava dozno nezavisno **adaptogeno i analgetičko delovanje**, što je takođe u skladu sa tradicionalnom upotrebom ekstrakta korena lincure, koji se koristi u cilju jačanja organizma (26). Pored toga, genciopikrozid kao dominantno bioaktivno jedinjenje u korenu lincure smanjuje oslobađanje medijatora inflamacije i algogenih supstanci, kao što su bradikin, supstanca P, faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), serotonin (7).

Antibakterijsko delovanje metanolnog ekstrakta korena lincure (minimalna inhibitorna koncentracija, MIC 100 µg/ml) utvrđeno je u okviru *in vitro* skrininga u kome je praćen uticaj ekstrakta na 15 sojeva bakterije *Helicobacter pylori*, koja se dovodi u vezu sa nastankom gastrointestinalnih oboljenja, kao što su gastritis, gastrični ulkus, karcinom želuca (46).

Ekstrakt korena lincure **povoljan deluje na metaboličke bolesti**, kao što su gojaznost i dijabetes, pokazano je u većem broju *in vitro* i *in vivo* studija. U studiji izvedenoj na 30 zdravih ispitanika, primena mikroinkapsuliranog ekstrakta korena lincure, koji je bio obložen etil-celulozom sa ciljem da se maskira gorčina ekstrakta u ustima, uticala je na smanjenje unosa hrane za 30 % (47). U *in vivo* studiji na modelu miševa (engl. *high-fat diet-induced mouse model*), ekstrakt korena lincure inhibirao je diferencijaciju adipocita, a takođe je sprečio depoziciju masti u hepatocitima, povećanje telesne mase miševa, kao i lučenje leptina i insulina, hormona čija povećana aktivnost se dovodi u vezu sa pojavom gojaznosti (48). Pored toga, nakon primene ekstrakta korena lincure na modelu miševa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, ukupni holesterol bio je smanjen, kao i taloženje lipida u zidu aorte i produkcija medijatora inflamacije, na osnovu čega je zaključeno da ekstrakt korena lincure ispoljava i **antiaterosklerotsko delovanje** (49).

Etanolni ekstrakt korena lincure unet peroralnim putem u visokoj dozi (15 g) u *ex vivo* studiji izvedenoj na zdravim ispitanicima pokazao je **citoprotektivno delovanje**, tj. smanjio citotoksični efekat rendgenskog zračenja, bez uticaja na osetljivost malignih ćelija (50).

Interesantno je da je kao aktivna komponenta krema ekstrakt korena lincure u koncentraciji od 5 % uticao na **povećanje stvaranja lipida u keratinocitima** u placebo-kontrolisanoj dvostruko-slepoj studiji u kojoj su praćeni ispitanici sa normalnom do suvom kožom. Krem je primenjivan 2 puta dnevno tokom 4 nedelje. Ovaj podatak implicira da se ekstrakt može koristiti kod inflamatornih stanja kože koje karakteriše narušena epidermalna barijera, odnosno kod vrlo suve kože ili atopijskog dermatitisa (51).

Veliki broj istraživanja i dugogodišnja tradicionalna primena ukazuju da koren lincure povoljno deluje na **funkcionisanje gastrointestinalnog trakta** u slučaju smanjenog apetita i problema kao što su nadimanje, gorušica, mučnina. Međutim, tačan mehanizam delovanja još uvek nije potpuno razjašnjen. Jedan broj literaturnih navoda govori u prilog hipotezi da koren lincure pospešuje gastričnu sekreciju direktno na nivou usne duplje i želuca, dok sa druge strane određeni podaci ukazuju da se efekti korena lincure postižu i nezavisno od delovanja na lokalnom nivou (13).

Na izolovanim parijetalnim ćelijama pacova je pokazano da osušeni ekstrakt korena lincure na dozno zavisian način utiče na povećanje lučenja želudačne kiseline. Stoga su autori sugerisali da ekstrakt korena lincure može da stimuliše lučenje želudačne kiseline direktno na nivou gastrične sluznice (52). Takođe, ekstrakt lincure unet direktno u želudac pacova izazvao je povećanje gastrične sekrecije, pri čemu je ekstrakt u najvišoj koncentraciji (4 %) uticao i na povećanje pH. Pored toga, infuz korena lincure primenjen kod ovaca oralnim putem u dozi od 5 g doveo je do povećanja lučenja intestinalnih enzima u tankom crevu (13). Na osnovu studije izvedene na različitim modelima pacova sa gastričnim ulcerom, utvrđeno je da koren lincure pokazuje antiulcerozno delovanje za koje se smatra da je zasnovano na protektivnom delovanju sekoiridoida koji podstiču lučenje prostanglandina (53).

Efekat ekstrakta korena lincure na sekretorne i motoričke funkcije organa gastrointestinalnog trakta ispitan je kod 10 zdravih osoba. Ispitanici su primenjivali ekstrakt korena lincure 5 minuta pre obroka. Rendgenski snimci pokazuju da je u toku prvih 30 minuta nakon unošenja ekstrakta korena lincure došlo do povećanja želudačne sekrecije, što je uticalo na intenzivnije varenje proteina i masti. Takođe, pokazano je da ekstrakt poseduje holeretičko i holagogeno delovanje (54). Pored toga, uticaj tinkture lincure (2 %) na lučenje pljuvačke praćen je kod 24 zdrava ispitanika tokom 120 minuta i pokazano je da je došlo do značajnog povećanja stvaranja pljuvačke nakon 30 minuta, dok u kasnijim vremenskim tačkama nije primećen uticaj ekstrakta (55). Novija istraživanja su pokazala da tečni ekstrakt korena lincure deluje na cefaličnu fazu digestije i postprandijalnu hemodinamiku. Kao što je poznato, u toku varenja dolazi do hiperemije, koja utiče na smanjenje sistolnog i dijastolnog pritiska, a posledično dolazi do povećanja frekvence rada srca. Kod zdravih ispitanika tečni ekstrakt korena lincure već nakon 5 minuta je uticao na povećanje perifernog otpora u krvnim sudovima i na smanjenje udarnog volumena, dok je frekvencija rada srca ostala nepromenjena, čime se može objasniti poboljšanje varenja i apsorpcije hranljivih materija iz digestivnog trakta (56).

U studiji izvedenoj na 19 pacijenata sa ulceroznim kolitisom, Kronovom bolešću ili drugim inflamatornim gastrointestinalnim bolestima za koje je karakteristično povećanje imunoglobulina A, ekstrakt korena lincure primenjen 3 puta dnevno po 20 kapi delovao je na smanjenje imunoglobulina A i simptoma bolesti (57). Pored toga, rezultati ispitivanja u kome je praćen uticaj različitih tretmana (primena probiotika, dijetetskih suplemenata, biljnih proizvoda, itd.) na sindrom povećane intestinalne permeabilnosti tj. propustljivosti kod pacijenata lečenih u sklopu sistema komplementarne i integrativne medicine su pokazali da se primenom korena lincure smanjuje dužina lečenja ispitivanog sindroma (58).

U studiji izvedenoj na 205 pacijenta sa dispepsijom kod kojih su bili prisutni simptomi kao što su povraćanje, bolovi u stomaku, mučnina, gubitak apetita, zatvor, nadutost i gorušica ispitan je uticaj kapsula koje su sadržale 120 mg suvog ekstrakta korena lincure. Ispitanici su ih primenjivali 2 do 3 puta dnevno, tokom 15 dana. Prosečno su unosili 4,8 kapsula (2,9 g korena lincure) dnevno. Poboljšanje je u najvećem broju slučajeva primećeno nakon 5 dana. Efikasnost preparata je procenjena kao *odlična* (simptomi eliminisani) kod 31 % pacijenata, *dobra* kod 55 % pacijenata, a *umerena* u 9 % i *neadekvatna* u 5 % slučajeva (59). Međutim, kako u studiji nije izvršeno poređenje sa grupom koja je dobijala placebo ili drugi tretman/lek, koji se koristi u lečenju navedenih stanja, na osnovu navedenih rezultata nije bilo moguće doneti konkretne zaključke. Stoga je upotreba korena lincure kod blagih do umerenih gastrointestinalnih simptoma i dalje zasnovana na tradicionalnoj primeni.

1.2 Primena koncepta dizajna kvaliteta u fazi razvoja farmaceutskog proizvoda sa ekstraktom korena lincure

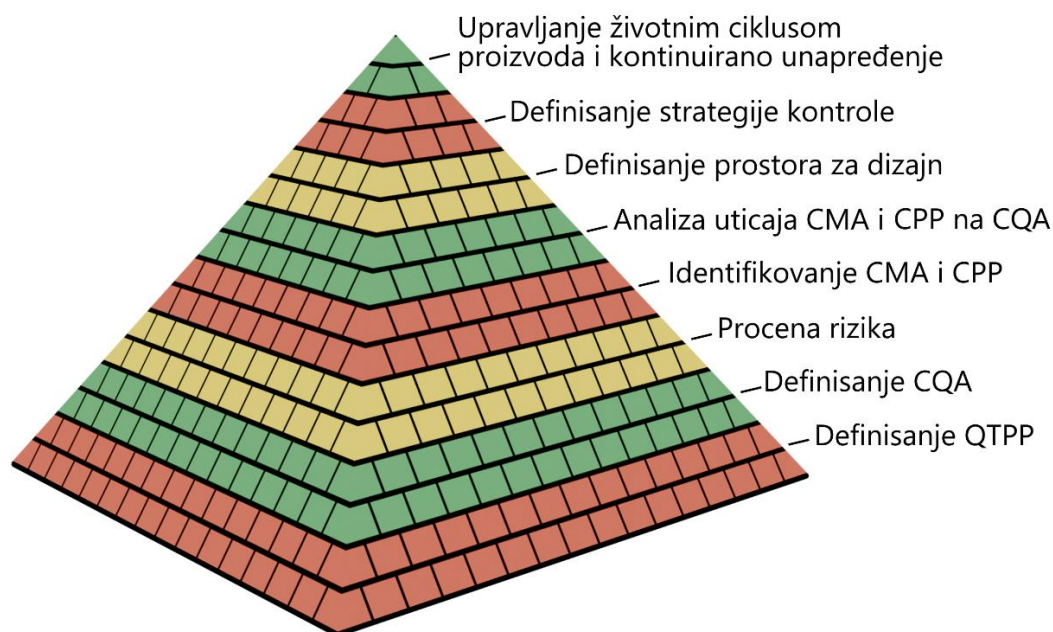
Prema preporukama Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) i Američke administracije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) razvoj farmaceutskih proizvoda treba da bude usklađen sa konceptom dizajniranja kvaliteta. Preporuke koje se tiču ovog pristupa dala je Međunarodna konferencija za harmonizaciju (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH) smernicama u okviru kojih su razmatrani razvoj proizvoda (ICH Q8), upravljanje rizikom kvaliteta (ICH Q9) i farmaceutski sistema kvaliteta (ICH Q10) (60–62). Koncept dizajna kvaliteta (engl. *Quality by Design*, QbD) podrazumeva naučno zasnovan i sistematičan pristup razvoju farmaceutskih proizvoda, koji počinje sa ranom fazom razvoja proizvoda i traje tokom celog životnog ciklusa (engl. *product life cycle*) proizvoda. Ovaj pristup se koristi sa ciljem razumevanja uticaja formulacionih i procesnih parametara na karakteristike, tj. kvalitet, bezbednost i efikasnost gotovog farmaceutskog proizvoda, pri čemu se akcenat stavlja na to da se kvalitet ne samo može kontrolisati, nego se mora „ugraditi” u proizvod.

U cilju razvoja efikasnog, bezbednog i kvalitetnog preparata sa ekstraktom korena lincure važno je razmotriti hemijski sastav, fizičko-hemijske, biofarmaceutske i farmaceutsko-tehnološke osobine, kao i dostupne podatke o farmakodinamskom delovanju i farmakokinetici. Prvi korak podrazumeva ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, te je potrebno optimizovati uslove ekstrakcije kako bi prinosa bioaktivnih jedinjenja od značaja bio što veći. Imajući u vidu da u ekstraktu korena lincure dominiraju bioaktivna jedinjenja iz grupe sekoiridoida, pri čemu literaturni podaci ukazuju da su jedinjenja iz ove grupe nestabilna i da im je biološka raspoloživost niska, važno je inkapsulirati ekstrakt korena lincure kako bi se njegova aktivnost sačuvala. Pored toga, postoji potreba za formulisanjem proizvoda sa produženim oslobađanjem, s obzirom da genciopikrozid, dominantno bioaktivno jedinjenje u ekstraktu korena lincure, ima kratko poluvreme eliminacije, kao i nisku biološku raspoloživost. Kako je u pitanju jedinjenje klase 3 BSK, inkorporiranjem ekstrakta u lipidne čestice može se uticati na poboljšanje permeabilnosti. Dalje, imajući u vidu da ekstrakt korena lincure deluje i lokalno u želucu i na taj način pospešuje varenje i olakšava digestivne tegobe pristupne kod funkcionalne dispepsije i gubitka apetita, inkorporiranjem u gastroretentivne nosače može se unaprediti efikasnost ekstrakta lincure i smanjiti potreba za čestim doziranjem. Ovaj pristup je poželjan i zbog toga što je genciopikrozid nestabilan pri višim pH vrednostima karakterističnim za donje delove gastrointestinalnog trakta, degradira se pod uticajem intestinalnih bakterija i supstrat je za P-glikoprotein, te se produženim zadržavanjem u želucu može uticati na povećanje njegove biološke raspoloživosti (detaljno opisano na str. 76). Pored toga, inkapsulacijom ekstrakta korena lincure i prevođenjem tečnih ekstrakata u praškove adekvatnih karakteristika može se uticati na unapređenje farmaceutsko-tehnoloških svojstava, jer generalno suvi biljni ekstrakti imaju lošu protočnost i vrlo su higroskopni, što se odražava na njihovu procesabilnost, kao i mehaničke i tabletabilne osobine (63).

Glavni elementi QbD predstavljeni su na Slici 9. U skladu sa smernicama QbD pristupa ključno je definisati **ciljani profil kvaliteta proizvoda** (engl. *Quality Target Product Profile*, QTTP), kojim se opisuje namena, put primene, farmaceutski oblik, tip sistema za isporuku, doza, pakovanje, karakteristike formulacije koje imaju uticaj na farmakokinetiku aktivne supstance, karakteristike kvaliteta finalnog proizvoda, kao što su stabilnost, stepen čistoće, brzina oslobađanja aktivne supstance. Na osnovu QTTP-a i postojećeg znanja se identifikuju potencijalne kritične karakteristike kvaliteta proizvoda (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA). Potom se **definišu CQA**, koje uključuju fizičke, hemijske, biološke ili mikrobiološke osobine aktivnih supstanci, pomoćnih supstanci, poluproizvoda, međuproizvoda i gotovog proizvoda, sa naznačenim granicama, koje je potrebno zadovoljiti da bi se obezbedio željeni kvalitet proizvoda. Kao opšte CQA kod čvrstih farmaceutskih oblika se navode prisustvo nečistoća, sadržaj aktivne supstance, ujednačenost sadržaja, brzina oslobađanja aktivne supstance i stabilnost, pri čemu se pored njih navode i druge CQA od značaja za dati proizvod. Nakon toga se na osnovu **procena rizika** (engl. *Risk Assessment*) identifikuju i

analiziraju **kritični atributi materijala** (engl. *Critical Material Attributes*, CMA) i **kritični parametri procesa** (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) za koje se procenjuje da li utiču na CQA. Procena rizika predstavlja naučno zasnovan metod, koji je sastavni deo sistema upravljanja rizikom kvaliteta (engl. *Quality Risk Management*). Kada je reč o farmaceutskim proizvodima koji kao aktivnu supstancu sadrže biljni ekstrakt, veliki broj faktora može uticati na CQA uzimajući u obzir karakteristike polaznog materijala, proces ekstrakcije, formulaciju međuproizvoda, kao i proizvodnju finalnog proizvoda. U skladu sa postojećim literaturnim i eksperimentalnim podacima, koristeći alate za procenu rizika kao što su *Ishikawa* dijagram, analiza efekata u slučaju neizvršenja (engl. *Failure Mode Effects Analysis*, FMEA), analiza stabla nedostataka (engl. *Fault Tree Analysis*, FTA), matrica procene rizika (engl. *Risk Estimation Matrix*, REM) moguće je od inicijalno velikog broja faktora odabrati CMA i CPP od kojih se očekuje da će imati značajan uticaj na kvalitet finalnog proizvoda. Dalje se pomoću dizajna eksperimenata ili različitih vrsta modelovanja (npr. neuronske mreža) može analizirati uticaj CMA i CPP na CQA sa ciljem postizanje višeg nivoa razumevanja (64). Podaci dobijeni u okviru procene rizika mogu biti vrlo značajni sa aspekta razumevanja uticaja CMA i CPP na CQA, kao i određivanja opsega kritičnih parametara koje je potrebno zadovoljiti kako bi se dobili proizvodi željenog kvaliteta. Na osnovu znanja o uticajima koji postoje između ulaznih parametara (atributa materijala i parametara procesa) i kvaliteta proizvoda, moguće je formirati **prostor za dizajn** (engl. *design space*). On se definiše opsezima CMM i CPP ili se opisuje kompleksnim matematičkim jednačinama. Variranje CMA i CPP može uticati na CQA i iz tog razloga utvrđeni kritični parametri moraju biti kontrolisani kako bi se obezbedilo dobijanje proizvoda odgovarajućeg kvaliteta. Definisanje prostora za dizajn predstavlja važan aspekt sa regulatornog stanovišta, jer se smatra da će proizvod koji je dobijen unutar granica prostora za dizajn imati željeni kvalitet, te se rad unutar prostora za dizajn ne smatra promenom, dok rad izvan prostora za dizajn zahteva pokretanje postregistracionih promena. Pored toga, moguće je unapređivati proces proizvodnje u okviru prostora za dizajn. Nakon toga, definiše se strategija kontrole (engl. *control strategy*) na osnovu postojećeg poznavanja proizvoda i procesa, koja treba da obezbedi kontinuirano dobijanje kvalitetnog proizvoda. U skladu sa QbD strategijom, u toku celog životnog ciklusa proizvoda teži se prikupljanju novih znanja sa ciljem unapređenja procesa, te se u skladu sa tim mogu menjati i prostor za dizajn i kontrolna strategija.

Dakle, pri razvoju biljnih lekova važno je inkorporirati koncept dizajna kvaliteta od prvih koraka koji podrazumevaju izbor adekvatne biljne sirovine i ekstrakciju biljne droge, pa do formulisanja bezbednog, efikasnog i kvalitetnog biljnog proizvoda, jer se kvalitet ne može samo kontrolisati nego se mora konstantno ugrađivati u proizvode.



Slika 9. Koraci koje uključuje koncept dizajna kvaliteta (QbD).

1.3 Ekstrakcija biljnog materijala

Prema izveštajima Svetske zdravstvene organizacije skoro 80 % svetske populacije koristi biljne proizvode u terapiji velikog broja akutnih i hroničnih stanja i bolesti (65). Ekstrakcija predstavlja prvi i izuzetno važan korak koji je potrebno preduzeti u cilju izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Dostupni podaci pokazuju da su se još drevne civilizacije pre 5000 godina susretale sa postupkom ekstrakcije, dok su početkom 19. veka počela naučna istraživanja u ovoj oblasti. Danas, biljni ekstrakti nalaze svoju primenu u različitim sferama farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i hemijske industrije (66).

Imajući u vidu visoke zahteve u pogledu razvoja biljnih lekova i tradicionalnih biljnih lekova, od kojih se očekuje da budu bezbedni, efikasni i kvalitetni, važno je odabrati odgovarajući metod ekstrakcije, rastvarače (ekstragense) i uslove ekstrakcije koji će omogućiti izolovanje bioaktivnih jedinjenja od značaja. Pre izvođenja ekstrakcije biljni materijal se prečišćava, a potom se najčešće podvrgava sušenju kako bi se smanjio sadržaj vlage i dobio materijal adekvatne mikrobiološke stabilnosti koji se može skladištiti i koristiti tokom dužeg vremena. Nakon toga se biljna sirovina usitnjava ili sprasi, jer se na taj način dodatno povećava dodirna površina između rastvarača i biljnog materijala, čime se omogućava brže odvijanje procesa ekstrakcije. Međutim, s obzirom da odgovarajući stepen usitnjenosti zavisi od vrste biljnog materijala i metode ekstrakcije, važno je optimizovati ovaj parametar, jer u nekim slučajevima prilikom usitnjavanja može doći i do smanjenja sadržaja bioaktivnih jedinjenja (npr. etarskih ulja) (67). Pored toga, u cilju povećanja prinosa bioaktivnih jedinjenja biljni materijal se može podvrgnuti različitim predtretmanima, npr. uticajem enzima ili mikrotalasa, kako bi se povećao prinos bioaktivnih jedinjenja (68,69).

Odabir rastvarača se vrši na osnovu hemijskih karakteristika jedinjenja koja se ekstrahuju, pri čemu se mogu koristiti rastvarači različitog stepena polarnosti, kao što su voda, metanol, etanol, propilen-glikol, aceton, hloroform, etil-acetat, heksan i dr. (70). Idealni rastvarač treba da bude selektivan, fiziološki indiferentan, hemijski inertan, netoksičan, nezapaljiv, pogodnog viskoziteta i površinskog napona, sa niskom tačkom ključanja i ekonomski prihvatljiv (71). Primenom savremenih „zelenih“ pristupa teži se povećanju efikasnosti ekstrakcije (prinos i selektivnost prema željenim bioaktivnim jedinjenjima), redukciji upotrebe i/ili eliminaciji toksičnih rastvarača i smanjenju utroška energije, novca i vremena. Najčešće se za pripremu biljnih ekstrakata i tinktura koriste smeše vode i etanola (19). Voda predstavlja rastvarač izbora jer je nezapaljiva, bezbedna, jeftina i široko pristupačna (72). Glavni nedostaci vode kao rastvarača se ogledaju u niskoj selektivnosti, nemogućnosti rastvaranja manje polarnih jedinjenja i značajnoj energiji koju je potrebno uložiti u cilju njenog uklanjanja. Etanol je nešto selektivniji rastvarač, niske tačke ključanja, koji može dovesti do taloženja proteina i posledično inhibicije enzimskih reakcija razgradnje bioaktivnih sastojaka. Niske je toksičnosti, te ima status bezbednog rastvarača i karakteriše ga niska latentna toplota isparavanja. Nedostaci etanola su laka zapaljivost, visoka cena i moguće prisustvo metanola kao nečistoće (71). Bitno je naglasiti, da je mešanjem vode i etanola moguće dobiti rastvarače različitih polarnosti, što je važno sa aspekta selektivnosti rastvarača i optimizacije procesa ekstrakcije (67).

Priprema ekstrakata se može odvijati različitim tehnikama kao što su maceracija, digestija, perkolacija, Soxhlet ekstrakcija, ali i novijim „zelenim“ tehnikama, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom i dr. (73,74). Odabir metode ekstrakcije se vrši u zavisnosti od karakteristika polazne sirovine, prisutnih bioaktivnih jedinjenja, ali i razmatranjem prednosti i nedostataka određene tehnike ekstrakcije. Tako, maceracija, digestija i perkolacija predstavljaju konvencionalne metode koje su široko korišćene zbog svoje jednostavnosti i niskih početnih troškova, te se i najčešće sreću, posebno u malim i srednjim preduzećima. Glavni nedostatak ovih metoda ogleda se u značajnom utrošku vremena i rastvarača. Prilikom ekstrakcije u uređaju po Soxhlet-u koriste se manje količine organskih rastvarača, ali zbog njihove toksičnosti ovaj postupak se izbegava (75). Ultrazvučna i ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima su vrlo atraktivne metode sa aspekta izolovanja polarnih bioaktivnih jedinjenja, jer zahtevaju manji utrošak energije i vremena u odnosu na konvencionalne metode. Glavni nedostatak ovih metoda je to što prilikom

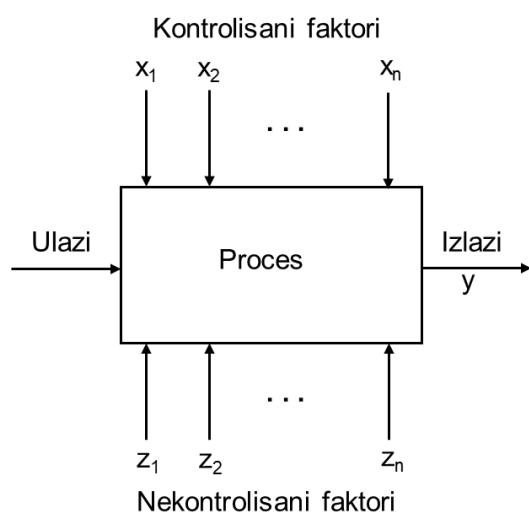
procesa ekstrakcije može doći do degradacije osetljivih bioaktivnih jedinjenja. Generalno, ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom omogućava izolovanje nepolarnih jedinjenja, ali se podešavanjem parametara procesa i dodatkom korastvarača može uticati na selektivnost procesa. Ova metoda je ekološki prihvatljiva i pogodna u slučaju ekstrakcije termolabilnih jedinjenja, međutim usled složenosti procesa i visokih investicionih troškova još uvek nije našla široku primenu u industrijskim postrojenjima (76).

Kao što je prethodno pomenuto na proces ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja utiče veliki broj parametara, kao što su temperatura, trajanje ekstrakcije, mešanje, odnos droge i rastvarača, stepen usitnjenosti droge (75,77). Klasični univarijantni pristup (engl. *One Factor at Time, OFAT*) podrazumeva pojedinačno ispitivanje uticaja svakog faktora zasebno na odgovore od značaja, te je potrebno izvesti veliki broj eksperimenata, što zahteva značajan utrošak vremena i resursa. Pored toga, na taj način se ne mogu predvideti mogući međusobni uticaji (interakcije) parametara na proces ekstrakcije. Kako bi se navedeni problemi prevazišli, teži se istovremenom testiranju više faktora, tzv. multifaktorskim pristupom (engl. *multifactorial approach*), primenom eksperimentalnog dizajna koji obezbeđuje postizanje definisanih ciljeva na efikasniji i pouzdaniji način uz smanjenje utroška vremena i resursa. Pored toga, tehnike koje podrazumevaju korišćenje veštačke inteligencije kao što su veštačke neuronske mreže (engl. *Artificial neural network, ANN*) mogu dodatno unaprediti razumevanje složenih procesa kao što je ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja (78).

1.3.1 Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments, DoE*) predstavlja sistematičan pristup planiranju i izvođenju eksperimenata, čime se omogućava uspostavljanje matematičkih zavisnosti između faktora (nezavisno promenljivih) i ispitivanih odgovora (zavisno promenljivih) u okviru eksperimentalnog domena, korišćenjem relativno malog broja eksperimenata.

Različiti procesi, među kojima i proces ekstrakcije se mogu vizualizovati na način prikazan na Slici 10, jer se ulazi, usled delovanja kombinacije različitih faktora, transformišu u izlaze, kod kojih možemo pratiti jedan ili više odgovora. Faktori koji utiču na proces mogu biti kontrolisani i nekontrolisani, pri čemu proces treba da bude razvijen tako da nekontrolisani faktori koji se javljaju nasumično i izražavaju se eksperimentalnom greškom imaju značajno manji uticaj u poređenju sa kontrolisanim faktorima. Uticaj kontrolisanih faktora na izlazne promenljive varira u skladu sa Pareto principom, poznatim i kao 20:80, što znači da 20 % faktora utiče na 80 % rezultata. Matematička funkcija kojom se opisuje ponašanje sistema i objašnjava se zavisnost između faktora i odgovora sistema naziva se funkcija odgovora ili matematički model, a eksperimentalni domen predstavlja prostor definisan opsezima ispitivanih faktora (79,80).



Slika 10. Šematski prikaz procesa.

Prednosti eksperimentalnog dizajna u odnosu na univarijantni pristup su:

- značajno proširivanje znanja o procesu, uz minimalno korišćenje resursa;
- obezbeđivanje validnih informacija na efikasan način;
- definisanje uticaja svakog pojedinačnog faktora;
- utvrđivanje interakcija među faktorima;
- predviđanje ponašanja procesa unutar prostora za dizajn;
- uspostavljanje matematičkih veza između zavisnih i nezavisnih promenljivih;
- optimizacija procesa, koji može uključivati i praćenje više odgovora;
- uticaj na povećanje robusnosti procesa.

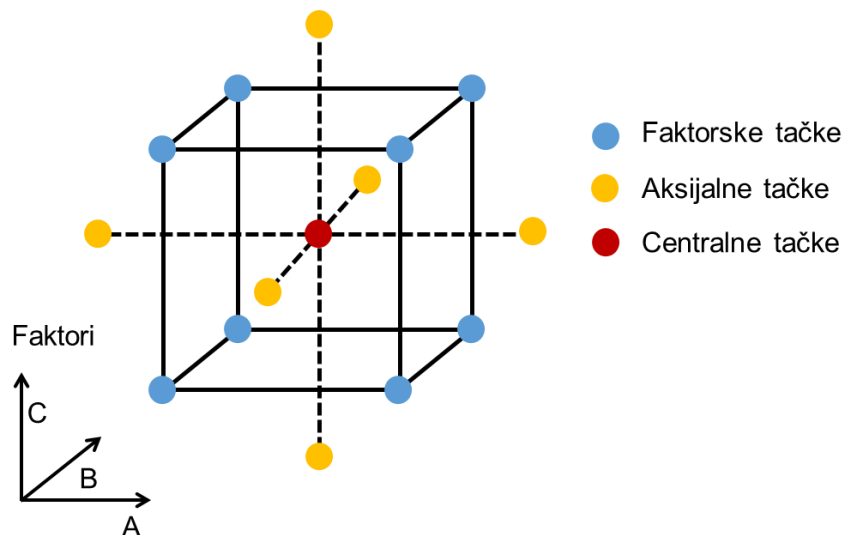
Dizajn eksperimenata se odvija kroz osam koraka: 1) postavljanje ciljeva 2) izbor faktora, kao i opsega u okviru kojih će biti varirani 3) definisanje odgovora 4) odabir eksperimentalnog dizajna 5) izvođenje eksperimenata 6) provera da li su podaci u skladu sa eksperimentalnim pretpostavkama 7) analiza rezultata 8) interpretacija i korišćenje rezultata (80).

Imajući u vidu da je osnovni cilj dizajna eksperimenata karakterizacija i optimizacija određenog sistema, ovi zadaci se postižu kroz fazu skrininga i optimizacije. Kada na ispitivanje odgovore utiče veliki broj faktora, a na osnovu literaturnih podataka nije moguće ustanoviti koji faktori su značajni, prvo se vrši selekcija faktora tj. skrining. U tu svrhu najčešće se koriste frakcioni faktorski i *Plackett-Burman* dizajn, a ukoliko je potrebno ispratiti uticaje manjeg broja faktora može se koristiti pun faktorski dizajn (81,82). U toku faze skrininga faktori se variraju na dva nivoa, na nižem (-1) i višem (+1). Na ovaj način mogu se ispitati uticaji kvantitativnih i kvalitativnih faktora. Primenom skrining dizajna mogu se uočiti linearni uticaji, a u slučaju punog faktorskog dizajna pored linearnih uticaja mogu se prepoznati i interakcije.

Plackett-Burman dizajnom je moguće ispitati uticaj $N - 1$ faktora izvođenjem N eksperimenata, gde je N broj koji je deljiv sa četiri. Primenom ovog dizajna mogu se proceniti isključivo uticaji glavnih faktora na odgovore sistema. U slučaju kada je broj ispitivanih faktora manji od $N - 1$, preostale kolone dizajna predstavljaju imaginarne (engl. *dummy*) faktore, čije prisustvo omogućava procenu prisustva nekontrolisanih faktora (82).

Nakon izbora faktora i njihovih opsega vrši se optimizacija primenom dizajna koji imaju najmanje tri nivoa. Kada je reč o optimizaciji ekstrakcije centralni kompozitni dizajn (engl. *Central Composite Design*, CCD) je jedan od najčešće korišćenih eksperimentalnih dizajna, jer omogućava dobijanje validnih podataka o procesu izvođenjem značajno manjeg broja eksperimenata u odnosu na pun faktorski dizajn na tri nivoa. Na slici 11 šematski je predstavljena struktura CCD. Ovaj dizajn se sastoji od punog faktorskog dizajna na dva nivoa (2^n), centralnih tačaka (cp) i aksijalnih tačaka ($2n$), tako da je ukupan broj eksperimenata za n faktora $2^n + 2n + cp$. Eksperimenti u okviru faktorskog dizajna se izvedu na nivoima -1 i +1. U centralnoj tački svi faktori su na 0 nivou i eksperimenti se ponavljaju 3–5 puta. Aksijalne tačke su na nivoima 0, $-\alpha$ i $+\alpha$, pri čemu u zavisnosti od vrednosti parametra α razlikujemo:

- CCD orijentisan ka centru (engl. *Face Centred CCD*, FCCD), gde je $|\alpha| = 1$ i kod koga se faktori ispituju na tri nivoa (-1, 0, +1);
- sferni CCD (engl. *Circumscribed CCD*, CCCD) gde je $|\alpha| > 1$ i kod koga se faktori ispituju na pet nivoa ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$), pri čemu u slučaju kada je $|\alpha| = \sqrt{n}$ govorimo o rotirajućem CCCD (82).



Slika 11. Šematski prikaz centralnog kompozitnog dizajna.

1.3.2 Statistička procena modela

Rezultati dobijeni korišćenjem dizajna eksperimenata najčešće se procenjuju primenom metodologija površine odgovora (engl. *Response Surface Methodology*, RSM). Ova metodologija se sastoji iz grupe matematičkih i statističkih tehnika koje se koriste u razvoju modela kojim se opisuje zavisnost između odgovora i faktora, a koji se mogu opisati sledećom polinomskom jednačinom (1):

$$y = f(x_{1,2,3...n}) + \varepsilon \quad (1)$$

gde je y odgovor (zavisno promenljiva), x je faktor (nezavisno promenljiva), n je broj nezavisno promenljivih, f je funkcija, a ε je statistička greška (83,84). S obzirom da faktori koji se ispituju imaju različite jedinice, kao i opsege u okviru kojih se procenjuju njihovi efekti, vrednosti faktora se kodiraju prema sledećoj jednačini (2), a na taj način se različite promenljive mogu direktno porediti bez obzira na njihovu veličinu.

$$X = \frac{X_i - X_0}{\Delta x} \quad (2)$$

Gde je X kodirana vrednost promenljive, X_i je stvarna vrednost promenljive, X_0 je vrednost promenljive na srednjem nivou (0), Δx je razlika vrednosti promenljive na dva susedna nivoa.

Modeli koji se koriste za opisivanje odgovora su najčešće polinomi prvog i drugog reda, dok se kubni i modeli većeg stepena u praksi retko sreću (82).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j} b_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

U prikazanoj kvadratnoj jednačini (3) Y predstavlja predviđeni odgovor, b_0 je odsečak, b_i je linearni koeficijent, b_{ii} je kvadratni koeficijent, b_{ij} je koeficijent interakcije, X_i i X_j su kodirane vrednosti nezavisno promenljivih. Navedeni koeficijenti se izračunavaju korišćenjem višestruke linearne regresije zasnovane na metodi najmanjih kvadrata, a njihova statistička značajnost se procenjuje primenom Studentovog t-testa ili F-testa (83). Apsolutna vrednost koeficijenta određenog faktora pokazuje u kojoj meri određeni faktor utiče na odgovor sistema. Koeficijenti u navedenoj jednačini mogu imati pozitivan ili negativan predznak, što pokazuje da li su faktor i odgovor u direktnoj ili obrnutoj srazmeri. Ukoliko je koeficijent linearnog člana pozitivan sa povećanjem vrednosti ispitivanog faktora povećava se i vrednost odgovora, a u slučaju negativne vrednosti koeficijenta sa porastom vrednosti faktora vrednost odgovora se smanjuje. Koeficijenti kvadratnih

članova ukazuju na zakrivljenost površine odgovora, dok koeficijenti interakcija pokazuju u kojoj meri i na koji način faktori međusobno interaguju.

Pored procene značajnosti faktora, važno je proceniti i statističku značajnost modela. Koeficijent determinacije (R^2) ukazuje na to koliko dobro matematički model opisuje ponašanje sistema. Vrednost ovog parametra može biti između 0 i 1, pri čemu vrednost 1 označava idealno uklapanje eksperimentalnih rezultata sa dobijenim modelom. *Lack of fit* vrednost (mera neusklađenosti modela) pokazuje da li se neusklađenost eksperimentalno dobijenih rezultata i onih predviđenih modelom može objasniti eksperimentalnom greškom. Tačnije, na osnovu ponavljanja u centralnoj tački procenjuje se da li su odstupanja eksperimentalnih rezultata od onih predviđenih modelom posledica neadekvatnosti modela ili eksperimentalne greške, a to se vrši primenom analize varijanse (engl. *analysis of variance*, ANOVA). Kako bi model smatrao adekvatnim, potrebno je da bude statistički značajan, a da pritom *lack of fit* ne bude statistički značajan (80,83).

S obzirom da je prilikom ekstrakcije korena lincure potrebno ekstrahovati što veću količinu različitih bioaktivnih jedinjenja, pri čemu se ona međusobno značajno razlikuju po polarnosti, rastvorljivosti, stabilnosti i drugim fizičko-hemijskim karakteristikama, potrebno je naći optimalne uslove tj. kompromisno rešenje, koje će omogućiti ekstrakciju svih grupa bioaktivnih jedinjenja. U takvim slučajevima, zbog jednostavnosti najčešće se primenjuje funkcija poželjnih odgovora koju su uveli Derringer i Suich. Ovaj pristup podrazumeva postavljanje granica i ciljeva optimizacije za svaki odgovor. Potom se odgovori transformišu u individualne funkcije poželjnosti, čiji je raspon od 0 do 1. Zajednički odgovor (D) se izračunava kao težinska geometrijska sredina pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora (d). Cilj je da vrednost D bude što bliža 1, jer 0 znači da je bar jedan posmatrani odgovor potpuno neprihvatljiv, dok 1 znači da je za sve odgovore postignuta maksimalna vrednost (80,81).

1.3.3 Veštačke neuronske mreže

S obzirom da na proces ekstrakcije utiču brojni faktori, čiji efekti se u nekim slučajevima ne mogu u potpunosti opisati linearnim i kvadratnim polinomskim modelima, sve više se koriste tehnike čije se funkcionisanje zasniva na metodama mašinskog učenja, kao što su veštačke neuronske mreže (engl. *Artificial neural networks*, ANN). Prednost veštačkih neuronskih mreža u odnosu na metodologiju površine odgovora ogleda se i u mogućnosti korišćenja podataka dobijenih na osnovu eksperimenata koji nisu izvedeni u skladu sa eksperimentalnim dizajnom. U biljnim ekstraktima, pa tako i u slučaju ekstrakta korena lincure, vrši se ekstrakcija većeg broja različitih bioaktivnih jedinjenja, te se iz tog razloga prati veći broj odgovora. U takvim slučajevima je potrebno za svaki pojedinačni odgovor razviti adekvatan matematički model korišćenjem metodologije površine odgovora. Sa druge strane, veštačke neuronske mreže omogućavaju formiranje modela, koji istovremeno mogu predviđati više odgovora.

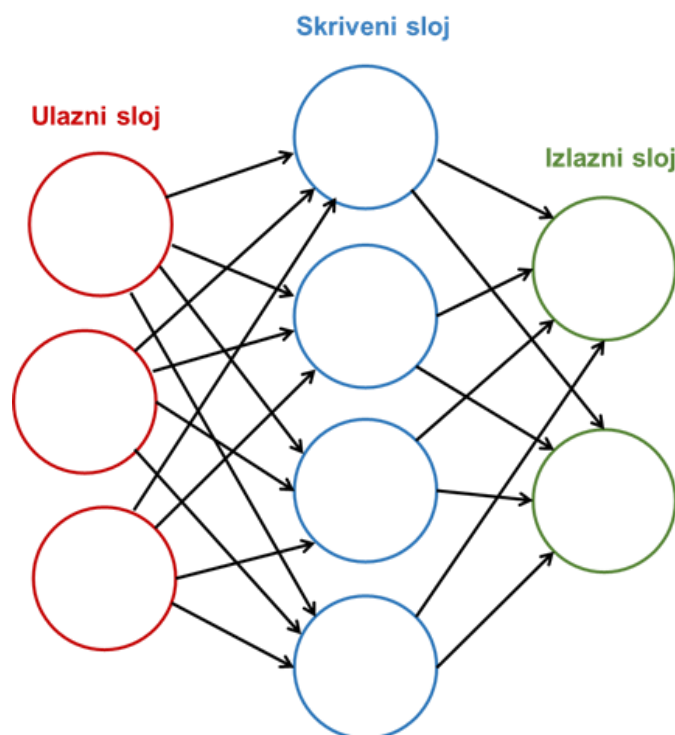
Veštačke neuronske mreže su biološki inspirisani sistemi koji oponašaju funkcionisanje ljudskog mozga, tj. njegovu sposobnost učenja, generalizacije i donošenja odluka. Strukturu veštačkih neuronskih mreža čine neuroni, organizovani u više slojeva, koji su međusobno povezani vezama (sinapsama) koje sadrže težinske koeficijente (Slika 12). Broj neurona u prvom (ulaznom) sloju zavisi od broja faktora čiji uticaj se ispituje, dok broj neurona u izlaznom sloju zavisi od broja odgovora. Skriveni sloj vrši obradu podataka, a od složenosti problema, broja podataka, vrste aktivacione funkcije i zahteva u pogledu preciznosti zavisi koliko slojeva i neurona će biti u okviru skrivenog sloja. Iako postoji više predloženih metoda na osnovu kojih se može vršiti određivanje broja neurona u skrivenom sloju, najčešće se broj neurona u ovom sloju određuje empirijski, metodom pokušaja i greške. Aktivaciona funkcija ulaznog sloja je najčešće linearna, dok se u skrivenom sloju najčešće primenjuju nelinearne aktivacione funkcije, kao što su sigmoidalna, eksponencijalna, hiperbolička i dr. (85).

U cilju formiranja mreže, koja na odgovarajući način može da predviđa odgovore u okviru definisane eksperimentalne oblasti najčešće se podaci dele u dve grupe tj. na trening i test podskup. U okviru faze podučavanja, koja se obavlja kroz određeni broj ciklusa (iteracija, epoha), mreži se predstavlja trening podset podataka, a na osnovu poređenja predviđenih izlaznih vrednosti sa eksperimentalno utvrđenim, vrši se izračunavanje greške. Potom se vrši podešavanje težine veza kako bi se smanjila razlika između trenutno predviđenog i eksperimentalno utvrđenog izlaza. U toku procesa učenja vrednosti sinaptičkih težina se koriguju sve dok se ne minimizira vrednost kvadrata greške između stvarnih i predviđenih vrednosti izlaznih podataka (SSE), koja se izračunava prema sledećoj jednačini (4):

$$SSE = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N \sum_{i=1}^M (t_{pi} - o_{pi})^2 \quad (4)$$

gde je o_{pi} predviđena vrednost izlazne promenljive, a t_{pi} je stvarna vrednost izlazne promenljive, pri čemu je N broj trening podataka i M broj izlaznih neurona (85).

Nakon toga se mreži predstavlja test podset i proverava se njena sposobnost predviđanja za podatke, koji ranije nisu prikazivani u okviru istih eksperimentalnih granica. Primećeno je da sa povećanjem broja iteracija u toku učenja dolazi do smanjenja greške, ali da se može desiti da ukoliko je broj iteracija suviše veliki mreža bude preučena, tj. da za podatke iz trening seta daje tačne podatke, dok je greška u test setu isuviše velika. Takođe, kada mreže imaju isuviše veliki broj neurona u skrivenom sloju može doći do istog problema (85–87).



Slika 12. Struktura veštačkih neuronskih mreža.

1.4 Gastoretentivni terapijski sistemi

Peroralni put primene lekova predstavlja najzastupljniji i najpoželjniji put isporuke aktivnih supstanci zbog jednostavnosti, fleksibilnosti doziranja i dobre kompliance pacijenata (88). Međutim, efikasnost aktivnih supstanci primenjenih peroralnim putem može biti ograničena niskom biološkom raspoloživošću, usled uticaja pH gastrointestinalnog trakta, mikrobiote, gastrointestinalnih enzima i barijera prisutnih u gastrointestinalnom traktu, što za posledicu može da ima neadekvatan terapijski odgovor i potrebu za čestom primenom leka (89). Savremeni farmaceutsko-tehnološki pristup formulaciji podrazumeva razvoj farmaceutskih oblika kod kojih će se postupkom izrade i/ili odgovarajućim sastavom, regulisati vreme i/ili mesto oslobađanja aktivne supstance i na taj način obezbediti odgovarajući terapijski odgovor, adekvatan bezbednosni profil i compliance pacijenata. Jedan od pristupa koji se koristi u tu svrhu podrazumeva formulisanje preparata sa produženim zadržavanjem u želucu kod kojih se aktivna supstanca oslobađa na kontrolisan način, tzv. gastoretentivnih terapijskih sistema (90), koji mogu biti od značaja u slučaju aktivnih supstanci sa:

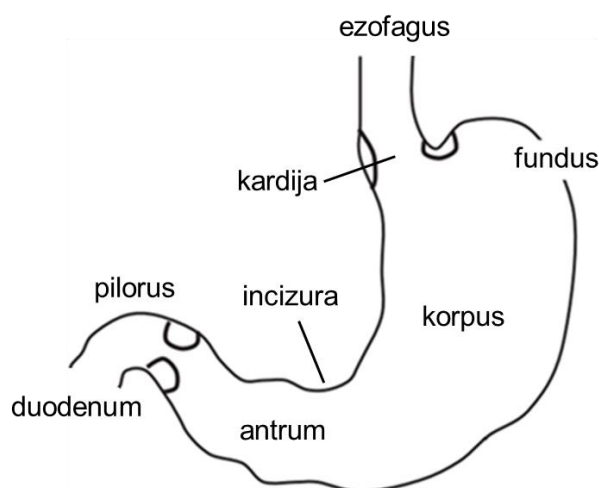
- lokalnim efektom u želucu i/ili tankom crevu (misoprostol, antacidi, antibiotici koji se koriste u terapiji *H.pylori*), jer se na ovaj način koncentracija leka lokalno održava na odgovarajućem nivou, dok su sistemske koncentracije minimalne;
- apsorpcionim prozorom u želucu ili gornjim delovima tankog creva, tj. u duodenumu i jejunumu (npr. L-DOPA, furosemid, riboflavin i p-aminobenzojeva kiselina, suplementi kalcijuma);
- slabom rastvorljivošću pri višim pH vrednostima (npr. diazepam, hlordiazepoksid, verapamil-hidrohlorid);
- neadekvatnom stabilnošću u tankom ili deblom crevu (npr. kaptopril, metronidazol, genciopikrozid);
- neželjenim dejstvima koja se ispoljavaju u debelom crevu (antibiotici);
- sposobnošću vezivanja za efluksni transporter P-glikoprotein (digoksin, genciopikrozid), jer se zastupljenost ovih proteina povećava u smeru od želuca ka kolonu, te se oslobađanjem u proksimalnim delovima gastrointestinalnog trakta može uticati na smanjenje eliminacije aktivne supstance;
- kratkim poluvremenom eliminacije, jer se produženim zadržavanjem u želucu može uticati na smanjenje učestalosti doziranja;
- uskom terapijskom širinom, jer se smanjuju fluktuacije u koncentraciji i na taj način se umanjuju neželjena dejstva koja nastaju kao posledica visokih koncentracija leka (90–92).

Sa druge strane, produženo vreme zadržavanja u želucu je nepoželjno ukoliko aktivna supstanca izaziva lezije u želucu (npr. nesteroidni antiinflamatorni lekovi) i/ili ukoliko je nestabilna pri niskim pH vrednostima i/ili ukoliko deluje ciljano na nivou kolona (90).

Glavnu prepreku prilikom formulacije gastoretentivnih terapijskih sistema predstavlja nepredvidivo vreme zadržavanja u želucu, jer usled preuranjenog pražnjenja želucačnog sadržaja može doći do nekompletnog oslobađanja aktivnih komponenti, te efikasnost preparata može biti ugrožena.

1.4.1 Fiziološke karakteristike želuca

Želudac je deo alimentarnog kanala koji se pruža od donjeg kraja jednjaka do početnog dela dvanaestopalačnog creva. To je kesasto prošireni mišićni organ, čiji oblik podseća na slovo J, a nalazi se ispod dijafragme u gornjem delu trbušne duplje. Želudac se sastoji iz vertikalnog dela sačinjenog od fundusa i korpusa i horizontalnog dela podeljenog na antrum i pilorus (Slika 13). Na granici između horizontalnog i vertikalnog dela nalazi se incizura (93).



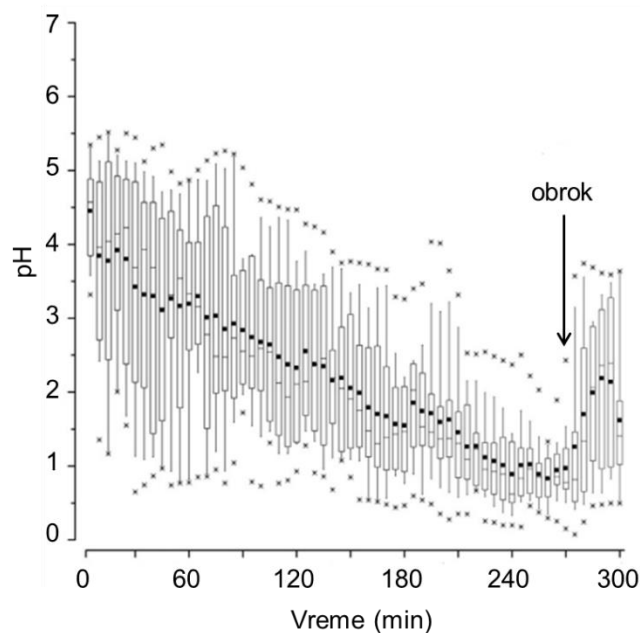
Slika 13. Delovi želuca

Fundus i korpus čine rezervoar u kome se uneti sadržaj natapa želudačnim sokom, a mešanje se vrši pod uticajem sporih peristaltičkih talasa. U antrumu je mešanje mnogo intenzivnije, a peristaltika je propulzionog tipa, te antrum radi kao pumpa koja omogućava pražnjenje želuca. Pylorus predstavlja prelaznu zonu između želuca i dvanaestopalačnog creva, a njegova glavna uloga podrazumeva kontrolu protoka između želuca i dvanaestopalačnog creva, kao i sprečavanja vraćanje crevnog sadržaja u želudac (91). Autonomni nervni sistem reguliše motilitet želuca, a glavnu ulogu ima nerv vagus.

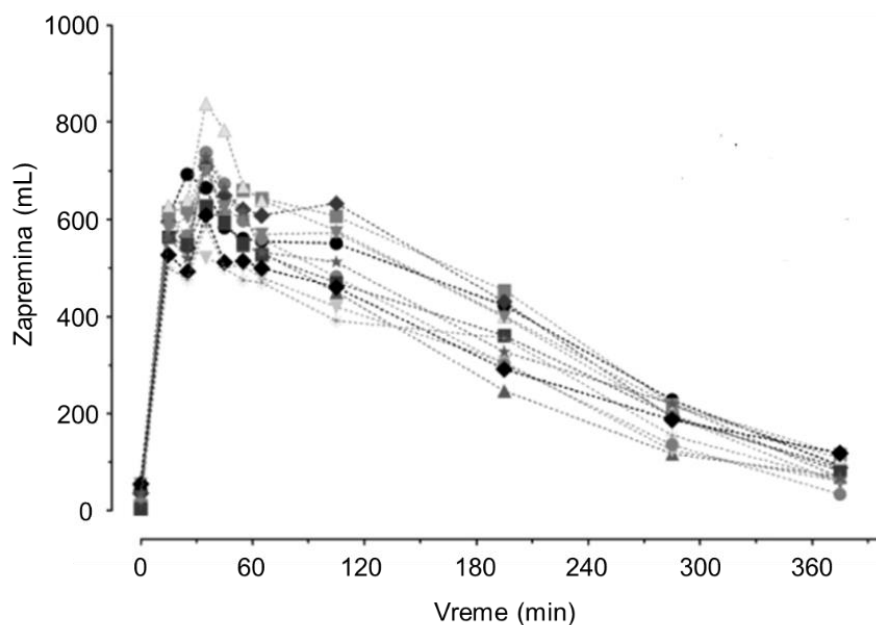
Kako bi se na što bolji način pristupilo razvoju gastroretentivnih nosača važno je razmotriti uslove koji vladaju u želucu tokom preprandijalnog (pre obroka, engl. *fasted state*) i postprandijalnog stanja (nakon obroka, engl. *fed state*). U toku preprandijalnog perioda javljaju se ciklične motorne kontrakcije tzv. migrirajući motorni kompleks (engl. *migrating motor complex*, MMC), koje se šire od kardije prema pilorusu, svakih 90 do 120 minuta, a karakterišu ga tri faze. Nakon prve faze mirovanja koja traje 40 do 60 minuta, sledi druga faza koju karakterišu povremene kontrakcije različitih amplituda, a odvija se tokom 20 do 40 minuta. Tokom treće faze javljaju se pravilne kontrakcije visoke amplitude i tada je pilorus relaksiran, čime se omogućava pražnjenje zaostalog himusa, sačinjenog od delimično svarenog sadržaja i želudačnih sokova. Ova faza traje 10 do 20 minuta, a tokom nje su kontrakcije toliko jake da čak i veoma veliki objekti bivaju izbačeni, te vreme zadržavanja u želucu nakon primene leka natašte obično nije duže od 1 do 2 sata. Međutim, postoje značajne interindividualne varijacije u pogledu trajanja MMC, te u nekim slučajevima ovi ciklusi mogu trajati i do 180 minuta (91,94,95). Nakon unosa kaloričnih pića i hrane, uslovi u želucu se značajno menjaju. Tačnije, tokom postprandijalne faze dolazi do pravilnog mešanja unetog sadržaja sa želudačnim sokom, kako bi se olakšalo varenje i usitnjavanje prisutnog sadržaja. Kontrakcijama antruma samo tečnost i fino usitnjen himus (1–2 mm) prelaze kroz pilorusni sfinkter u dvanaestopalačno crevo, dok se veće čestice vraćaju prema korpusu. Koordinacijom antroduodenalne aktivnosti dolazi do opuštanja dvanaestopalačnog creva i kontrakcije antruma, što za posledicu ima prolazak himusa. Brzina pražnjenja želuca zavisi od volumena, sastava i osmolarnosti hrane odnosno tečnosti u njoj. Tako, tečnosti mnogo brže prolaze kroz digestivni sistem nego čvrsta hrana. Primećeno je da usporenom pražnjenju doprinosi prisustvo veće količine masti, niska pH vrednost želudačnog sadržaja i visoka osmolalnost sadržaja. Vreme zadržavanja sadržaja u želucu se nakon obroka bogatih mastima i proteinima značajno povećava i iznosi oko 4 sata, pri čemu se u slučaju kada se hrana često unosi vreme zadržavanja povećava i na 400 minuta (96).

Prilikom razvoja gastroretentivnih oblika potrebno je razmotriti i parametre, kao što su zapremina i pH vrednost želudačnog sadržaja. Natašte, tj. nakon perioda gladovanja od najmanje 8

sati, u želucu se obično nalazi oko 10 do 50 ml kiselog sadržaja (pH 1–2). Primena farmaceutskog oblika zajedno sa 240 ml vode dovodi do povećanja zapremine, ali i do povećanja pH vrednosti do pH 4,6. Nakon toga, pH naglo opada i tečnost se relativno brzo prazni iz želuca u roku od oko 30 minuta (Slika 14). Unos kaloričnog obroka takođe dovodi do povećanja zapremine želucačnog sadržaja i povećanja pH vrednosti, ali u ovom slučaju može proći i do nekoliko sati dok se zapremina i pH ne vrata na vrednosti zabeležene pre uzimanja obroka. Unos visokokaloričnih obroka sa visokim sadržajem masti koje preporučuje FDA i EMA kao standardne obroke u studijama postprandijalne bioekvivalencije (engl. *fed-state bioequivalence*) utiče na povećanje pH vrednosti u želucu (pH 4,6), koja opada na osnovne vrednosti skoro linearno tokom 4 sata (Slika 15) (97). Slični rezultati su dobijeni za jednako kaloričnu tečnu hranu (94).



Slika 14. pH vrednost želucačnog sadržaja merena nakon unosa visokokaloričnog obroka bogatog mastima, preuzeto i prilagođeno iz Koziolk i sar. (97).



Slika 15. Zapremina želucačnog sadržaja nakon unosa visokokaloričnog obroka bogatog mastima, a potom i vode (240 ml) kod 12 zdravih ispitanika (98).

Pored toga, hormoni kao što su holecistokinin, glukagonu sličan peptid 1 i leptin usporavaju pražnjenje želuca, dok hormoni grelin i motilin ubrzavaju peristaltiku. Lekovi kao što su antiholinergici i opidoidi usporavaju transport, dok holinergerici i prokinetici ubrzavaju prolazak himusa. Biološki faktori, kao što su pol, starost, položaj tela, san, indeks telesne mase (engl. *body mass index*, BMI), fizička aktivnost i različite bolesti (npr. dijabetes, anksioznost, Parkinsonova bolest) takođe utiču na dužinu zadržavanja unetog sadržaja u želudac. Kod starijih osoba vreme zadržavanja sadržaja u želucu je duže, dok je kod pedijatrijske populacije vreme zadržavanja kraće u odnosu na zdrave odrasle osobe. Takođe, pol utiče na brzinu pražnjenja, te je vreme zadržavanja sadržaja u želucu duže kod žena nego kod muškaraca (95,96).

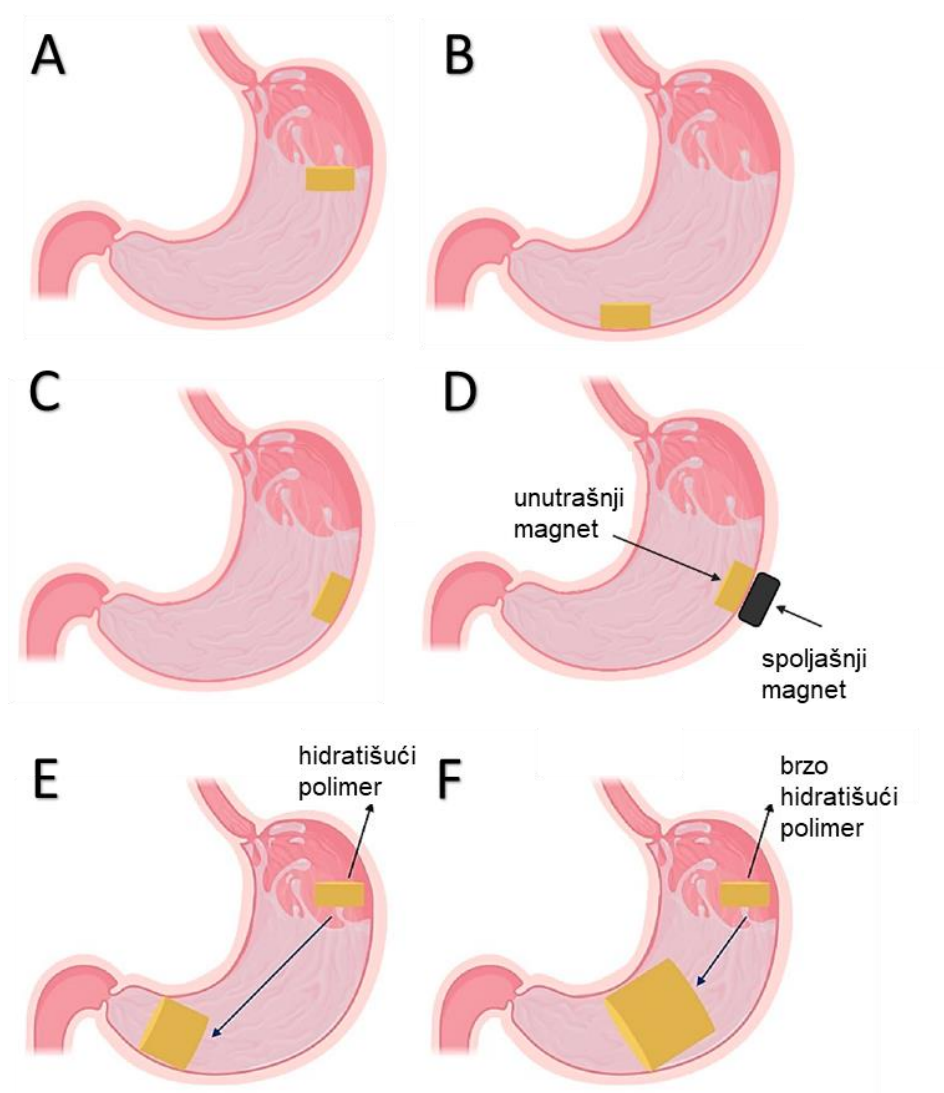
Primećeno je da veličina farmaceutskog oblika ili aglomerata utiče na vreme zadržavanja u želucu. Pelete se zbog malih dimenzija mogu pomešati sa himusom, što posledično dovodi do njihovog preuranjenog izbacivanja iz želuca tokom digestije. Sa druge strane, veliki i nesvarljivi sistemi koji se daju postprandijalno imaju velike šanse da ostanu u želucu značajno duže, jer prečnik otvora pilorusa ne prelazi nekoliko milimetara i stoga se zadržavaju sve dok se više od 90% unesenog obroka ne isprazni i ne dođe do ponovnog uspostavljanja motorne aktivnosti koja važi tokom preprandijalne faze. Interesantno je da kada se lek primenjuje natašte, važi obrnuto, tj. manji oblici će se duže zadržati u naborima želuca nego veće nesvarljive jedinice (94,95). Pored toga, gustina predstavlja važnu karakteristiku formulisanog preparata, jer sistemi čija je gustina manja od gustine želudačnog sadržaja plutaju po njegovoj površini, dok sistemi velike gustine ostaju zarobljeni u naborima želuca u blizini pilorusa (91).

1.4.2 Formulacioni pristupi

Gastroretentivni preparati mogu biti formulisani korišćenjem različitih pristupa, te se svrstavaju u više kategorija (Slika 16):

- mukoadhezivni sistemi;
- sistemi sa kontrolisanom gustinom, koji se dele na potapajuće i flotirajuće;
- ekspandirajući sistemi;
- magnetni sistemi;
- dualni sistemi.

Najčešće se na tržištu sreću flotirajući i mukoadhezivni sistemi, pri čemu farmaceutska industrija sve veći značaj pridaje gastroretentivnim sistemima kod kojih su kombinovana dva ili više pristupa u cilju postizanja što efikasnije retencije u želucu (88). U Tabeli 1 su predstavljeni neki od komercijalno dostupnih gastroretentivnih preparata.



Slika 16. Tipovi gastroretentivnih sistema: A) flotirajući sistemi; B) potapajući sistemi; C) mukoadhezivni sistemi; D) magnetni sistemi; E) i F) ekspandirajući sistemi, preuzeto i prilagođeno iz Vrettos i sar. (99).

Tabela 1. Gastroretentivni preparati dostupni na tržištu (preuzeto i prilagođeno prema Tripathi i sar. (89)).

Vrsta gastroretentivnog sistema	Zaštićeni naziv	Aktivna supstanca	Proizvođač
Mukoadhezivne tablete	Xifaxan [®]	Rifampicin	Lupin, Indija
Dvoslojne flotirajuće kapsule	Cytotec [®]	Misoprostol	Pfizer, UK
Obloženi višeslojni bubreći sistem	Baclofen GRS [®]	Baklofen	Sun Pharma, Indija
Koloidni gel flotirajući sistem	Convion [®]	Gvožđe-sulfat	Ranbaxy, Indija
Efervescentni flotirajući sistem	Zanocin OD [®]	Ofloksacin	Ranbaxy, Indija
	Riomet OD [®]	Metformin-hidrohlid	Ranbaxy, Indija
	Cifran OD [®]	Ciprofloksacin	Ranbaxy, Indija
Flotirajući sistemi tipa „splavova“	Gaviscon [®]	Alginska kiselina i natrijum-bikarbonat	Reckitt Benckiser Healthcare, UK
Efervescentni-bubreći flotirajući sistem	Prazopress XL [®]	Prazosin-hidrohlid	Sun Pharma, Japan
Sistem sa erodibilnim matriksom	Cipro XR [®]	Ciprofloksacin-hidrohlid i betain	Bayer, USA
Ekspandirajući sistem (sistem zasnovani na principu odmotavanja)	Accordion Pill [®]	Karbidopa i levodopa	Intec Pharma, Izrael
Flotirajući sistem sa kontrolisanim oslobađanjem	Madopar HBS [®]	Levodopa i benzerazid	Roche, UK
	Prolopa HBS [®]	Levodopa i benzerazid-hidrohlid	Roche, UK
	Valrelease [®]	Diazepam	Roche, UK

1.4.2.1 Mukoadhezivni sistemi

U sastav mukoadhezivnih sistema najčešće ulaze hidrofilni gelirajući polimeri prirodnog ili sintetskog porekla, kao što su karbopol, hitozan, natrijum-alginat, hipromeloza, polietilenglikol, (ko)polimeri akrilne kiseline, pektin, itd. Mukoadhezivne karakteristike polimera zavise od molekulske mase, strukture, kapaciteta za stvaranje vodoničnih veza, naelektrisanja, stepena hidratacije, fleksibilnosti i stepena umreženosti polimernih lanaca (89). Do mukoadhezije dolazi nakon bliskog kontakta između mukoadhezivnog polimera i mukozne membrane, odnosno mucina prisutnog u sluzokoži, tokom vlaženja i bubrenja polimera. Potom, polimerni lanci prodiru u tkivne pukotine, kao i između mukoadhezivnih polimernih lanaca i mukoze. Mukoadhezivni polimeri sadrže hidrofilne grupe kao što su hidroksi, karboksi, amidna i sulfatna, pa se veza sa mukozom ostvaruje preko vodoničnih veza, kao i pomoću elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija (100). Glavna prednost ovog pristupa ogleda se u tome što je aktivna supstanca u direktnom kontaktu sa epitelom, što može biti od značaja u terapiji lokalnih stanja, kao i sa aspekta apsorpcije aktivnih supstanci u želucu. Sa druge strane, nedostatak ovih sistema predstavlja nemogućnost ciljanog usmeravanja mukoadhezivnog preparata ka želucu, jer prethodno može doći do adhezije za druge delove gastrointestinalnog trakta (npr. jednjak), što može značajno uticati na terapijski ishod. Pored toga, usled kontinuiranog stvaranja i obnavljanja mukusa, kao i zbog jakih propulzivnih sila želudačnog zida može doći do smanjenja vremena zadržavanja farmaceutskog oblika u želucu (88).

1.4.2.2 Sistemi kontrolisani gustinom (flotirajući i potapajući sistemi)

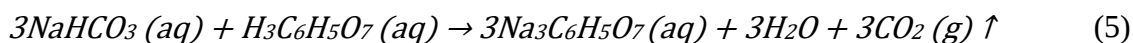
Kao što je poznato, gustina farmaceutskog oblika predstavlja faktor koji značajno utiče na dužinu zadržavanja u želucu. U zavisnosti da li se gastrotencija formulisanog preparata zasniva na tome što sistem ima gustinu veću ili manju od gustine želudačnog sadržaja (1,004–1,010 g/ml), sistemi kontrolisani gustinom gastrotentivnog oblika mogu se podeliti na flotirajuće i potapajuće sisteme.

1.4.2.2.1 Flotirajući sistemi

Od svih gastrotentivnih sistema do sada opisanih u literaturi, flotirajući sistemi su najviše proučavani, a na tržištu je sve veći broj ovakvih preparata. Flotirajuće sisteme prvi je opisao Davis 1986. godine (101), kada je objasnio kako se primenom preparata čija je gustina manja od 1 g/ml može olakšati gutanje (102). Kasnije dolazi do razvoja različitih vrsta flotirajućih sistema, te danas u zavisnosti od mehanizma kojim se odvija plutanje razlikujemo efervescentne i neefervescentne flotirajuće sisteme. Flotirajuće sisteme karakteriše relativna gustina koja je manja od gustine gastrične tečnosti (1,0040–1,0100 g/cm³), te nakon peroralne primenene ovi sistemi plutaju na površini želudačnog sadržaja, pri čemu se aktivna supstanca kontrolisano oslobađa (89).

1.4.2.2.1.1 Efervescentni flotirajući sistemi

Kod efervescentnih sistema do flotacije dolazi nakon oslobađanja gasa (CO₂) i/ili isparljivih tečnosti pri kontaktu između želudačne tečnosti i formulacije koja u svom sastavu sadrži efervescentne komponente i/ili isparljive tečnosti. Tačnije, gas nastaje usled reakcije između bikarbonata i kiseline, bilo one prisutne u želucu ili kiseline koje ulazi u sastav formulacije u prisustvu vode. Kao kisele komponente koriste se limunska, jabučna, vinska, fumarna kiselina, dok se od karbonata najčešće koriste natrijum-bikarbonat i kalijum-bikarbonat. Reakcija između kisele i bazne komponente odvija se u prisustvu vode kao katalizatora, tako da čak i male količine vode dovode do efervescencije (jednačina 5). Pored navedenih komponenti, efervescentni flotirajući sistemi u svom sastavu najčešće imaju i hidrofilne polimere koji bubre i zadržavaju mehuriće generisanog gasa.



Takođe, flotacija efervescentnih sistema se može postići i inkorporiranjem isparljivih organskih rastvarača kao što su aceton, etar, dihlormetan, ciklopentan, koji isparavaju na niskim temperaturama, te se na taj način dobijaju čestice niske gustine koje mogu da flotiraju. Međutim, treba imati u vidu da ostaci organskih rastvarača mogu negativno uticati na bezbednost proizvoda. Za sisteme čija se gastrotencija zasniva na efervescenciji karakteristično je da postoji vreme odlaganja (engl. *lag time*, t_{lag}), tj. vreme koje protekne pre nego što sistem počne da flotira i poželjno je da bude što kraće kako ne bi došlo do preuranjenog izbacivanja gastrotentivnog preparata iz želuca u tanko crevo (89,103,104).

1.4.2.2.1.2 Neefervescentni flotirajući sistemi

Različite strategije su korišćene u cilju formulisanja neefervescentnih flotirajućih sistema, te ovi sistemi mogu podeliti u tri grupe:

- hidrodinamički balansirani sistemi,
- flotirajući sistemi tipa „splavova“,
- sistemi male gustine.

Hidrodinamički balansirani sistemi su monolitni sistemi (engl. *single unit*) koji u svom sastavu sadrže značajan udeo (20–75 % m/m) jednog ili više gelirajućih polimera kao što su hipromeloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropilceluloza, natrijum-karboksimetilceluloza, agar, karagenani, guar guma, gelan guma, ksantan guma (105). Polimeri se mešaju sa aktivnom supstancom i najčešće se smeša puni u želatinske kapsule, koje se brzo raspadaju u želudačnom soku (89). Nakon

toga, dolazi do brze hidratacije i bubrenja polimera, te do stvaranja flotirajuće mase, pri čemu je brzina oslobađanja aktivne supstance kontrolisana hidratacijom i erozijom polimera (106).

Flotirajući sistemi tipa „splavova“ su tečni sistemi koji *in situ* u kontaktu sa gastričnom tečnošću formiraju kontinuirani sloj gela koji podseća na „splav“ (engl. *raft*), te su po tom svojstvu dobili ime, pri čemu do plutanja dolazi usled generisanja CO₂ koji ostaje zarobljen u strukturi gela. Tako formirani barijerni sloj između želuca i jednjaka može biti od koristi u lečenju gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB) ili drugih lokalno zastupljenih stanja/bolesti. U sastav ovih sistema ulaze bikarbonati i/ili karbonati i polimeri, kao što su alginska kiselina i njene soli, guar guma, gelan guma, ksiloglukan, pektin, hitozan, poli(D,L-mlečna kiselina), poli(D,L-laktid-ko-glikolid), polikaprolakton, hipromeloza, i donori kalcijuma. U slučaju ovih sistema idealan polimer bi trebalo da poseduje pseudoplastične osobine. Odnosno, poželjno je da sa povećanjem napona smicanja raste i viskozitet formulisanih sistema. Treba imati na umu i da je njihova mehanička čvrstina niska, te da pod uticajem peristaltičkih talasa može doći do preuranjenog izbacivanja ovih sistema iz želuca, što može nepovoljno uticati na efikasnost preparata (107).

Flotirajući sistemi male gustine su oni sistemi u koje je inkorporiran vazduh (šuplje mikrosfere ili „mikrobaloni“) ili su izgrađeni od materijala male gustine kao što su lipidi, ulja ili penasti praškovi (90). Za razliku od flotirajućih sistema kod kojih se plutanje ostvaruje usled generisanja gasa nakon kontakta sa želudačnim sadržajem, te postoji vreme koje protekne pre nego što sistem počne da flotira, kod flotirajućih sistema male gustine trenutno dolazi do plutanja.

Mikrobalone su prvi opisali Kawashima i sar. 1992. godine (108). To su multičestični sistemi koji se sastoje od šupljeg jezgra i polimerne membrane u koju je inkorporirana aktivna supstanca. Za izradu mikrobalona koriste se metoda evaporacije rastvarača i/ili metoda difuzije rastvarača. Kao pomoćne supstance pri njihovoj izradi najčešće su korišćeni polimeri kao što su acetil-celuloza, kalcijum-alginat, agar, pektin, itd. (89).

Jedan od pristupa koji se koristi pri izradi flotirajućih sistema male gustine podrazumeva inkorporiranje lipidnih komponenti male gustine kao što su Gelucire® 43/01 i 39/01. Ovi lipidi mogu biti korišćeni kao vezivna sredstva prilikom granulacije topljenjem i sredstva koja omogućavaju flotiranje i produženo oslobađanje inkorporiranih aktivnih supstanci prilikom formulisanja granula, peleta i mini tableta (105).

Pored toga, formulisanjem visoko poroznih sistema se može omogućiti flotiranje i dobijanje gastroretentivnih nosača. Tako su tablete u čiji sastav su ulazili polietilen oksid (PEO tip WSR 301), hidroksipropilceluloza, kamfor i magnezijum-stearat izrađene postupkom vlažne granulacije, a potom su podvrgavane temperaturi od 60 °C u trajanju od 24 sata, kako bi došlo do potpune sublimacije kamfora. Usled visoke poroznosti i male gustine, tablete su odmah počinjale da flotiraju. Dodatak kamfora uticao je na čvrstinu, te su tablete sa manjim sadržajem kamfora bile čvršće. Međutim, tablete bez i sa niskim sadržajem kamfora nisu flotirale (109).

U literaturi se sreću različiti načini formulisanja flotirajućih oblika. Jedna od novijih tehnika korišćenih u ovu svrhu podrazumeva izradu gastroretentivnih sistema koji u unutrašnjosti imaju šupljinu, što im omogućava flotiranje. Dome Matrix® sistem prvi put je opisan od strane Losi i sar. 2006. godine (110). Sistem se sastoji od najmanje dve jedinice, konkavnog i konveksnog dela, koje se izrađuju kompresijom pomoću posebno dizajniranog alata.

1.4.2.2.2 Sistemi velike gustine (potapajući sistemi)

Ovaj pristup podrazumeva formiranje sistema čija je gustina veća od gustine fiziološki prisutnog želudačnog sadržaja. Tako formulisani sistemi gustine ~ 3 g/cm³ zadržavaju se u naborima tela želuca blizu pilorusa. Kada je reč o potapajućim sistemima, u cilju povećanja gustine kao sredstva za dopunjavanje koriste se barijum-sulfat, gvožđe u prahu, cink-oksidi i titan-dioksidi (111). Međutim, dosadašnja istraživanja pokazuju da se primenom ovih sistema ne utiče značajno na vreme

zadržavanja u želucu (90). Pored toga, postoje i tehnološki problemi pri izradi visoko doziranih oblika (> 50 % aktivne supstance) (111).

1.4.2.3 Ekspandirajući sistemi

Jedan od pristupa koji ima za cilj zadržavanje farmaceutskog oblika u želucu podrazumeva povećanje njegovih dimenzija u želucu, čime se onemogućava njegov prolazak kroz pilorus. Iako nema jasnih zahteva, prečnik ovih oblika bi trebalo da bude veći od 13 mm. Međutim, primećeno je da su čak i veće jedinice uspevale da prođu kroz pilorus. Dakle, sistemi ovog tipa treba da budu prikladne veličine i oblika kako bi preparat mogao da se proguta, a važno je da nakon kontakta sa želudačnom tečnošću što pre dođe do povećanja dimenzija oblika kako bi se produžilo vreme njegovog zadržavanja u želucu. Takođe, bitno je da nakon oslobađanja aktivne supstance usledi eliminisanje gastroretentivnog preparata iz želuca. Ekspandirajući sistem optimalnih karakteristika ne bi trebalo da utiče na motilitet i pražnjenje želuca, niti da dovodi do iritacije (90).

Sistemi zasnovani na principu odmotavanja napravljeni su od biodegradabilnih materijala i formulisani su u različitim oblicima kao što su prsten, detelina, disk, krst. Ovi oblici se pakuju u želatinske kapsule (00 ili 000), a nakon raspadanja želatinske obloge dolazi do oslobađanja gastroretentivnog sistema. Sistemi zasnovani na principu odmotavanja najčešće se sastoje od jednog erodibilnog (npr. hidroksipropilceluloza, Eudragit® E) i jednog neerodibilnog polimera (npr. poliamidi, poliuretani), pri čemu je aktivna supstanca dispergovana u polimernom matriksu. Pored dimenzija, na zadržavanje ovih sistema u želucu značajno utiče i njihova rigidnost. Složena struktura, kao i visoka cena su značajne prepreke za proizvodnju većih serija ovih sistema. Nedostatak predstavlja i to što upotrebom ovih sistema može doći do iritacije, kratkotrajne opstrukcije ili gastropatije (112).

Bubreći sistemi su sistemi koji nakon kontakta sa vodom brzo bubre, što za posledicu ima drastično povećanje dimenzija ovih sistema. Neophodno je da do bubrenja dođe što pre, kako ne bi došlo do preuranjenog prelaska gastroretentivnog sistema iz želuca u intestinum. Izbor polimera značajno utiče na oslobađanje aktivne supstance, ali i na efikasnost samog gastroretentivnog preparata. Poznato je da polimeri sa većim stepenom umreženosti sporije bubre, ali pri tom veći stepen umreženosti doprinosi dužem održavanju fizičkog integriteta. Sa druge strane, polimeri manjeg stepena umreženosti brže bubre, ali usled slabije umreženosti rastvaranje polimera nastupa brzo. Neki od hidrokoloida koji se koriste u ovu svrhu su: pektin, hitozan, bentonit, metilceluloza, natrijum-karboksimetilceluloza, hipromeloza, agar, gelan guma, polietilen oksid (89,113). Kako bi se ubrzalo bubrenje, pribeglo se formiranju superporoznih hidrogelova. Strukturu superporoznih hidrogelova karakterišu brojne međusobno povezane pore koje zajedno formiraju otvorene kanale, što omogućava izuzetno brzo (manje od jednog minuta) i intenzivno kvašenje (stepen bubrenja može biti i veći od 1000) ovih sistema (90,114).

1.4.2.4 Magnetni sistemi

Magnetni sistemi se generalno koriste za ciljanu isporuku aktivnih supstanci, a sastoje se od farmaceutskog oblika koji sadrži mali magnet i spoljašnjeg magneta, koji se pozicionira iznad ciljnog mesta dejstva. Efikasnost magnetnih sistema zavisi kako od položaja samog magneta, tako i od jačine magnetnog polja. Primena ovih sistema nije jednostavna, te se pretpostavlja da bi ovakav način primene mogao nepovoljno uticati na komplijansu pacijenata (89).

1.4.2.5 Dualni sistemi

Razvojem gastroretentivnih sistema čije produženo zadržavanje u želucu se zasniva na dva mehanizma može se obezbediti duže zadržavanje u želucu i poboljšati efikasnost preparata. S tim u vezi, pri razvoju savremenih gastroretentivnih terapijskih sistema fokus se stavlja na dualne sisteme, kao što su sistemi sa mogućnošću flotiranja i mukoadhezije ili sistemi sa mogućnošću flotiranja i bubrenja (88).

1.4.3 Karakterizacija gastroretentivnih terapijskih sistema

S obzirom da efikasan gastroretentivni terapijski sistem treba da obezbedi oslobađanje aktivne supstance na kontrolisan način u želucu u toku dužeg vremenskog perioda, važno je izvršiti detaljnu *in vitro* karakterizaciju. U zavisnosti od tipa gastroretentivnog sistema sprovode se različita ispitivanja. Kod flotirajućih sistema se prati vreme odlaganja, vreme flotiranja i gustina formulisanih terapijskih sistema, kod mukoadhezivnih sistema meri se sila adhezije, a kod bubrećih sistema se određuje stepen bubrenja. Pored toga, važno je da dođe do kontrolisanog oslobađanja aktivne supstance, te se vrši *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja. U slučaju da su u formuli prisutni ekscipijensi koji mogu biti supstrati za gastrointestinalne enzime, važno je razmotriti i njihov uticaj primenom testova koji se zasnivaju na *in vitro* digestiji. Ukoliko su u pitanju tablete ili tvrde kapsule sa gastroretentivnim svojstvima važno je proceniti protočnost praškova, kao i mehaničke karakteristike tableta kako bi bili dobijeni farmaceutski oblici zadovoljavajućih karakteristika.

U cilju *in vivo* procene vremena zadržavanja gastroretentivnih terapijskih sistema koriste se tehnike kao što su scintigrafija, gastroskopija, ultrasonografija, koje omogućavaju vizualizaciju primenjenog preparata kako kod različitih vrsta životinja, tako i kod ljudi (115).

1.5 Mikroinkapsulacija

Pod terminom mikroinkapsulacije podrazumevaju se različiti postupci tokom kojih se čvrste supstance, tečnosti ili ređe gasovi okružuju membranom ili matriksom na način koji dovodi do formiranja mikročestica (78,116,117). Mikročesticama se smatraju čestice prečnika od 1 do 1000 μm , bez obzira na oblik i strukturu, a obično se dele na mikrosfere i mikrokapsule. Mikrosfere su mikročestice u kojima je aktivna supstanca homogeno dispergovana ili rastvorena tako da se formira matriksni tip sistema za isporuku. Mikrokapsule su heterogene čestice, kod kojih jezgro u kome se nalazi aktivna supstanca obloženo nosačem tj. zidom ili kapsulom (118).

Inkapsulacija može biti korišćena sa namerom da se (117,119,120):

- poboljša stabilnost inkapsuliranih supstanci, odnosno smanji degradacija koja može biti uzrokovana spoljašnjim faktorima (temperatura, vlažnost vazduha, svetlost) ili uslovima u organizmu (pH, enzimi, hidroliza);
- modifikuje oslobađanje inkapsuliranih supstanci kako bi se postiglo oslobađanje na određenom mestu tokom definisanog vremena;
- poboljšaju fizičke osobine i farmaceutsko-tehnološke karakteristike (npr. protočnost);
- koriguju organoleptičke osobine (npr. maskiranje neprijatnog ukusa i mirisa supstanci);
- spreče interakcije (fizičko razdvajanje supstanci);
- produži rok trajanja u odnosu na konvencionalne preparate;
- smanji toksičnost;
- poboljša efikasnost;
- poboljša komplijansa.

U cilju dobijanja proizvoda željenih karakteristika neophodno je razmotriti sledeća pitanja (119):

- Koji efekat bi trebalo da ispolje inkapsulirane supstance?
- Koji materijal bi bio pogodan za postizanje ciljnog efekta?
- Koji uslovi se primenjuju u toku inkapsulacije supstance u toku proizvodnje?
- Koja je optimalna koncentracija inkapsulirane supstance u mikročesticama?
- Na koji način bi bilo poželjno da se inkapsulirana supstanca oslobađa iz mikročestica?
- Koji su zahtevi u pogledu veličina čestica, gustine i roka upotrebe?
- Koji su ograničenja u pogledu troškova?

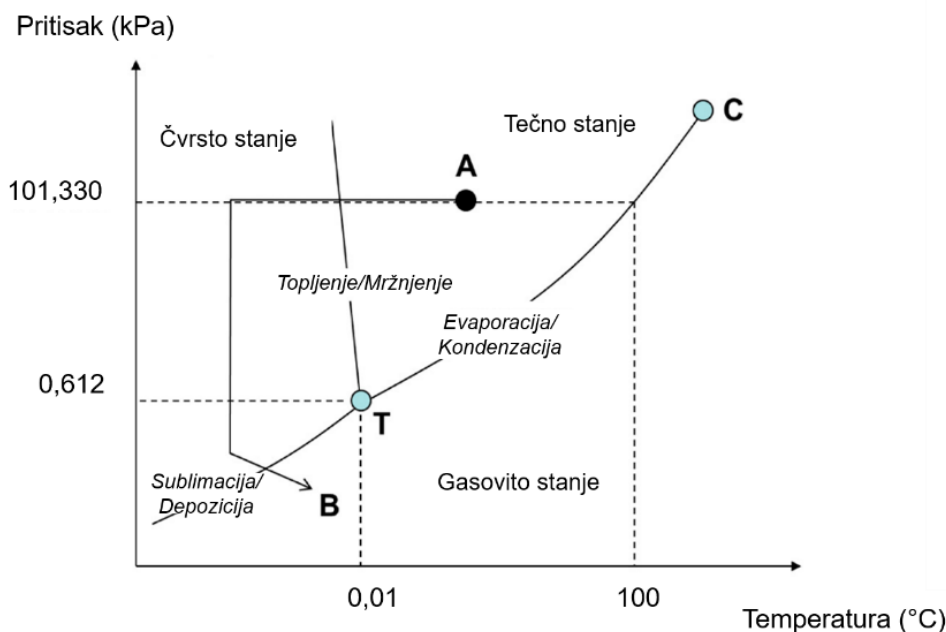
Izbor materijala koji će biti korišćen za inkapsulaciju vrši se razmatranjem fizičko-hemijskih osobina aktivnih supstanci, puta primene, farmaceutskog oblika, farmaceutsko-tehnoloških i biofarmaceutskih osobina značajnih za finalni proizvod (117). Idealan materijal, koji može biti korišćen u proizvodnji farmaceutskih preparata i dijetetskih suplemenata treba da bude biodegradabilan i biokompatibilan, a pored toga poželjno je da poseduje GRAS status. Za izradu mikročestica mogu se koristiti sintetski, polusintetski i polimeri prirodnog porekla. Sintetski polimeri uključuju biodegradabilne materijale, kao što su: polilaktid (PLA), poliglikolid (PGA), polilaktid-poliglikolid (PLGA), kao i nebiodegradabilnih polimere, kao što su polialkilcijano akrilati, polimetil metakrilati, poli(vinilalkohol). Iako su ovi polimeri vrlo stabilni, glavni nedostatak sintetskih polimera ogleda se u njihovoj nezadovoljavajućoj biokompatibilnosti. Tako je u slučaju mikročestica koje su sadržale PLGA primećeno da na mestu aplikacije dolazi do stvaranja kisele sredine, što može uticati na terapijski odgovor i na stabilnost aktivne supstance. Sa druge strane pomoćne supstance prirodnog porekla, koje uključuju proteine (albumin, želatin), polisaharide (alginat) i lipide (čvrste masti, voskovi, trigliceridi, masne kiseline) pokazuju zadovoljavajući bezbednosni profil, što ih čini izuzetno poželjnim materijalima i koriste se sa ciljem inkapsuliranja bioaktivnih jedinjenja, kako u farmaceutskoj, tako i u prehrambenoj industriji (77,121). Lipidi predstavljaju vrlo atraktivne pomoćne supstance sa aspekta inkapsulacije kako liposolubilnih, tako i hidrosolubilnih bioaktivnih

jedinjenja, jer mogu da zaštite nestabilna jedinjenja i da unaprede biološku raspoloživost slabo rastvorljivih jedinjenja ili onih sa neadekvatnom permeabilnošću. Takođe, mogu obezbediti i modifikovano oslobađanje bioaktivnih jedinjenja (122,123).

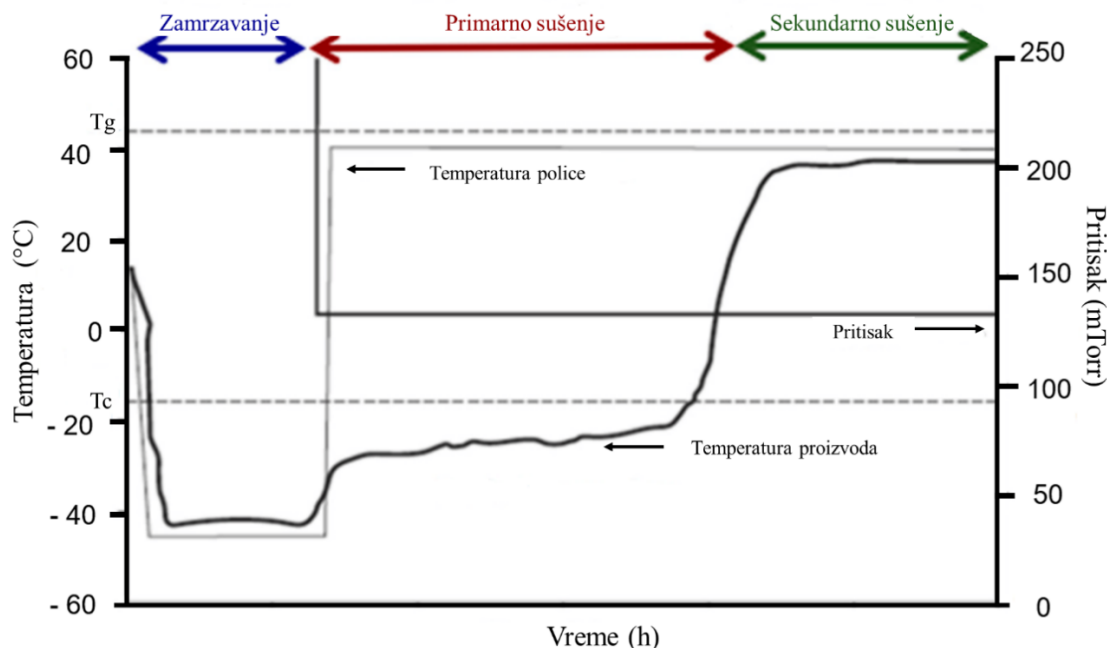
U cilju dobijanja mikročestica mogu se koristiti sledeće metode mikrokapsulacije: 1) fizičke metode (sušenje raspršivanjem, liofilizacija, oblaganje raspršivanjem, ekstruzija) 2) fizičko-hemijske metode (koacervacija i jonotropno geliranje) i 3) hemijske metode (polimerizacija) (124).

Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*) se primenjuje u industriji od 1927. godine (124), a danas je široko zastupljena metoda u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osnovni princip na kome se temelji ovaj metod podrazumeva raspršivanje tečne formulacije u kojoj je rastvorena/dispergovana aktivna supstanca u sitne kapi iz kojih u struji toplog gasa isparava rastvarač i nastaju suve čestice, koje se potom izdvajaju iz struje gasa. Kao zagrejeni gas najčešće se koristi vazduh, ali ukoliko je potrebno postići inertne uslove može se primenjivati azot (125). Pored toga, inkapsulaciju je moguće izvesti korišćenjem jednog uređaja, pri čemu se dobija prašak uniformnih karakteristika (118). Sa druge strane, ovaj postupak inkapsulacije nije idealan u slučaju isparljivih ili termolabilnih supstanci, jer se primenjuju visoke temperature. Nizak prinos, usled značajnih gubitaka u toku sušenja predstavlja glavni nedostatak ove metode.

Sušenje smrzavanjem ili liofilizacija (engl. *freeze-drying*) predstavlja postupak uklanjanja vode ili drugog pogodnog rastvarača, pri niskim temperaturama u vakuumu. Kako se najčešće uklanja voda od velike je važnosti razumeti fazne prelaze vode. U zavisnosti od temperature i pritiska, voda postoji u tri agregatna stanja, što je prikazano na Slici 17 (fazni dijagram vode). Na ovim karakteristikama se zasniva i sam proces liofilizacije, koji se sastoji iz faze smrzavanja, primarnog i sekundarnog sušenja. Na šemi predstavljenoj na Slici 18 je prikazano da u toku procesa liofilizacije pod uticajem snižene temperature najpre dolazi do smrzavanja uzorka, a potom se snižava pritisak ispod trojne tačke, a temperatura sistema se podiže tako da bude 2 do 3 °C ispod temperature kolapsa što uzrokuje sublimaciju vode. Nakon toga se u toku sekundarnog sušenja temperatura podiže i uspostavlja se što niži pritisak, kako bi se uklonila adsorbovana ili *bulk* voda (126). Sušenje smrzavanjem je kompleksna tehnika inkapsulacije, a posebno je pogodna u slučaju termolabilnih supstanci. Dugo trajanje faze sušenja i visoka cena postupka predstavljaju glavne nedostatke ove metode (127,128).



Slika 17. Fazni dijagram vode (T - trojna tačka vode, C - kritična tačka vode). „A“ predstavlja početnu tačku (atmosferski pritisak i ambijentalna temperatura), a „B“, željene krajnje uslove tokom sublimacije (ispod trojne tačke T). Preuzeto i prilagođeno prema Bhatta i sar. (126).



Slika 18. Temperaturni profil proizvoda tokom liofilizacije, gde je Tc temperatura kolapsa, a Tg temperatura staklastog prelaza suve materija (preuzeto i prilagođeno iz Bhatta i sar. (126)).

Metoda oblaganja raspršivanjem (engl. *fluid bed coating*) izvodi se pomoću uređaja na bazi fluidizirajućeg sistema u kome se pored oblaganja može izvesti sušenje, granulacija i peletizacija. Fluid je najčešće vazduh, supstrat čije oblaganje se vrši je u čvrstom stanju i može biti u obliku fino usitnjenog praška, granula, peleta, manjih tableta ili kapsula, dok je materijal kojim se vrši oblaganje u tečnom stanju (129). U komoru uređaja se najpre uvodi materijal koji treba inkapsulirati, nakon toga se pomoću specijalno dizajniranih prskalica (mlaznica) u komoru uvodi materijal kojim se vrši oblaganje. Metod oblaganja raspršivanjem u mnogome podseća na sušenje raspršivanjem. Glavna razlika je u tome što se kod sušenja raspršivanjem u komoru za sušenje uvodi rastvor/disperzija koja sadrži materijal koji se inkapsulira i materija za oblaganje (nosač) istovremno, dok se kod metoda fluidizacije odvojeno uvode materijal koji se inkapsulira i rastvor/rastop/disperzija polimera za oblaganje. Prednost ovog postupka je što se rastvor/rastop/disperzija sredstva za oblaganje može nanositi u više slojeva, pri čemu se sukcesivno mogu oblagati sa više različitih materijala, kao i visoka termalna efikasnost i mogućnost dobre kontrole procesa (130–132).

Koacervacija predstavlja koloidni fenomen i podrazumeva separaciju rastvora makromolekula na dve faze. Tačnije, fazu sa visokom koncentracijom koloida (koacervat) i ravnotežni rastvor (supernatant) sa niskom koncentracijom koloida. Ova pojava se najčešće uočava pri uslovima koji dovode do smanjenja rastvorljivosti makromolekula, kao što su promena pH, jonske jačine ili temperature. Ukoliko se separacija faza odvija u rastvoru jednog polimera reč je o prosto koacervaciji, a do nje dolazi usled dehidratacije polimera, usled promene uslova sredine ili usled dodatka rastvarača koji se meša sa vodom, ali ne i polimerom. Sa druge strane, kompleksna koacervacija se zasniva na interakcijama katjonskih i anjonskih polimera rastvorljivih u vodi (125). Formiranje koacervata kao posebne faze oko dispergovanih čestica (jezgra) osnovni je preduslov za proces inkapsulacije, pri čemu koacervat može nastati spontano mešanjem katjonskog i anjonskog polimera ili usled dodatka antirastvarača, elektrolita, promenom temperature, podešavanjem pH vrednosti sredine, kao i u prisustvu određenih površinski aktivnih materija (133). Interakcije među česticama moraju biti dovoljno jake kako bi nastao koacervat, ali ne isuviše izražene da ne bi došlo do precipitacije (125). Ova metoda nalazi primenu u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj

industriji, usled jednostavnosti, isplativosti, kao i visokih prinosa i efikasnosti inkapsulacije. Međutim, nedostatak predstavlja to što je ova metoda podložna uticaju velikog broja faktora, a dobijaju se čestice neadekvatne termomehaničke stabilnosti, zbog čega je potrebno vršiti umrežavanje (134).

Jonotropno geliranje predstavlja tehniku inkapsulacije zasnovanu na osobini određenih polimera, kao što su alginati i hitozan, koji u kontaktu sa elektrolitima (soli natrijuma, kalcijuma, magnezijuma) formiraju jonske veze, što dovodi do umrežavanja lanaca polimera i stvaranja gelova. Najčešće se ova tehnika izvodi tako što se najpre aktivna supstanca rastvara/disperguje u rastvoru/disperziji polimera, a potom u kontaktu sa gelirajućim jonima dolazi do formiranja mikročestica. Ova tehnika je jednostavna i pristupačna, a u cilju poboljšanja stabilnosti i mehaničkih karakteristika, kao i obezbeđivanja modifikovanog oslobađanja aktivnih jedinjenja, dobijenim česticama se mogu dodati suprotno naelektrisani polielektroliti, te dolazi do formiranja polielektrolitnih kompleksa mikročestica (135,136).

Emulgovanje je postupak kojim se dve tečnosti koje se ne mešaju prevode u emulzioni sistem u kome je jedna faza dispergovana u vidu malih sfernih kapi u drugoj. Mikroinkapsulacija hidrofobnih aktivnih supstanci se može izvesti korišćenjem metode hlađenja emulzija ili evaporacije/ekstrakcije rastvarača iz U/V (ulje/voda) emulzija. Međutim, ovi pristupi nisu efikasni u slučaju inkapsulacije hidrofilnih aktivnih supstanci, jer dolazi do brze difuzije u vodenu fazu, što nepovoljno utiče na efikasnost inkapsulacije. Iz tog razloga se u slučaju hidrofilnih jedinjenja formulišu voda/ulje/voda emulzije, pri čemu je hidrofilna aktivna supstanca inkorporirana u unutrašnju vodenu fazu (125,137).

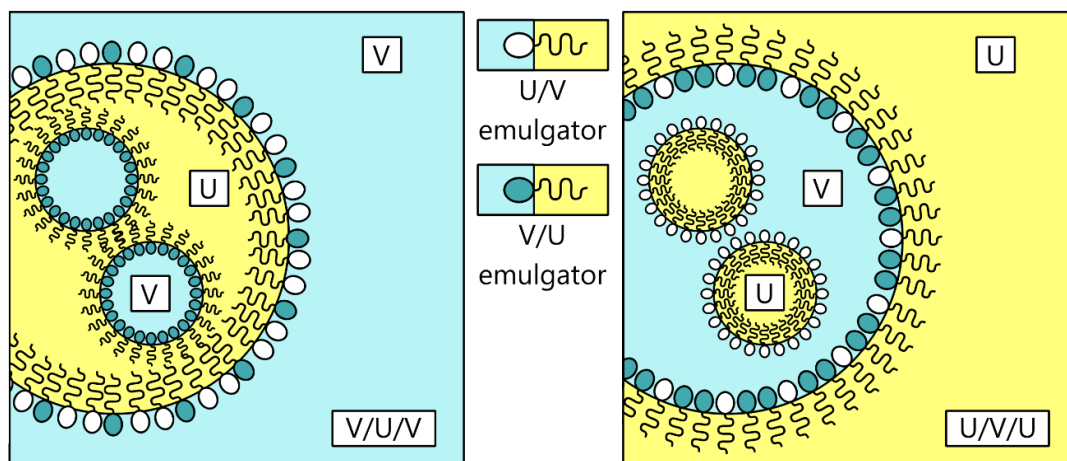
Polimerizacija je hemijski proces mikroinkapsulacije, pri čemu su poznati različiti tipovi polimerizacije. Tako, polimerizacija na granici faza podrazumeva formiranje polimera, koji nastaju reakcijom polikondenzacije iz komplementarnih monomera na međupovršini dve tečne faze koje se ne mešaju. Na ovaj način se mogu dobiti mikrosfere i mikrokapsule, u zavisnosti od toga da li se nastali polimer rastvara ili ne u kapima dispergovane faze u kojoj je rastvorena/dispergovana aktivna supstanca (138). Sa druge strane, proces radikalske polimerizacije se odvija u prisustvu molekula inicijatora i monomera. Molekuli inicijatora se prvo prevode u slobodne radikale, što dovodi do reakcije između slobodnog radikala i monomera i nastanka polimera (124).

1.6 Dvostruke emulzije

Dvostruke emulzije predstavljaju kompleksne sisteme, kod kojih je primarna emulzija dispergovana u spoljašnjoj (kontinuiranoj) fazi. Dva osnovna tipa višestrukih emulzija su (Slika 19):

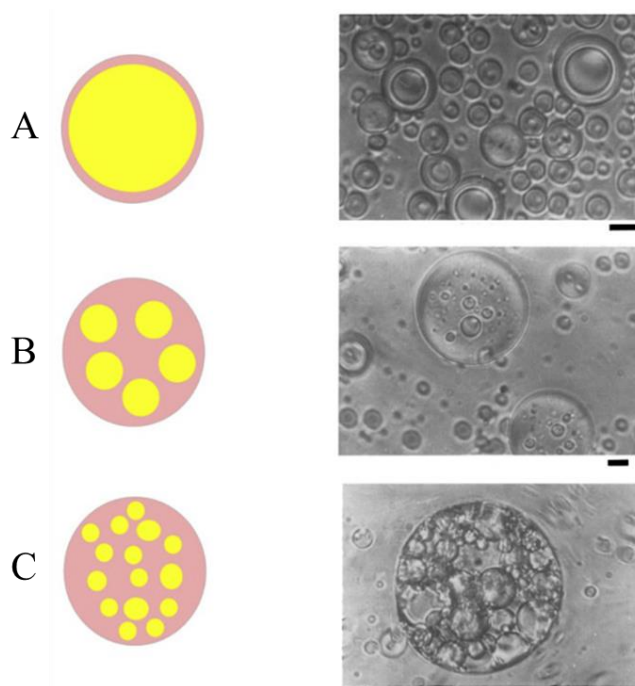
- voda/ulje/voda (V/U/V) emulzije, voda/ulje (V/U) emulzija je dispergovana u vodi;
- ulje/voda/ulje (U/V/U) emulzije, ulje/voda (U/V) emulzija je dispergovana u ulju (139).

Kako su V/U/V emulzije značajno više primenjivane u odnosu na U/V/U emulzije, jer su pogodnije sa aspekta inkapsulacije hidrofilnih bioaktivnih jedinjenja, kao što su i genciopikrozid i vodenometanolni ekstrakt korena lincure, u daljem radu fokus će biti stavljen na ovaj tip emulzija.



Slika 19. Šematski prikaz višestrukih emulzija tipa V/U/V i U/V/U.

U zavisnosti od strukture unutrašnje kapi, razlikuju se tri tipa dvostrukih emulzija (Slika 20): tip A tj. mikrokapsule kod kojih uljana faza obavlja jednu kap unutrašnje vodene faze, tip B tj. multivezikule koje sadrže veći broj kapi unutrašnje vodene faze u okviru uljane kapi i tip C, tj. mikrosfere koje poseduju kompleksnu unutrašnju strukturu, a karakteriše ih nejveća stabilnosti i efikasnost inkapsulacije (139).



Slika 20. Tipovi V/U/V emulzija: A) mikrokapsule; B) multivezikule; C) mikrosfere. Sa leve strane je predstavljen šematski prikaz ovih sistema, a sa desne strane su mikrofotografije dobijene pomoću optičkog mikroskopa, preuzeto iz publikacije Ding i sar (139).

Višestruke V/U/V emulzije su atraktivni nosači za isporuku aktivnih supstanci, jer se u njih mogu inkorporirati i hidrofilna i lipofilna jedinjenja (istovremeno) u cilju zaštite nestabilnih aktivnih jedinjenja, obezbeđivanja modifikovanog oslobađanja, poboljšanja biološke raspoloživosti ili maskiranja neprijatnog ukusa (140,141). Pored toga, primenjuju se i kao intermedijarni proizvodi u koje je moguće inkorporirati hidrofilna jedinjenja prilikom razvoja mikro/nanočestica. Takođe, ovaj tip emulzija se koristi u prehrambenoj industriji kako bi se smanjio sadržaj masti u proizvodima (142).

Glavni nedostatak višestrukih emulzija predstavlja to što ovi sistemi zbog postojanja dve (V/U i U/V) termodinamički nestabilne međupovršine relativno lako podležu različitim vidovima destabilizacije kao što su (143):

- flokulacija,
- koalescencija kapi unutrašnje vodene faze,
- koalescencija kapi uljane faze,
- povećanje ili smanjenje kapi usled difuzije,
- kriming i sedimentacija.

U cilju pripreme stabilnih višestrukih emulzija važno je razumeti uticaje većeg broja formulacionih i procesnih parametara. U sastav formulacija ovih sistema najčešće ulaze lipofilni i hidrofilni emulgatori, koji imaju presudan uticaj na stabilnost formulisanog sistema. Lipofilni emulgatori ($HLB \leq 6$) stabilizuju V/U međupovršinu, pri čemu se u slučaju peroralnih proizvoda najčešće koriste Span[®] 80 (sorbitan monooleat) i poliglicerol poliricinoleat (PGPR). Mali broj lipofilnih emulgatora koji se mogu koristiti u peroralnim farmaceutskim i dijetetskim proizvodima predstavlja jedan od ograničavajućih faktora u ovoj oblasti (142). Pokazano je da lipofilni emulgatori rigidne strukture, npr. oni koji poseduju više nezasićenih dvostrukih veza, utiču na poboljšanje stabilnosti dvostrukih emulzija, kao i da je važno da lipofilni emulgator bude kompatibilan sa uljanom fazom. Pored toga, lipofilni emulgatori veće molekulske mase efikasnije stabilizuju sistem u odnosu na emulgatore niže molekulske mase. Koncentracija lipofilnog emulgatora utiče na veličinu kapi V/U emulzije, tako da se pri većim koncentracijama lipofilnog emulgatora dobijaju dvostruke emulzije sa manjom veličinom kapi V/U emulzije, većom stabilnošću i efikasnošću inkapsulacije. Međutim, potrebno je naglasiti da može doći do narušavanja strukture V/U/V emulzije i njenog prelaska u V/U emulzije, ukoliko je koncentracija lipofilnog emulgatora isuviše visoka (139,143). Hidrofilni emulgatori ($HLB 8-18$) stabilizuju U/V međupovršinu, a najčešće se sreću polisorbitat 20 (Tween[®] 20), polisorbitat 80 (Tween[®] 80), izolat proteina soje, lecitin, natrijum-kazeinat, smeše proteina i polisaharida, konjugati polisaharida i proteina (kazein-dekstran, ovoalbumin-dekstran). Takođe, pokazano je da se stabilnost emulzija poboljšava ukoliko se koriste emulgatori sličnih dužina lanaca (144). Kao komponente uljane faze emulzija namenjenih za peroralnu primenu koriste se trigliceridi srednje dužine lanaca ili ulja prirodnog porekla (sojino ulje, maslinovo ulje, susamovo ulje, suncokretovo ulje, ricinusovo ulje), kao i čvrsti lipidi (tripalmitin, stearinska kiselina, gliceril-tripalmitat) (142,145,146). Izbor uljane faze može da utiče na viskozitet sistema i na brzinu difuzije aktivnih komponenti kroz uljanu fazu. Tako se korišćenjem čvrstih lipida može uticati na smanjenje difuzije inkorporiranih supstanci, čime se poboljšava stabilnost čitavog sistema. Pored toga, dodatkom gelirajućih sredstava kao što su želatin, alginati, ksantan guma, arapska guma, pektin, može se uticati na povećanje viskoziteta vodene faze, čime se smanjuje mogućnost koalescencije, flokulacije i difuzije hidrosolubilnih komponenti. U cilju stabilizacije višestrukih emulzija važno je održati osmotsku ravnotežu između spoljašnje i unutrašnje faze, te se iz tog razloga u vodenu fazu dodaju elektroliti, koji pored toga doprinose i efikasnosti emulgatora (147).

Višestruke emulzije mogu biti izrađene jednostepenim ili češće dvostepenim postupkom. Jednostepeni postupak podrazumeva zagrevanje emulzije koja sadrži odgovarajuće emulgatore, pri čemu dolazi do inverzije faza i formiranja dvostrukih emulzija. Kod dvostepenog postupka, najpre se obrazuje V/U emulzija, dok se u drugom koraku V/U emulzija disperguje u spoljašnjoj vodenoj fazi i nastaje V/U/V emulzija. Emulzije mogu biti izrađene različitim tehnikama, a najčešće se u tu svrhu koriste rotor-stator homogenizatori, homogenizatori pod visokim pritiskom, ultrazvučni

homogenizatori, kao i mikrofluidizacioni sistemi. Takođe, višestruke emulzije se mogu dobiti i tehnikom membranskog emulgovanja. Izbor uređaja kojim se vrši homogenizacija značajno utiče na karakteristike dvostruke emulzije. Tako se korišćenjem rotor-stator homogenizatora mogu dobiti emulzije čija veličina kapi je mikrometarskih dimenzija, dok se homogenizacijom pod visokim pritiskom ili ultrazvučnom homogenizacijom dobijaju emulzije čije kapi su nanometarskih dimenzija. Kod emulzija koje se dobijaju metodama zasnovanim na generisanju sile koja dovodi do kolizije, kavitacije i turbulencije pri homogenizaciji dvostepenim postupkom, primarna emulzija se homogenizuje pri visokim brzinama smicanja, dok se u okviru druge faze koriste znatno niže brzine, kako ne bi došlo do narušavanja strukture primarne emulzije (144). U zavisnosti od izbora tehnike na karakteristike emulzija mogu uticati brojni procesni parametri, kao što su temperatura emulgovanja, brzina mešanja, trajanje procesa emulgovanja, pritisak u sistemu, brzina i način hlađenja emulzije.

Stabilnost dvostrukih emulzija može se unaprediti i sušenjem emulzija, tj. njihovim prevođenjem u praškove. U tu svrhu najčešće se primenjuju postupak sušenja raspršivanjem i liofilizacija, a kao finalni proizvodi dobijaju se mikro/nano čestice. Takođe, mikro/nano čestice se iz dvostrukih emulzija mogu dobiti postupkom evaporacije rastvarača. Ovaj postupak podrazumeva korišćenje hidrofobnog organskog rastvarača (dihlormetana, etil-acetata, hloroforma) kao uljane faze u kojoj se rastvara polimerni nosač, a nakon mešanja sa vodenom fazom u kojoj je rastvorena hidrofilna aktivna supstanca obrazuje se V/U emulzija. Formirana V/U emulzija meša sa spoljašnjom vodenom fazom i dolazi do stvaranja V/U/V emulzija. Nakon toga vrši se uparavanje organskog rastvarača i tako nastaju mikročestice (148). Međutim, kako ovaj postupak zahteva korišćenje organskih rastvarača koji mogu biti toksični, pristupi koji podrazumevaju dobijanje mikročestica sušenjem dvostrukih emulzija raspršivanjem ili liofilizacijom su znatno bezbedniji.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije obuhvata razvoj čvrstih farmaceutskih oblika tj. kapsula i tableta sa gastoretentivnim svojstvima u koje je inkapsuliran ekstrakt korena lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*), a istraživanje je podeljeno u tri faze.

Cilj prve faze podrazumevao je optimizaciju procesa ekstrakcije korena lincure. S obzirom da je koren lincure bogat brojnim bioaktivnim jedinjenjima proces ekstrakcije je optimizovan sa ciljem da se postigne što viši prinos dominantnog sekoiridoidnog jedinjenja (genciopikrozida), kao i izogentizina, karakterističnog predstavnika iz grupe ksantona i ukupnih polifenola. Prvo je sproveden skrining korišćenjem *Plackett-Burman* dizajna, jer na osnovu literaturnih podataka nije bilo moguće ustanoviti koji faktori značajno utiču na odgovore. Nakon selekcije faktora, optimizacija je izvedena korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna, dok su dobijeni rezultati analizirani primenom metodologije površine odgovora i veštačkih neuronskih mreža.

U okviru druge faze cilj je bio razviti gastoretentivne flotirajuće lipidne nosače sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure metodom koja može da obezbedi visok prinos praška, kao i visoku efikasnost inkapsulacije i modifikovano oslobađanje genciopikrozida. Treba napomenuti da je genciopikrozid izabran kao marker jedinjenje, jer je vrlo nestabilno, a pritom dominantno bioaktivno jedinjenje, koje karakteriše niska biološka raspoloživost i kratko poluvreme eliminacije. S obzirom na kompleksnost postavljenog cilja, u okviru ove faze pored ispitivanja prinosa, efikasnosti inkapsulacije i *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida, bilo je važno proceniti i morfologiju čestica, *bulk* gustinu, poroznost čestica, kao i protočnost praška, tabletabilna svojstva i mukadhezivnost.

Cilj treće faze je bio razviti čvrste farmaceutske oblike (tablete i kapsule) sa gastoretentivnim svojstvima u koje je inkorporiran prašak sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure dobijen liofilizacijom višestrukih emulzija (metodom razvijenom u okviru prethodne faze) korišćenjem koncepta dizajniranja kvaliteta (QbD). Dakle, bilo je potrebno definisati ciljani profil kvaliteta proizvoda (QTPP), kritične attribute kvaliteta (CQA), a potom i izvršiti procenu rizika kako bi ustanovili koji atributi materijala i procesni parametri imaju odlučujući uticaj. Nakon toga sprovedena je karakterizacija u cilju procene uticaja kritičnih atributa materijala i parametara procesa na karakteristike međuproizvoda, tableta i kapsula, pri čemu je fokus stavljen na ispitivanje efikasnosti inkapsulacije, *in vitro* brzine oslobađanja, mukoadhezivnih svojstava, sposobnosti flotiranja, kao i procenu stabilnosti. Pored toga, *in vitro* testom procenjen je i u uticaj digestivnih enzima na brzinu oslobađanja genciopikrozida.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Prva faza istraživanja – Optimizacija procesa ekstrakcije korena lincure

3.1.1 Materijali

Korišćeni reagensi i standardi bili su analitičkog kvaliteta: etanol 96 % (v/v) (Honeywell Riedel de Haen, Nemačka), *Folin-Ciocalteu* reagens (Sigma-Aldrich, Nemačka), natrijum-karbonat, metanol, ortofosforna kiselina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), acetonitril (Merck, Nemačka). Ultra čista voda je dobijena pomoću Milli-Q sistema za prečišćavanje (Millipore, Francuska). Korišćeni su sledeći standardi: genciopikrozid (ChromaDex, SAD), izogentizin (Phytolab, Nemačka) i galna kiselina (Extrasynthese, Cedex, Francuska).

3.1.1.1 Biljni materijal

Koren lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*) dobijen je od Sektora proizvodnje Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (Beograd, Srbija; serija: 19910718). Biljni materijal je sušen na vazduhu, a potom je usitnjavan na industrijskom mlinu i pomoću odgovarajućih sita je podeljena u tri frakcije ($\leq 0,75$ mm; 0,75–2 mm; > 2 mm). Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi.

3.1.2 Metode

3.1.2.1 Postupak ekstrakcije

Usitnjenom korenu lincure (0,25–1 g) je dodata adekvatna količina ekstragensa (10–50 ml), kako bi bio postignut odgovarajući odnos droge i rastvarača. Ekstrakcija je izvedena u termostatisanom vodenom kupatilu (Grant, model LSB 18, Ujedinjeno Kraljevstvo) prema *Plackett-Burman* dizajnu (faza skrininga) ili centralnom kompozitnom dizajnu (faza optimizacije).

3.1.2.2 Skrining parametara ekstrakcije

U toku ove faze korišćene su dve frakcije ($\leq 0,75$ mm i > 2 mm) biljnog materijala. Ekstrakcija je vršena etanolom koncentracije 10 % ili 70 % (v/v) na temperaturi od 25 ili 80 °C tokom 15 ili 180 minuta, odnos droge i rastvarača bio je 1:10 ili 1:50, pri čemu su neki uzorci mešani tokom ekstrakcije pomoću magnetne mešalice, a određeni uzorci su bili izloženi pretretmanu mikrotalasima na 75 °C, 300 W tokom 3 minuta (Milestone, HPR 100/10 SA, Italija). Nakon izvršene ekstrakcije svi uzorci su filtrirani kroz filter papir.

U okviru ove faze sve ekstrakcije su izvedene prema matrici navedenoj u Tabeli 2 u skladu sa *Plackett-Burman* dizajnom. Ispitan je uticaj sedam nezavisnih varijabli, uključujući odnos droge i rastvarača, koncentraciju etanola, veličinu čestica, vreme ekstrakcije, temperaturu ekstrakcije, mešanje i pretretman mikrotalasima. Realne i kodirane vrednosti ispitivanih faktora prikazane su u Tabeli 3. Kao odgovori tj. zavisne varijable praćeni su sadržaji ukupnih polifenola (engl. *total phenolic content*, TPC), genciopikrozida i izogentizina. Efekti nezavisnih varijabli analizirani su prema navedenom linearnom modelu (6):

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + \dots + A_nX_n \quad (6)$$

Gde je Y nezavisna varijabla, A_0 je konstanta, a $A_1 - A_n$ su koeficijenti linearne regresije.

Tabela 2. *Plackett-Burman* matrica prema kojoj su izvedeni eksperimenti (X1 – odnos droga/rastvarač, X2 – koncentracija etanola, X3 – veličina čestica, X4 – vreme, X5 – temperatura, X6 – mešanje, X7 – pretretman mikrotalasima).

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
-1	-1	-1	1	-1	1	1
1	-1	-1	-1	1	-1	1
1	1	-1	-1	-1	1	-1
-1	1	1	-1	-1	-1	1
1	-1	1	1	-1	-1	-1
-1	1	-1	1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1	1	1	-1
1	1	1	1	1	1	1

Tabela 3. Nezavisne varijable korišćene u okviru *Plackett-Burman* dizajna.

Nezavisne varijable	Jedinica	Simbol	Kodirane vrednosti	
			-1	+1
Odnos droga/rastvarač	/	X1	1:10	1:50
Koncentracija etanola	% (v/v)	X2	10	70
Veličina čestica	mm	X3	≤ 0,75	> 2
Vreme	min	X4	15	180
Temperatura	°C	X5	25	80
Mešanje	obrtaja/min	X6	0	200
Pretretman mikrotalasima	W	X7	0	300

3.1.2.3 Optimizacija korišćenjem metodologije površine odgovora

Eksperimenti su izvedeni u skladu sa centralnim kompozitnim dizajnom. Četiri nezavisne varijable (temperatura – A, vreme – B, odnos droge i rastvarača – C, koncentracija etanola – D) koje su odabrane nakon faze skrininga varirane su na pet nivoa, kao što je prikazano u Tabeli 4, čime je omogućena analiza interakcija i kvadratnih efekata. Ekstrakcija je izvedena etanolom različitih koncentracija (10–70 % v/v), tokom 8–180 minuta na temperaturi od 20 do 80 °C, pri čemu je odnos droge i rastvarača bio od 1:10 do 1:50, a veličina čestica biljnog materijala je bila konstantna (0,75–2 mm). Praćeni su isti odgovori kao i u fazi skrininga. Dizajn se sastojao od 27 nasumičnih eksperimenata sa tri ponavljanja u centralnoj tački.

Dobijeni rezultati su analizirani primenom metodologije površine odgovora. Kvadratni (polinomski) modeli kojima su opisani uticaji nezavisno promenljivih na zavisno promenljive odgovarali su sledećoj jednačini (7):

$$Y_k = b_{k0} + \sum_{i=1}^4 b_{ki} X_i + \sum_{i=1}^4 b_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{kij} X_i X_j \quad (7)$$

U navedenoj jednačini Y_k je predviđeni odgovor, a b_{k0} , b_{ki} , b_{kii} i b_{kij} su koeficijenti dobijenog matematičkog modela, dok su X_i i X_j kodirane vrednosti nezavisno promenljivih. Primenom višestruke linearne regresije dobijeni su koeficijenti i konačne jednačine. Analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za procenu značajnosti nezavisno promenljivih i njihovih interakcija ($p < 0,05$). Kao model koji najbolje opisuje odnos između nezavisno promenljivih i eksperimentalno određenih zavisno promenljivih odabran je onaj sa najvišom vrednošću koeficijenta determinacije

(R^2). Vrednost ovog parametra pokazuje koji deo varijacije odgovora se može objasniti varijacijama faktora. Pored toga, bilo je neophodno da p-vrednost modela bude manja od 0,05; kao i da p-vrednost odstupanja od modela (engl. *lack of fit*) bude veća od 0,05. Ukoliko *lack of fit* karakteriše p-vrednost veće od 0,05 to znači da se odstupanje od modela javlja usled eksperimentalne greške, a ne usled neadekvatnosti formiranog modela. Nakon odabira odgovarajućeg modela eliminisani su članovi (engl. *backward elimination*) za koje je ustanovljeno da nemaju statistički značajan uticaj na vrednost zavisno promenljivih ($p > 0,05$), pri čemu su zadržane one nezavisno promenljive koje su bile neophodne za održavanje hijerarhije modela. Kako bi optimizovali više odgovora istovremno korišćena je funkcija poželjnosti koju su definisali Derringer i Suich. Program Design Expert® (probna verzija, Stat-Ease, SAD) je korišćen prilikom dizajniranja eksperimenta, analize podataka i određivanje optimalnih uslova. Ekstrakcija pod optimalnim uslovima izvedena je u pet ponavljanja radi validacije dobijenog modela.

Tabela 4. Uslovi pri kojima su izvedeni eksperimenti u fazi optimizacije ekstrakcije u skladu sa centralnim kompozitnim dizajnom.

Temperatura, A (°C)	Vreme, B (min)	Odnos droga/rastvarač, C	Etanol koncentracija, D (%)
35 (-1)	51 (-1)	20 (-1)	25 (-1)
65 (1)	51 (-1)	20 (-1)	25 (-1)
35 (-1)	137 (1)	20 (-1)	25 (-1)
65 (1)	137 (1)	20 (-1)	25 (-1)
35 (-1)	51 (-1)	40 (1)	25 (-1)
65 (1)	51 (-1)	40 (1)	25 (-1)
35 (-1)	137 (1)	40 (1)	25 (-1)
65 (1)	137 (1)	40 (1)	25 (-1)
35 (-1)	51 (-1)	20 (-1)	55 (1)
65 (1)	51 (-1)	20 (-1)	55 (1)
35 (-1)	137 (1)	20 (-1)	55 (1)
65 (1)	137 (1)	20 (-1)	55 (1)
35 (-1)	51 (-1)	40 (1)	55 (1)
65 (1)	51 (-1)	40 (1)	55 (1)
35 (-1)	137 (1)	40 (1)	55 (1)
65 (1)	137 (1)	40 (1)	55 (1)
20 (-2)	94 (0)	30 (0)	40 (0)
80 (2)	94 (0)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	8 (-2)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	180 (2)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	10 (-2)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	50 (2)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	10 (-2)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	70 (2)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)

3.1.2.4 Veštačke neuronske mreže

Eksperimentalni rezultati dobijeni pri uslovima definisanim u Tabeli 4 upotrebljeni su i za izgradnju modela primenom veštačkih neuronskih mreža pomoću JMP softvera (probna verzija, SAS Institute, Inc.). Za potrebe ovog ispitivanja izabrana je arhitektura veštačkih neuronskih mreža tipa višeslojnog perceptrona, sa jednim slojem skrivenih neurona. Broj neurona u skrivenom sloju određen je pristupkom pokušaja i greške sa ciljem da se dobije ANN model sa najnižim korenom srednje vrednosti kvadratne greške (engl. *root mean square error*, RMSE) i najvećim koeficijentom determinacije (R^2). Ova struktura modela je našla primenu zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti modelovanja kompleksnih odgovora. Prvi sloj (ulazni sloj) sa četiri neurona predstavljao je nezavisne varijable (temperatura, vreme, odnos droga/rastvarač, koncentracija etanola), drugi sloj je bio sloj skrivenih neurona, a izlazni je obuhvatao tri odgovora (sadržaj genciopikrozida i izogentizina, kao i TPC). Hiperbolička tangentna funkcija je korišćena kao funkcija aktivacije između ulaznog i skrivenog sloja. Za validaciju i testiranje razvijenog modela korišćena je *K-fold* unakrsna procedura (149).

3.1.2.5 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima određen je spektrofotometrijski na osnovu modifikovane metode koju su definisali Waterman i Mole (150,151). Ovaj metod zasniva se na reakciji polifenolnih jedinjenja sa *Folin-Ciocalteu* reagensom (fosfomolibdovolfraimovom kiselinom) u baznoj sredini, pri čemu dolazi do oksidovanja fenola do hinona i redukcije molibdata i volframata do plavo obojenih proizvoda.

U ispitivani ekstrakt (200 μ l u odgovarajućem razblaženju) dodat je rastvor *Folin-Ciocalteu* reagensa (1 ml, 1:10), a nakon 4 minuta natrijum-karbonat (800 μ l, 75 g/l). Smeša je inkubirana 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi. Potom je apsorbancija merena na 765 nm na spektrofotometru (Hewlett Packard, 400N, SAD). Slepa proba je pripremljena na isti način kao i ispitivani uzorci, a sadržala je 200 μ l rastvarača korišćenog pri pripremi ispitivanog ekstrakta. Serije razblaženja galne kiseline (0–100 mg/l) korišćene su za izradu kalibracione krive. Rezultati su izraženi kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu droge (mg GAE/g droge). Određivanje sadržaja ukupnih polifenola za svaki uzorak je vršeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.1.2.6 Kvantitativna HPLC analiza

Sadržaj genciopikrozida i izogentizina utvrđen je korišćenjem visokoeфикаsne tečne hromatografije (engl. *high pressure liquid chromatography*, HPLC), koju su prethodno opisali Balijagić i sar. (151). Analiza je izvršena na uređaju Agilent 1200 RR (Agilent, Nemačka), a za razdvajanje je korišćena kolona Zorbax SB-C18 (Agilent, Nemačka) (150 mm $\times$ 4,6 mm; veličina čestica 5 μ m). Mobilna faza se sastojala od rastvarača A (rastvor ortofosforne kiseline u vodi, 1 % v/v) i rastvarača B (acetonitril). Primenjeno je gradijento eluiranja pri protoku od 1 ml/min, tako da je: 0–5 min, 98–90 % A; 5–15 min, 90 % A; 15–20 min, 90–85 % A; 20–25 min, 85–70 % A; 25–30 min, 70–40 % A; 30–34 min, 40–0 % A. Zapremina injektovanih uzoraka je iznosila 5 ml, pri čemu je temperatura održavana na 25 °C. Hromatogrami su snimljeni na 260 i 320 nm. Identifikacija genciopikrozida i izogentizina je izvršena poređenjem njihovih UV spektara i retencionih vremena sa standardima. Kvantifikacija je izvršena na osnovu površine pikova genciopikrozida i izogentizina korišćenjem kalibracione krive (koeficijent korelacije je bio 0,998 za genciopikrozid i 0,996 za izogentizin). Rezultati su predstavljeni kao miligram po gramu droge (mg/g droge).

3.1.3 Rezultati i diskusija

3.1.3.1 Skrining faktora koji utiču na proces ekstrakcije genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola

Skrining studija je sprovedena sa ciljem identifikacije glavnih faktora koji utiču na sadržaj ispitivanih bioaktivnih jedinjenja (genciopikrozid, izogentizin i TPC), a rezultati su predstavljeni na Slici 21 i u Tabeli 5.

Tabela 5. Eksperimentalno utvrđeni sadržaji genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola u toku faze skrininga.

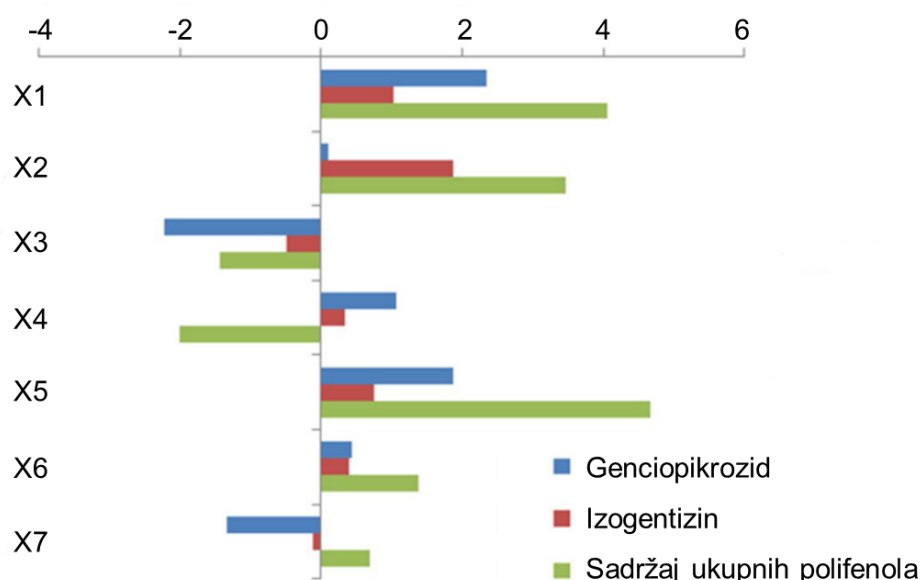
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	Genciopikrozid (mg/g droge)	Izogentizin (mg/g droge)	TPC (mg GAE/g droge)
-1	-1	-1	1	-1	1	1	11,18	0,59	6,27
1	-1	-1	-1	1	-1	1	16,66	2,71	17,00
1	1	-1	-1	-1	1	-1	16,63	5,97	15,97
-1	1	1	-1	-1	-1	1	3,98	1,89	3,61
1	-1	1	1	-1	-1	-1	13,26	1,12	7,39
-1	1	-1	1	1	-1	-1	16,95	5,29	18,43
-1	-1	1	-1	1	1	-1	11,05	0,70	7,33
1	1	1	1	1	1	1	15,39	6,92	27,78

TPC – sadržaj ukupnih polifenola; GAE – ekvivalent galne kiseline.

Dobijeni rezultati su pokazali da postoji pozitivan uticaj faktora X1 (odnos droga/rastvarač) na ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i TPC, što znači da se sa povećanjem zapremine rastvarača prinos ispitivanih jedinjenja povećavao. Ovaj rezultat je u skladu sa principima prenosa mase, jer sa povećanjem gradijenta koncentracije raste brzina difuzije. Međutim, nakon postizanja ravnotežnog stanja prinosi bioaktivnih jedinjenja neće nastaviti da rastu (152), te je važno pronaći optimalan odnos droga/rastvarač. Uočeno je da je sa povećanjem koncentracije etanola (X2) došlo i do porasta sadržaja genciopikrozida, izogentizina i TPC. Tačnije, efekat koncentracija etanola bio je dominantan prilikom ekstrakcije izogentizina, a značajno je uticao i na TPC. Shodno tome, važno je utvrditi optimalnu koncentraciju etanola, koju je potrebno koristiti kako bi prinos ispitivanih jedinjenja bio što viši. Pored toga, primećeno je da je sa smanjenjem veličine čestica korena lincure (X3) rastao sadržaj ispitivanih bioaktivnih jedinjenja. Ovaj rezultat se može objasniti time što sa povećanjem dodirne površine između usitnjene biljne droge i rastvarača dolazi do brže difuzije bioaktivnih jedinjenja. Međutim, poznato je da rad sa sitnijim frakcijama biljne droge može uzrokovati tehničke probleme usled nakupljanja praška i agregacije čestica (153–155). Iz tog razloga, kao kompromisno rešenje, u daljem radu korišćena je biljna droga veličine čestica (stepena usitnjenosti) od 0,75 do 2 mm. Generalno, prinos bioaktivnih jedinjenja raste sa trajanjem procesa ekstrakcije, te je vreme (X4) pozitivno uticalo na prinos genciopikrozida i izogentizina. Sa druge strane, uticaj vremena na TPC je bio negativan. Ranije je primećeno da duže trajanje ekstrakcije pri visokim temperaturama može smanjiti TPC usled oksidacije, termolabilnosti ovih jedinjenja, kao i enzimske degradacije i polimerizacije nerastvornih jedinjenja (155). Pored toga, trajanje ekstrakcije utiče na potrošnju električne energije i ukupne troškove procesa. S tim u vezi u okviru faze optimizacije potrebno je odrediti minimalno vreme pogodno za dobijanje ekstrakata sa maksimalnim sadržajem genciopikrozida, izogentizina i TPC. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da

povećanje temperature (X5) pozitivno utiče na ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i fenolnih jedinjenja iz korena lincure, što se može objasniti uticajem povišene temperature na narušavanje ćelijskih struktura unutar biljnog materijala, što za posledicu ima povećanje permeabilnosti ćelijskog zida i olakšanu difuziju bioaktivnih jedinjenja (156). Međutim, poznato je da pri višim temperaturama može doći do degradacije sekundarnih metabolita, posebno polifenolnih jedinjenja. Takođe, važno je naglasiti i da je potrebno sagledati interakcije između temperature i drugih faktora, te je potrebno pronaći optimalnu temperaturu, kako bi se se istovremeno maksimizirao prinos genciopikrozida, izogentizina i TPC. Mešanje (X6) tokom procesa ekstrakcije je pozitivno uticalo na sadržaj sva tri praćena odgovora, dok je pretretman mikrotalasima (X7) negativno uticao na sadržaj genciopikrozida i izogentizina, a pozitivno na TPC. Ovi faktori su isključeni iz dalje optimizacije ekstrakcije jer su u pitanju energetski zahtevni procesi, a pokazano je da je njihov uticaj bio manje značajan u odnosu na prethodno navedene nezavisno promenljive.

Na osnovu rezultata dobijenih u toku faze skrininga, kao faktori koji su imali najveći uticaj na ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i TPC izabrani su odnos droga/rastvarač (X1), koncentracija etanola (X2), vreme ekstrakcije (X4) i temperatura (X5) i dalje su optimizovani korišćenjem metodologije površine odgovora.



Slika 21. Prikaz uticaja ispitivanih faktora (X1 – odnos droga/rastvarač, X2 – koncentracija etanola, X3 – veličina čestica, X4 – vreme, X5 – temperatura, X6 – mešanje, X7 – pretretman mikrotalasima) na ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola.

3.1.3.2 Optimizacija ekstrakcije primenom metodologija površine odgovora

3.1.3.2.1 Statistička procena modela

Primenom metode analize varijanse (ANOVA) procenjena je statistička značajnost modela dobijenih korišćenjem metodologije površine odgovora, a potom su identifikovani značajni faktori i njihove interakcije (Tabela 6). Kvadratni modeli kojima su opisani uticaji ispitivanih faktora na ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i TPC iz korena lincure bili su statistički značajni ($p < 0,05$). Koeficijent determinacije (R^2) dobijenih modela za genciopikrozid (0,85), izogentizin (0,86) i TPC (0,78) bio je relativno visok, što ukazuje na dobro uklapanje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Pored toga, *lack of fit* sva tri modela nije bio statistički značajan ($p > 0,05$), što znači da je datim modelima bilo moguće na adekvatan način predstaviti zavisnost između ispitanih faktora i odgovora.

Tabela 6. Vrednosti statističkih parametara dobijenih nakon uklapanja eksperimentalnih rezultata u kvadratne modele.

	df	Suma kvadrata	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
Genciopikrozid					
Model	7	344,40	49,20	15,20	< 0,0001
A – Temperatura	1	180,68	180,68	55,82	< 0,0001
B – Vreme	1	69,12	69,12	21,36	0,0002
C – Odnos droga/rastvarač	1	3,51	3,51	1,09	0,3105
D – Koncentracija etanola	1	12,34	12,34	3,81	0,0657
AB	1	25,53	25,53	7,89	0,0112
CD	1	37,30	37,30	11,53	0,0030
B ²	1	15,91	15,91	4,92	0,0390
Ukupna greška	19	61,49	3,24		
<i>Lack of fit</i>	17	59,70	3,51	3,92	0,2220
Eksperimentalna greška	2	1,79	0,89		
Ukupno	26	405,89			
R ²	0,85				
Izogentizin					
Model	8	135,28	16,91	14,41	< 0,0001
A – Temperatura	1	11,77	11,77	10,04	0,0053
B – Vreme	1	19,71	19,71	16,80	0,0007
C – Odnos droga/rastvarač	1	15,32	15,32	13,06	0,0020
D – Koncentracija etanola	1	59,06	59,06	50,35	< 0,0001
AD	1	5,12	5,12	4,36	0,0512
CD	1	14,96	14,96	12,75	0,0022
A ²	1	6,10	6,10	5,20	0,0350
D ²	1	5,08	5,08	4,33	0,0519
Ukupna greška	18	21,12	1,17		
<i>Lack of fit</i>	16	20,54	1,28	4,49	0,1974
Eksperimentalna greška	2	0,57	0,29		
Ukupno	26	156			
R ²	0,86				
TPC					
Model	7	376,49	53,78	9,64	< 0,0001
A – Temperatura	1	146,63	146,63	26,28	< 0,0001
B – Vreme	1	60,31	60,31	10,81	0,0039
C – Odnos droga/rastvarač	1	1,67	1,67	0,30	0,5909
D – Koncentracija etanola	1	20,65	20,65	3,70	0,0695
CD	1	48,99	48,99	8,78	0,0080
B ²	1	43,56	43,56	7,81	0,0116
D ²	1	73,36	73,36	13,15	0,0018
Ukupna greška	19	106,00	5,58		
<i>Lack of fit</i>	17	104,73	6,16	9,69	0,0975
Eksperimentalna greška	2	1,27	0,64		
Ukupno	26	482,49			
R ²	0,78				

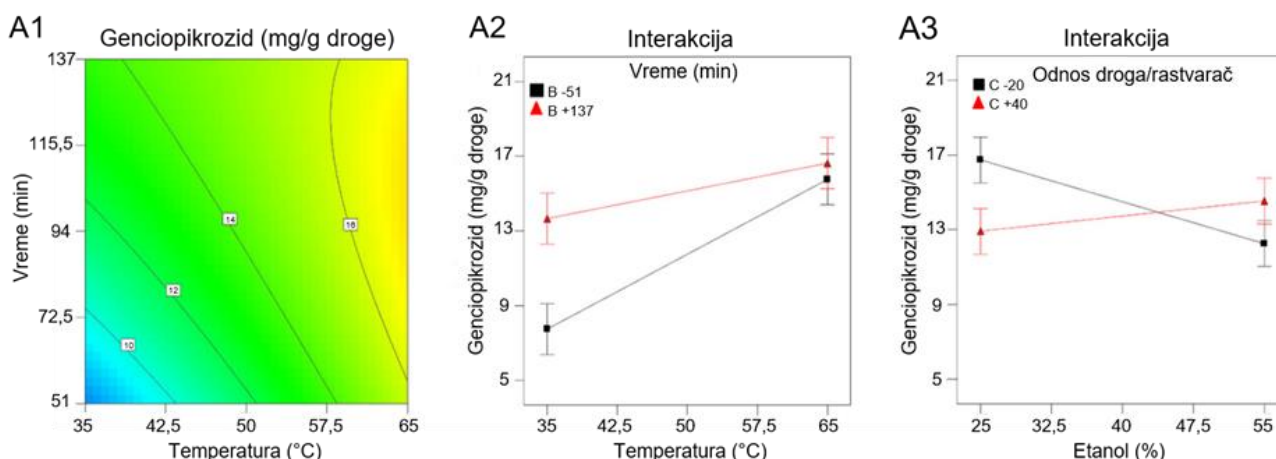
TPC – sadržaj ukupnih polifenola; R² – koeficijent determinacije.

3.1.3.2.2 Analiza uticaja ispitivanih faktora na ekstrakciju genciopikrozida

Prinos genciopikrozida bio je između 5,59 i 20,34 mg/g droge (Tabela 7). Literaturni podaci pokazuju da su ultrazvučnom ekstrakcijom korena lincure ekstrahovane uporedive količine genciopikrozida (18,47–22,92 mg/g droge) (157). Najveći sadržaj genciopikrozida postignut je korišćenjem 25 % (v/v) etanola na temperaturi od 65 °C tokom 137 minuta, dok je odnos droga/rastvarač bio 1:20 (Tabela 7). Uticaj faktora na prinos genciopikrozida grafički je prikazan na Slici 22 i opisan je sledećom matematičkom jednačinom sa kodiranim vrednostima analiziranih faktora (8):

$$\text{Prinos genciopikrozida (mg/g droga)} = 14,11 + 2,74A + 1,70B - 0,38C - 0,72D - 1,26AB + 1,53CD - 0,77B^2 \quad (8)$$

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da na ekstrahovani sadržaj genciopikrozida značajno utiču temperatura, vreme, interakcija između temperature i vremena, kvadratni efekat vremena i interakcija između odnosa droga/rastvarač i koncentracije etanola. Temperatura je imala značajan pozitivan uticaj, što je bilo u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima, budući da je pokazano da je koncentracija genciopikrozida konstantno rasla sa porastom temperature do 75 °C (158). Takođe, vreme je pozitivno uticalo na sadržaj genciopikrozida, ali je uočeno da postoji i negativan kvadratni efekat ovog parametra, što znači da suviše dugo trajanje ekstrakcije neće doprineti porastu prinosa genciopikrozida. Ovaj rezultat može biti posledica degradacije genciopikrozida pri visokim temperaturama i produženom trajanju ekstrakcije. Iako su ranije Arino i sar. (158) zaključili da postoji pozitivan uticaj vremena i temperature na prinos genciopikrozida, u njihovom eksperimentu nije bilo moguće uvideti da postoji i značajna negativna interakcija između ova dva faktora. Korišćenjem eksperimentalnog dizajna pokazano je da postoji negativna interakcija između temperature i vremena, što ukazuje na to da iako je porast temperature doprineo povećanju sadržaja ekstrahovanog genciopikrozida, pri dužem trajanju ekstrakcije pozitivan uticaj temperature je bio manje izražen. Ovi rezultati ukazuju na ograničenost univarijantnog pristupa, kojim nije bilo moguće proceniti uticaj kvadratnih efekata i interakcija između faktora. Takođe, na prinos genciopikrozida značajno je uticala pozitivna interakcija između koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač, što znači da je negativan uticaj etanola bio manje izražen kada su korišćene veće količine rastvarača.



Slika 22. A1) 2D grafik na kome su uočava uticaj temperature i vremena na ekstrakciju genciopikrozida; A2) Grafik na kome je prikazan uticaj interkcije između temperature i vremena na ekstrakciju genciopikrozida; A3) Grafik na kome je prikazan uticaj interkcije između koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na ekstrakciju genciopikrozida; Faktori koji nisu prikazani na graficima imali su vrednost koja odgovara centralnoj tački.

Tabela 7. Eksperimentalno utvrđen sadržaj genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola primenom centralnog kompozitnog dizajna.

Temperatura, A (°C)	Vreme, B (min)	Odnos droga/rastvarač, C	Etanol koncentracija, D (%)	Genciopikrozid (mg/g droge)	Izogentizin (mg/g droge)	TPC (mg GAE/g droge)
35 (-1)	51 (-1)	20 (-1)	25 (-1)	9,31	1,58	6,20
65 (1)	51 (-1)	20 (-1)	25 (-1)	17,51	3,62	8,71
35 (-1)	137 (1)	20 (-1)	25 (-1)	18,57	3,41	8,11
65 (1)	137 (1)	20 (-1)	25 (-1)	20,34	4,21	9,10
35 (-1)	51 (-1)	40 (1)	25 (-1)	7,64	1,35	8,35
65 (1)	51 (-1)	40 (1)	25 (-1)	13,59	3,68	16,15
35 (-1)	137 (1)	40 (1)	25 (-1)	10,92	2,44	14,57
65 (1)	137 (1)	40 (1)	25 (-1)	14,49	5,49	15,04
35 (-1)	51 (-1)	20 (-1)	55 (1)	8,17	3,70	11,52
65 (1)	51 (-1)	20 (-1)	55 (1)	13,14	3,86	13,94
35 (-1)	137 (1)	20 (-1)	55 (1)	14,02	5,90	10,03
65 (1)	137 (1)	20 (-1)	55 (1)	13,19	5,20	20,45
35 (-1)	51 (-1)	40 (1)	55 (1)	7,22	9,40	6,96
65 (1)	51 (-1)	40 (1)	55 (1)	17,56	8,25	13,08
35 (-1)	137 (1)	40 (1)	55 (1)	12,17	7,88	13,57
65 (1)	137 (1)	40 (1)	55 (1)	16,91	8,74	16,33
20 (-2)	94 (0)	30 (0)	40 (0)	5,59	1,34	8,57
80 (2)	94 (0)	30 (0)	40 (0)	19,16	6,05	21,49
50 (0)	8 (-2)	30 (0)	40 (0)	7,30	2,86	6,63
50 (0)	180 (2)	30 (0)	40 (0)	14,43	9,82	14,51
50 (0)	94 (0)	10 (-2)	40 (0)	13,76	4,73	20,00
50 (0)	94 (0)	50 (2)	40 (0)	16,04	6,44	15,16
50 (0)	94 (0)	30 (0)	10 (-2)	17,63	1,24	8,36
50 (0)	94 (0)	30 (0)	70 (2)	14,02	6,49	9,67
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)	13,49	5,90	14,31
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)	12,26	4,83	15,47
50 (0)	94 (0)	30 (0)	40 (0)	14,12	5,36	13,94

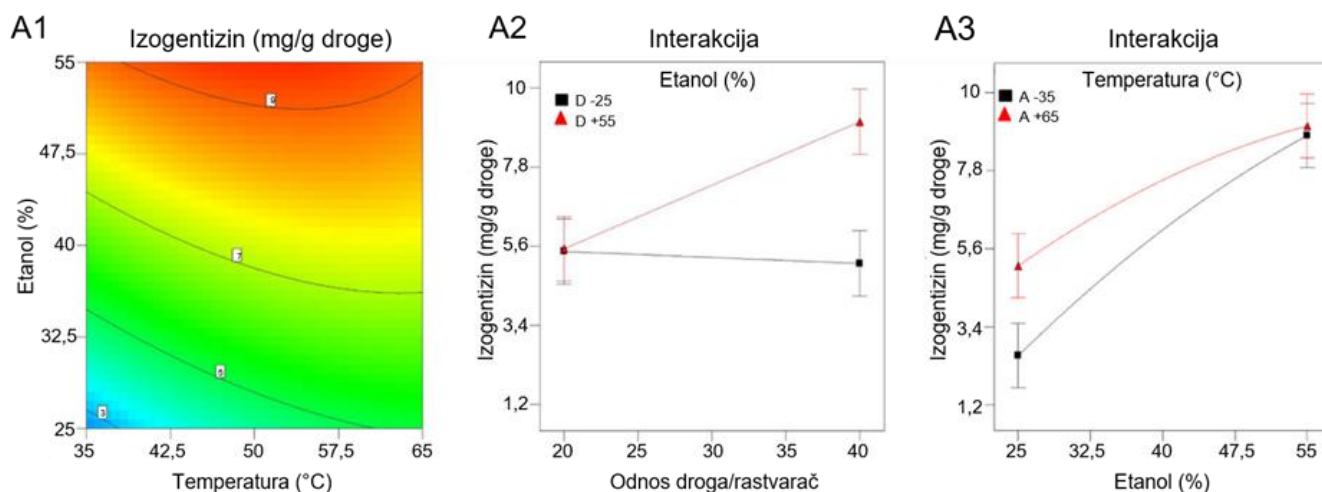
TPC – sadržaj ukupnih polifenola; GAE – ekvivalent galne kiseline.

3.1.3.2.3 Analiza uticaja ispitivanih faktora na ekstrakciju izogentizina

Rezultati pokazuju da je sadržaj izogentizina bio u rasponu od 1,24 do 9,82 mg/g droge (Tabela 7), što je između 2 i 8 puta više u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima (18,20,157,159). Najveći sadržaj izogentizina je ekstrahovan vođeno etanolnim rastvorom koncentracije 40 % (v/v) pri temperaturi od 50 °C tokom 180 minuta, a odnos droga/rastvarač je bio 1:30. Uticaj analiziranih faktora na sadržaj izogentizina grafički je prikazan na Slici 23 i opisan je navedenom jednačinom (9):

$$\text{Prinos izogentizina (mg/g droge)} = 5,78 + 0,70A + 0,91B + 0,80C + 1,57D - 0,57AD + 0,97CD - 0,49A^2 - 0,45D^2 \quad (9)$$

Na osnovu izvedene analize može se zaključiti da temperatura, vreme, odnos droga/rastvarač i koncentracija etanola pokazuju pozitivan linearan uticaj na sadržaj izogentizina. To znači da se pri ispitivanim uslovima veći prinos izogentizina može postići ekstrakcijom tokom dužeg vremenskog perioda, većom količinom rastvarača i pri višim koncentracijama etanola. Sa druge strane, negativan kvadratni efekat temperature i koncentracije etanola ukazuju da suviše visoka temperatura i koncentracija etanola ne doprinose ekstrakciji izogentizina. Takođe, literaturni rezultati pokazuju da je ekstrakcija izogentizina favorizovana pri višim koncentracijama etanola, zbog niske polarnosti ovog jedinjenja nezavisno od toga koji metod je primenjen (klasična ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija ili mikrotalasna ekstrakcija), pri čemu ekstremno visoke koncentracije etanola nisu bile adekvatne (157,160). Pored toga, značajna negativna interakcija između temperature i koncentracije etanola upućuje na to da je pozitivan uticaj koncentracije etanola bio izraženiji pri nižim temperaturama. Takođe, postoji i pozitivna interakcija između koncentracije etanola i odnosa droge i rastvarača. S tim u vezi, veći sadržaj izogentizina se može ekstrahovati upotrebom etanola veće koncentracije, pri čemu je poželjno da odnos droga/rastvarač bude što viši.



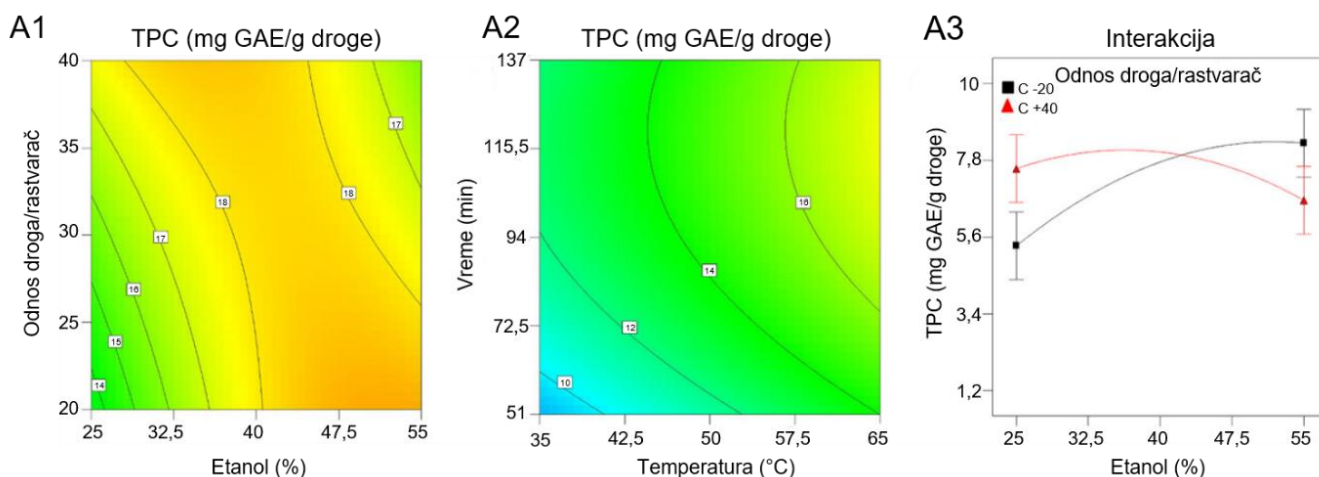
Slika 23. A1) 2D grafik na kome su uočava uticaj koncentracije etanola i temperature na ekstrakciju izogentizina; A2) Grafik na kome je prikazan uticaj interkcije između koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač na ekstrakciju izogentizina; A3) Grafik na kome je prikazan uticaj interkcije između koncentracije etanola i temperature na ekstrakciju izogentizina; Faktori koji nisu prikazani na graficima imali su vrednost koja odgovara centralnoj tački.

3.1.3.2.4 Analiza uticaja ispitivanih faktora na ekstrakciju ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola ekstrahovanih iz korena lincure bio je u opsegu od 6,20 do 21,49 mg GAE/g droge, a najveći TPC je postignut korišćenjem 40 % (v/v) etanola tokom 94 minuta na 80 °C, dok je odnos droga/rastvarač bio 1:30 (Tabela 7). Ranija istraživanja pokazuju da je 50 % (v/v) etanolnom iz korena lincure ekstrahovano 12,03 mg GAE/g droge (161), dok je u slučaju ultrazvučne ekstrakcije prinos fenolnih jedinjenja bio u opsegu od 18,0 do 38,3 mg/g droge (157). Matematički model kojim se može objasniti uticaj ispitivanih faktora na ekstrakciju polifenola prikazan je sledećom jednačinom (10) sa kodiranim vrednostima faktora:

$$TPC \text{ (mg GAE/g droge)} = 15,26 + 2,47A + 1,59B + 0,26C + 0,93D - 1,75 CD - 1,30B^2 - 1,69D^2 \quad (10)$$

Na osnovu izvedene analize može se zaključiti da temperatura u ispitivanom opsegu ostvaruje pozitivan uticaj na prinos ukupnih polifenola, što je u skladu sa Ajnštajnovom jednačinom, prema kojoj se sa povećanjem temperature povećava difuzija (153). Štaviše, poznato je da temperatura utiče na viskozitet, rastvorljivost, pritisak pare i površinski napon sistema, te doprinosi efikasnosti ekstrakcije. Takođe, povećanje vremena ekstrakcije je pozitivno uticalo na prinos ukupnih polifenola, a negativan kvadratni efekat vremena je ukazao da suviše dugo trajanje ekstrakcije nije poželjno, pri čemu je isti uticaj primećen i u ranijim istraživanjima (162). Pozitivan linearni efekat i izraženiji negativni kvadratni efekat koncentracije etanola ukazuju da je optimalna koncentracija etanola u opsegu između 40 i 55 %. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim saznanjima, s obzirom da etanol utiče na narušavanje interakcija između polifenola i strukturnih komponenti ćelijskog zida kao što su polisaharidi i proteini, čime se poboljšava efikasnost ekstrakcije polifenola (163). Sa druge strane, suviše visok udeo etanola u ekstragensu može izazvati denaturaciju proteina, a posledično povećanje viskoziteta biljnog matriksa, čime se sprečava ekstrakcija polifenolnih jedinjenja. Statistička analiza je pokazala da je prisutna i negativna interakcija između odnosa droga/rastvarač i koncentracije etanola, što sugerise da je pozitivan linearni efekat etanola izraženiji kada je odnos droga/rastvarač na nižem nivou (Slika 24).



Slika 24. A1) 2D grafik na kome je prikazan uticaj etanola i odnosa droga/rastvarač na ekstrakciju ukupnih polifenola – TPC; A2) 2D grafik na kome je prikazan uticaj temperature i vremena na ekstrakciju TPC; A3) Grafik na kome je prikazan uticaj interkcije između etanola i odnosa droga/rastvarač na ekstrakciju TPC; Faktori koji nisu prikazani na graficima imali su vrednost koja odgovara centralnoj tački.

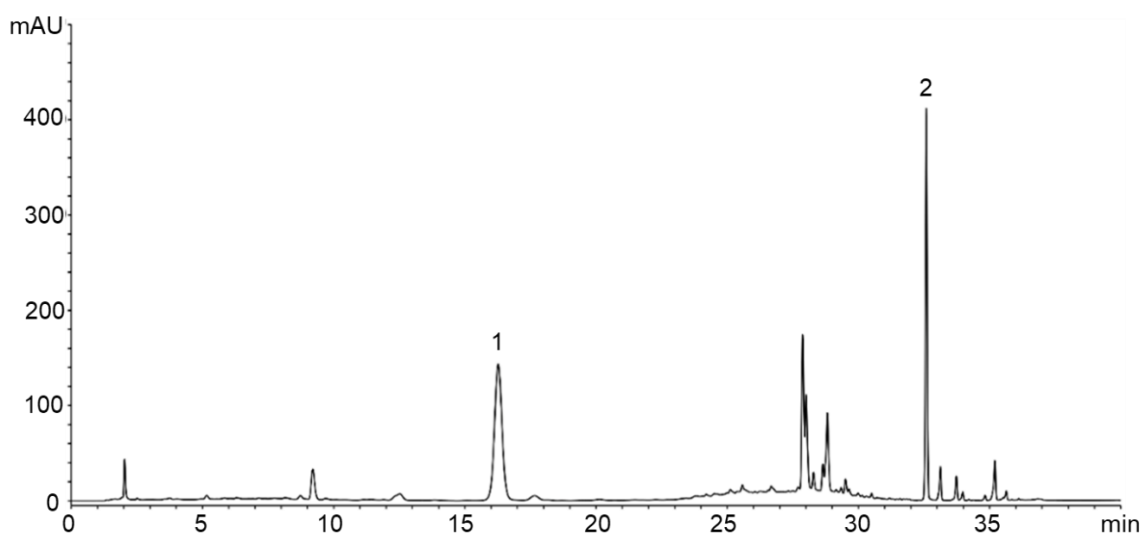
3.1.3.2.5 Optimizacija procesa ekstrakcije i validacija modela

Optimizacija procesa ekstrakcije korena lincure je izvedena sa ciljem pronalaženja odgovarajućih uslova pri kojima je moguće istovremeno postići visok prinos genciopikrozida, izogentizina i TPC. Na osnovu funkcije poželjnih odgovora zaključeno je da se ekstrakcijom pri temperaturi od 65 °C tokom 129,08 minuta, korišćenjem 49,33 % (v/v) etanola kao ekstragenta, pri odnosu droga/rastvarač 1:40 mogu istovremeno dobiti visoki prinosi genciopikrozida, izogentizina i polifenola. U cilju validacije dobijenog modela, eksperiment je izveden u pet ponavljanja, pod prethodno definisanim optimalnim uslovima, a rezultati su prikazani u Tabeli 8. Srednje vrednosti eksperimentalno dobijenih rezultata su bile bliske predviđenim vrednostima i ovi rezultati su potvrdili adekvatnost razvijenih kvadratnih modela. Pored toga, HPLC hromatogram optimalnog ekstrakta predstavljen je na Slici 25.

Tabela 8. Eksperimentalne i predviđene vrednosti dobijene korišćenjem metodologije površine odgovora (RSM) i veštačkih neuronskih mreža (ANN) u uslovima koji su procenjeni kao optimalni za ekstrakciju genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola (TPC) i sposobnost predviđanja RSM i ANN modela okarakterisana pomoću koeficijenta determinacije (R^2) i korena srednje vrednosti greške (RMSE).

	Genciopikrozid (mg/g droge)	Izogentizin (mg/g droge)	TPC (mg GAE/g droge)
Eksperimentalna vrednost	18,03 ± 2,78	8,15 ± 1,23	17,46 ± 2,45
Vrednosti predviđene RSM modelom	16,82	8,59	17,26
Vrednosti predviđene ANN modelom	15,78	8,12	16,50
R^2 (RSM)	0,85	0,86	0,78
R^2 (ANN)	0,99	0,99	0,99
RMSE (RSM)	1,80	1,08	2,36
RMSE (ANN)	0,36	0,20	0,30

GAE – ekvivalent galne kiseline.



Slika 25. Hromatogram ($\lambda = 260$ nm) optimizovanog ekstrakta, pik (1) predstavlja genciopikrozid, a pik (2) izogentizin.

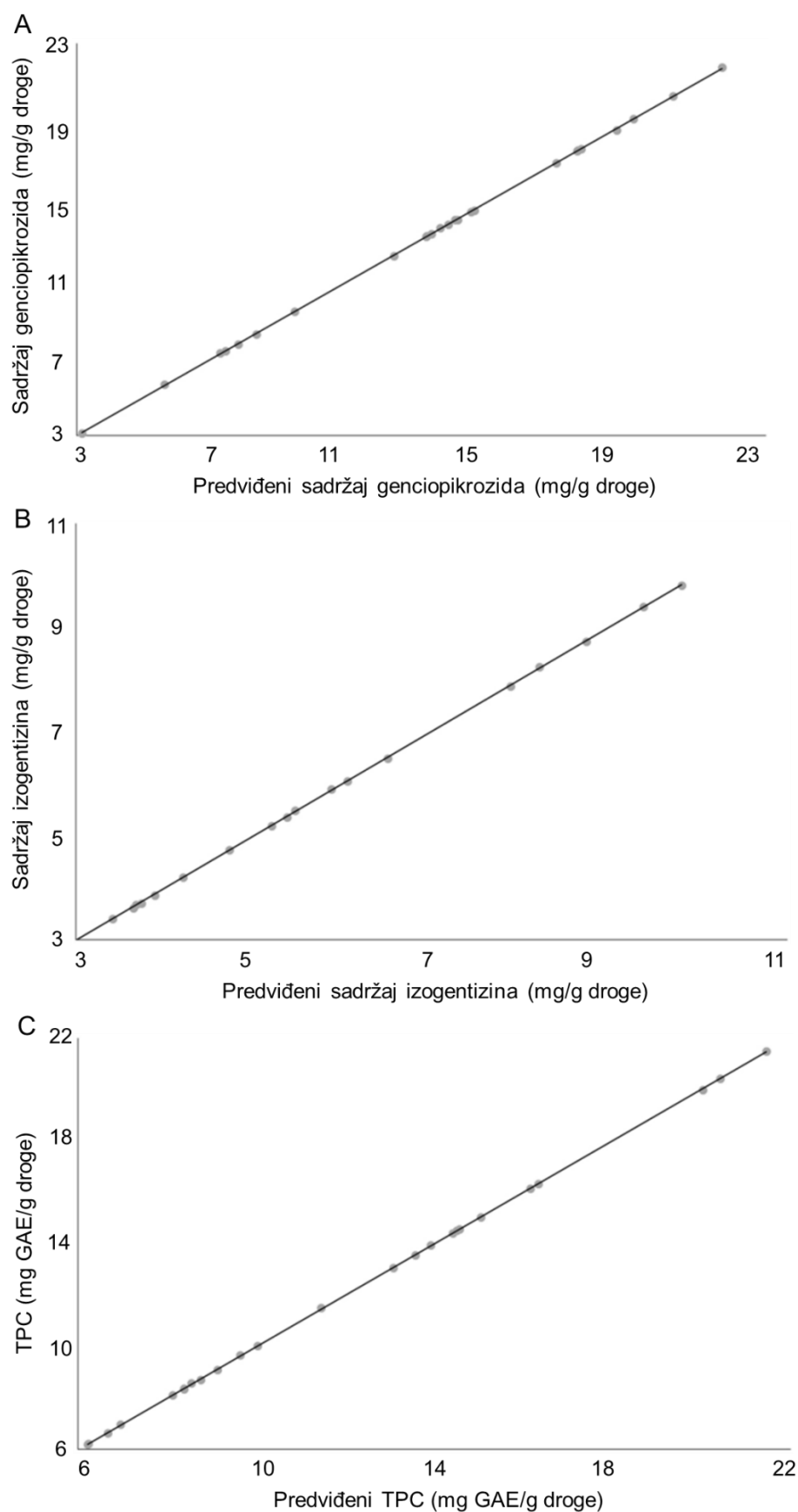
Prinosi genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola ekstrahovani pri prethodno navedenim optimalnim uslovima bili su uporedivi sa prinosima ispitivanih jedinjenja ekstrahovanih iz istog biljnog materijala primenom optimizovanog postupka ultrazvučne ekstrakcije (koncentracija etanola 49 % v/v, odnos droga/rastvarač 1:42, 80 °C, 31 minut) (157). Tačnije, na osnovu studentovog

t-testa je pokazano da nije bilo statistički značajne razlika u ekstrahovanom sadržaju genciopikrozida ($p = 0,40$), izogentizina ($p = 0,17$) i ukupnih polifenola ($p = 0,67$). Na taj način je pokazano da se primenom ultrazvučne ekstrakcije može značajno smanjiti utrošak vremena i energije. Međutim, kako se konvencionalne metode ekstrakcije znatno češće primenjuju na industrijskom nivou može se zaključiti da se visoki prinosi sekoiridoidnih i polifenolnih jedinjenja mogu ekstrahovati i konvencionalnom metodom, s tim što je trajanje ekstrakcije duže, a temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija niža nego u slučaju ultrazvučne ekstrakcije.

3.1.3.3 Modelovanje odgovara primenom veštačkih neuronskih mreža (ANN)

Odabrani ANN model, koji je imao minimalnu RMSE i maksimalni R^2 , bio je model sa 12 neurona u skrivenom sloju. Dati ANN model predviđa sadržaj genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola sa veoma visokom tačnošću, aproksimirajući eksperimentalne podatke sa vrlo malom greškom. Eksperimentalno dobijeni rezultati za genciopikrozid, izogentizin i TPC bili su u dobroj saglasnosti sa rezultatima predviđenim ANN modelom ($R^2 > 0,99$) i to je prikazano na Slici 26. Dalje, validacija je izvedena pod uslovima koji su ocenjeni kao optimalni primenom RSM. Pokazano je da su srednje vrednosti eksperimentalno dobijenih rezultata bile u bliskoj saglasnosti sa predviđenim vrednostima, te su ovi rezultati potvrdili adekvatnost razvijenog ANN modela (Tabela 8).

Sposobnost predviđanja ANN modela je bio superiorniji u odnosu na RSM modele (Tabela 8), što je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja u kojima su upoređivane sposobnosti predviđanja ova dva pristupa na primeru ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljnih izvora (164,165). Pretpostavlja se da je bolji prediktivni kapacitet ANN modela povezan sa sposobnošću predviđanja nelinearnih odnosa, dok je RSM ograničen na polinomsu regresiju drugog ili trećeg reda. Pored toga, ANN metod ne zavisi od dizajna eksperimenata i stoga je fleksibilniji u poređenju sa metodologijom površine odgovora. Takođe, ANN može predvideti više odgovora jednim modelom, dok RSM pristup podrazumeva formiranje pojedinačnih modela za svaki odgovor (162,166).



Slika 26. Poređenje između eksperimentalno utvrđenih i predviđenih vrednosti: A) genciopikrozid; B) izogentizin; C) sadržaj ukupnih polifenola – TPC. Predviđene vrednosti su dobijene korišćenjem modela razvijenog pomoću veštačkih neuronskih mreža ($n = 27$, sa 3 centralne tačke koje su pretstvljene kao srednja vrednost).

3.2 Druga faza istraživanja – Razvoj gastroretentivnog nosača sa mikroinkapsuliranim ekstraktom korena lincure

3.2.1 Materijali

Koren lincure dobijen je od Sektora proizvodnje Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (Beograd, Srbija; serija: 19910718). Gelucire® 43/01 i Gelucire® 39/01 su bili poklon uzorci Gattefosse-a (Francuska). Poliglicerol poliricinoleat je dobijen kao poklon uzorak od Palsgaard-a (Danska). Trehaloza dihidrat je nabavljen od TCI Chemicals (Japan). Span® 80 (sorbitan monooleat), Tween® 80 (polisorbat 80), Tween® 20 (polisorbat 20) i natrijum-hlorid su nabavljeni od Merck Co. (Nemačka), dok je natrijum-alginat nabavljen od Fisher Scientific (SAD), a sojin lecitin od Serva Chemical Co. (Nemačka), Sylaysia® 350 je nabavljen od Fuji Silaysia Chemical Ltd. (Japan). Za procenu mukoadhezije korišćen je mucin iz želuca svinje, tip II (Sigma-Aldrich, Kina). Sve ostale hemikalije su bile analitičkog kvaliteta, uključujući ortofosfornu kiselinu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), acetonitril (Merck, Nemačka). Ultra čista voda je pripremljena korišćenjem Milli-Q sistema za prečišćavanje (Millipore, Francuska). Standard genciopikrozida je dobijen od ChromaDex-a, SAD.

3.2.2 Metode

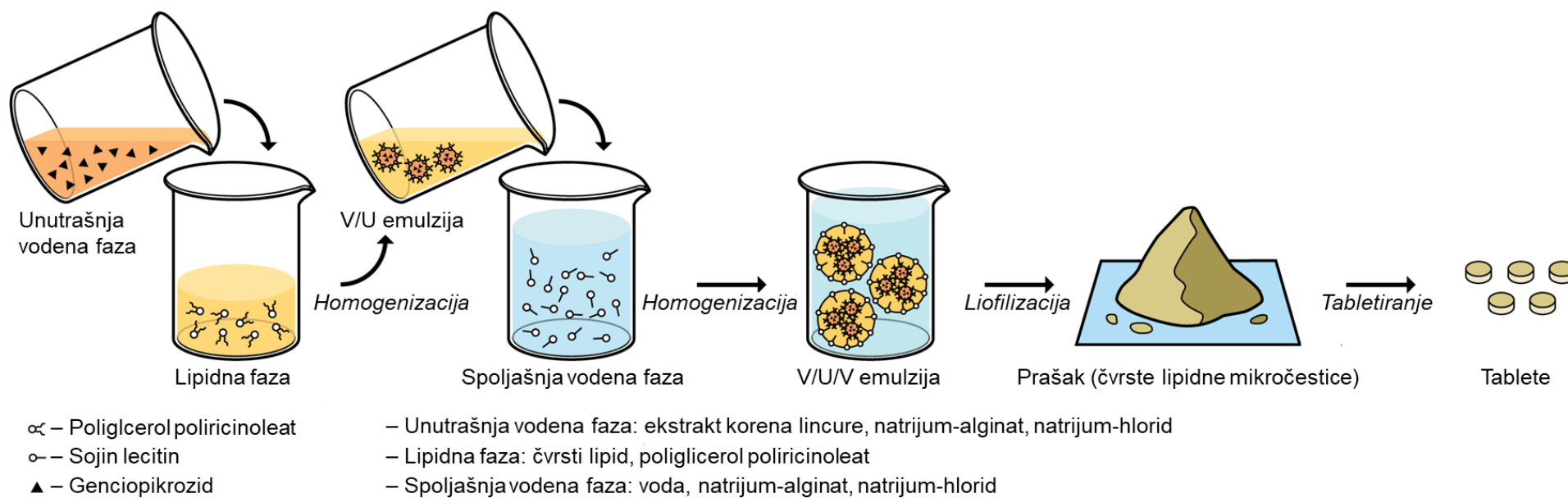
3.2.2.1 Priprema ekstrakta korena lincure

Ekstrakcija korena lincure izvedena je standardnim postupkom perkolacije, pri čemu je etanol (50 %, v/v) korišćen kao rastvarač, dok je odnos droga/rastvarač bio 1:2. Nakon toga, etanol je uparen korišćenjem rotacionog vakuumskeg uparivača (IKA® RV 05, Nemačka), a dobijeni tečni ekstrakt je filtriran i čuvan u frižideru (2–6 °C) u tamnoj boci.

3.2.2.2 Priprema dvostrukih emulzija

Dvostruke emulzije su pripremljene tehnikom dispergovanja višestrukih emulzija topljenjem, kao što je prikazano na Slici 27. Sastav primarnih emulzija prikazan je u Tabeli 9. Primarne (V/U) emulzije su pripremljene tako što je prethodno zagrejana vodena faza (ekstrakt korena lincure, natrijum-alginat i natrijum-hlorid) kap po kap dodata u otopljenu lipidnu fazu (čvrsti lipid – Gelucire® 43/01 ili Gelucire® 39/01 i lipofilni emulgator) uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici, pri brzini od 500 obr/min (IKA® RCT standard, Staufen, Nemačka). Temperatura tokom mešanja je bila viša za 5 do 10 °C od tačke topljenja lipida. U preliminarnoj studiji, kao lipofilni emulgatori korišćeni su sorbitan monooleat ili PGPR. Dobijena primarna emulzija (V/U) je homogenizovana 3 minuta pomoću rotor-stator homogenizatora (Ultra-Turrax, IKA®, Nemačka) pri brzini 15 000 obrtaja/minuti (obr/min).

U sledećem koraku, zagrejana primarna emulzija (temperatura je navedena u Tabeli 9) sa PGPR-om kao lipofilnim emulgatorom je dispergovana u spoljašnjoj vodenoj fazi, koja je sadržala hidrofilni emulgator, natrijum-alginat, natrijum-hlorid, trehalozu sa ili bez Sylaysia® 350 (Tabela 10). Temperatura emulzija sa Gelucire®-om 39/01 kao čvrstim lipidom bila je u opsegu od 44 do 49 °C, dok je temperatura emulzija sa Gelucire®-om 43/01 bila u opsegu od 48 do 53 °C. U preliminarnoj studiji kao hidrofilni emulgatori korišćeni su polisorbat 20, polisorbat 80 ili lecitin. Trehaloza je korišćena u svim formulacijama kao krioprotektant. Nakon toga, emulzija je homogenizovana (3000 obr/min), tokom 3 minuta pomoću rotor-stator homogenizatora (Ultra-Turrax, IKA®, Nemačka). Potom je formirana emulzija mešana laboratorijskom mešalicom (Heidolph RZR 2020, Heidolph Elektro GmbH & Co., Nemačka) do hlađenja.



Slika 27. Šema procesa izrade dvostrukih emulzija

Tabela 9. Sastav primarnih (V/U) emulzija – A, B, C i D

	A	B	C	D
Ekstrakt korena lincure (%)	66,5	66,5	66,5	66,5
Natrijum-alginat (%)	1,3	1,3	1,3	1,3
Natrijum-hlorid (M)	0,05	0,05	0,05	0,05
Gelucire® 39/01 (%)	26,9	26,9	/	/
Gelucire® 43/01 (%)	/	/	26,9	26,9
Poliglicerol poliricinoleat (%)	5,0	5,0	5,0	5,0

Tabela 10. Sastav dvostrukih (V/U/V) emulzija – A, B, C i D

	A	B	C	D
Primarna emulzija (%)*	19,8	19,8	19,8	19,8
Natrijum-alginat (%)	2	2	2	2
Natrijum-hlorid (M)	0,05	0,05	0,05	0,05
Lecitin (%)	1,6	1,6	1,6	1,6
Trehaloza (%)	7,9	7,9	7,9	7,9
Sylsia® 350 (%)	/	1,0	/	1,0
Prečišćena voda do (%)	100,0	100,0	100,0	100,0

*Odgovarajuća primarna emulzija označena je istim slovom kao u Tabeli 9.

3.2.2.3 Karakterizacija dvostrukih emulzija

3.2.2.3.1 Merenje električne provodljivosti

Kako bi odredili tip emulzije ispitana je električna provodljivost formulisanih sistema konduktometrom (Radiometar, Danska), 24 sata nakon pripreme emulzija na 22 ± 2 °C. Svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja.

3.2.2.3.2 Test centrifugiranja

U cilju procene fizičke stabilnosti formulisanih emulzionih sistema sproveden je test centrifugiranja. Ovaj test je izveden na laboratorijskoj centrifugi (Hermle Z206A, Labortechnik GmbH, Nemačka), pri brzini od 5000 obr/min, tokom 15 min na temperaturi 22 ± 2 °C. Nakon centrifugiranja uzorci su pregledani vizuelno kako bi se uočile eventualne promene, odnosno razdvajanje faza. Takođe, meren je sloj izdvojene faze u mm na površini uzoraka. Svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja.

3.2.2.3.3 Mikroskopska analiza

Mikroskopska analiza sprovedena je nakon razblaživanja uzoraka prečišćenom vodom korišćenjem optičkog mikroskopa, u cilju procene tipa i strukture formulisanih emulzija (Olympus® BX 41, Olympus Optical Co., Japan).

3.2.2.4. Priprema praškova

Pripremljene dvostruke emulzije (A, B, C i D) sa PGPR kao lipofilnim emulgatorom i lecitinom kao hidrofilnim emulgatorom liofilizovane su prema internom protokolu razvijenom u PVP-Centru za liofilizaciju (Valjevo, Srbija). Pored toga, tečni ekstrakt korena lincure dobijen prethodno opisanim postupkom (Poglavlje 3.2.2.1) je sušen pod istim uslovima, kako bi dobili suvi ekstrakt lincure, koji je u toku daljih istraživanja poređen sa razvijenim formulacijama. Dobijeni liofilizati su mleveni i čuvani u eksikatoru.

3.2.2.5 Karakterizacija praškova

3.2.2.5.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija suvog ekstrakta korena lincure i praškova A, B, C i D procenjena je na osnovu mikrografija dobijenih korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa JEOL JSM-6390LV (JEOL, SAD). Prethodno su uzorci naparavani zlatom (30 mA, 100 s) primenom uređaja BAL-TEC SCD005 (Leica Microsystems, Nemačka) kako bi se poboljšala njihova provodljivost tokom snimanja.

3.2.2.5.2 Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Precizno izmereni uzorci praškova A, B, C i D (80–100 mg) preneti su u normalni sud od 5 ml u koji je dodato 2 ml prečišćene vode zagrejane do 70–80 °C, a potom su u vodenom kupatilu sa ultrazvukom tretirani 30 minuta pri temperaturi od 70–80 °C, kako bi se otopile prisutne lipidne komponente. Nakon toga, uzorci su dopunjeni zagrejanom prečišćenom vodom do 5 ml i filtrirani kroz membranski filter (0,45 µm). Koncentracija genciopikrozida u uzorcima određena je HPLC metodom (poglavlje 3.1.2.6). Efikasnost inkapsulacije genciopikrozida (EE) je izračunata prema jednačini 11. Ispitivanje je vršeno u tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Grupe su poređene jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i Tukey post hoc testom, a podaci su analizirani pomoću Excel programa (verzija 2010; Microsoft, SAD).

$$EE = \frac{\text{Eksperimentalno određen sadržaj genciopikrozida}}{\text{Teorijski sadržaj genciopikrozida}} \times 100 \quad (11)$$

3.2.2.5.3 Određivanje prinosa praškova

Prinos je izračunat poređenjem mase dobijenih praškova (X) sa očekivanom masom praškova (Y), a izražen je kao procentualna vrednost u skladu sa jednačinom 12. Sadržaj čvrste materije u tečnim pomoćnim supstancama i ekstraktu korena lincure je određen merenjem suvog ostatka na analizatoru vlage (Mettler Toledo HB43-S, Australija). Svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja i rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Grupe su poređene jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i Tukey post hoc testom, a podaci su analizirani pomoću Excel programa (verzija 2010; Microsoft, SAD).

$$\text{Prinos (\%)} = \frac{X}{Y} \times 100 \quad (12)$$

3.2.2.5.4 Živina porozimetrija

Živina porozimetrija izvedena je u potpuno automatizovanom konvencionalnom aparatu Carlo Erba Porosimeter 2000 (Italija). Ispitivanje je izvedeno pri radnom pritisku od 0,1 do 200 MPa, čime se omogućava određivanje pora čiji je prečnik u intervalu od 7,5 nm do 15000 nm. Prikupljeni podaci su analizirani korišćenjem softvera Milestone 200. Merenja su obavljena u dva uzastopna ciklusa kako bi se uklonio uticaj potencijalno prisutnih interčestičnih i intračestičnih prostora, i kako bi se odredio dominantni tip pora. Uzorci su evakuisani 2 sata u dilatometru postavljenom u Macropores Unit 120.

3.2.2.5.5 Određivanje protočnosti

Protočnost praškova je procenjena izračunavanjem Hausner-ovog odnosa i indeksa kompresibilnosti (Carr-ov indeks), prema jednačinama 13 i 14 u skladu sa metodom opisanom u Ph. Eur. 11.0, pri čemu je V_0 je nasipna zapremina, a V_f tapkana zapremina određena nakon tapkanja uzorka u aparatu Stampfvolumeter, STAV 2003, Jel (Nemačka). Svaki uzorak je analiziran u tri

ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Protočnost praškova je klasifikovana prema Tabeli 11 u skladu sa Ph. Eur. 11.0 (38).

$$\text{Hausnerov odnos} = \frac{V_0}{V_f} \quad (13)$$

$$\text{Indeks kompresibilnosti} = \frac{V_0 - V_f}{V_0} \times 100 \quad (14)$$

Tabela 11. Klasifikacija protočnosti praškova na osnovu Carr-ovog indeksa i Hausner-ovog odnosa.

Carr-ov indeks (%)	Protočnost	Hausner-ov odnos
1–10	odlična	1,00–1,11
11–15	dobra	1,12–1,18
16–20	prosečna	1,19–1,25
21–25	prihvatljiva	1,26–1,34
26–31	loša	1,35–1,45
32–37	jako loša	1,46–1,59
> 38	izuzetno loša	> 1,60

3.2.2.6 Priprema tableta

Tablete čija masa je iznosila približno 100 mg su izrađene direktnom kompresijom praškova dobijenih sušenjem emulzija A, B, C i D, pomoću simulatora kompakcije (Gamlen tablet press, series D, Gamlen Tableting Ltd, Engleska) sa klipom prečnika 6 mm, ravne površine, pri brzini kompresije od 60 mm/min i vremenu zadržavanja klipa od 0,08 sekundi.

3.2.2.7 Karakterizacija tableta

3.2.2.7.1 Ispitivanje tabletabilnih svojstava

Praškovi, bez dodatka lubrikansa, su komprimovani pri različitim opterećenjima u rasponu od 30 do 150 kg, dok je brzina kompresije bila 60 mm/min, a vreme zadržavanja klipa je bilo 0,08 sekundi. U svim fazama tabletiranja (kompresija, odvajanje tablete od baze matrice i ejakcija) softver uređaja je beležio podatke na osnovu kojih su formirane krive zavisnosti sile (kompresije, odvajanja, ejakcije) od položaja/pomeranja klipa. Dobijeni podaci su korišćeni za izračunavanje σ – zatezne čvrstoće (jednačina 15), stresa pri odvajanju tablete od matrice (jednačina 16) i ejakcionog stresa (jednačina 17) (167). Čvrstina (F) i prečnik tablete (R) su mereni pomoću uređaja za ispitivanje čvrstine tableta (Erveka® TBH 125D, Nemačka). Debljina tablete (h) je merena nakon izbacivanja tablete pomoću digitalnog nonijusa preciznosti $\pm 0,05$ mm. Stres pri odvajanju tablete od baze matrice je izračunat na osnovu maksimalne sile izmerene u fazi tabletiranja (D). Ejakcioni stres je izračunat na osnovu maksimalne sile izmerene u fazi ejakcije tablete (E). Svaki uzorak, komprimovan pod određenim opterećenjem, analiziran je u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

$$\sigma \text{ (MPa)} = \frac{2 \times F}{\pi \times R \times h} \quad (15)$$

$$\text{Stres pri odvajanju tablete od matrice (MPa)} = \frac{D \times 4}{R^2 \times \pi} \quad (16)$$

$$\text{Ejakcioni stres (MPa)} = \frac{E}{R \times \pi \times h} \quad (17)$$

3.2.2.7.2 Procena mukoadhezivnosti tableta

U cilju procene mukoadhezivnosti formulisanih tableta merena je sila potrebna za odvajanje tableta mase 100 mg od mucinskog diska (250 mg). Ovo merenje je vršeno korišćenjem analizatora tekture Shimadzu EZ-LX (Shimadzu Corporation, Japan). Mucinski diskovi su pripremljeni kompresijom komercijalno dostupnog mucina izolovanog iz želuca svinja (250 mg), korišćenjem klipa čiji je prečnik 13 mm. Nakon toga, mucinski disk je držan 4 minuta u medijumu (0,1 M HCl; 2,5 ml), koji je bio zagrejan na 37 °C. Pre analize, ispitivana tableta je zalepljena na gornju sondu, dok je mucinski disk pričvršćen za površinu platforme pomoću cijanoakrilatnog lepka. Potom je primenjena sila od 0,5 N tokom 60 sekundi da bi se obezbedio blizak kontakt između tablete i mucinskog diska, pri čemu je brzina pre kontakta (engl. *pre-test speed*) bila 1 mm/s, dok su brzina tokom kontakta (engl. *test speed*) i brzina nakon kontakta (engl. *post-test speed*) iznosile 0,5 mm/s. Mukoadhezivnost je procenjivana na osnovu merenja sile adhezije (sile potrebne da se tableta odvoji od mucinskog diska), koja je određena na osnovu dobijenih kriva zavisnosti sile od vremena. Studija je sprovedena u 5 ponavljanja za svaku formulaciju i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Grupe su poređene jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), te Tukey post hoc testom, a podaci su analizirani pomoću Excel programa (verzija 2010; Microsoft, SAD).

3.2.2.7.3 Ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida

U okviru ovog testa ispitana je brzina oslobađanja (rastvaranja) genciopikrozida (marker jedinjenja u ekstraktu korena lincure) iz formulisanih praškova (A – D), tableta (A – D) i liofilizovanog ekstrakta lincure. Navedeni uzorci su ispitani korišćenjem aparature sa protočnom ćelijom (CE7 smart, Sotax, Švajcarska) na $37 \pm 0,5$ °C, pri brzini protoka od 8 ml/min, tokom 6 sati. Kao medijum je korišćena 0,1 M HCl (pH 1,2). Uzorkovaje je vršeno u unapred definisanim vremenskim tačkama, tj. nakon 15, 45, 90, 150, 240 i 360 minuta, pri čemu je odmah vršena nadoknada medijuma. Za svaku formulaciju tableta, tri filtrirana uzorka jednakih zapremina su spajana i korišćeni su kao zbirni uzorak (engl. *pooled sample*) u skladu sa procedurom za ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja aktivnih komponenti iz biljnih proizvoda, koja je navedena u Farmakopeji Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Pharmacopeia*) (168). Koncentracija rastvorenog (oslobođenog) genciopikrozida u tako pripremljenim uzorcima određena je HPLC metodom, koja je ranije opisana (poglavlje 3.1.2.6). Rezultati su prikazani kao kumulativna količina genciopikrozida koja je rastvorena u medijumu, izražena kao procenat u odnosu na ukupnu količinu (sadržaj) genciopikrozida koji je bio prisutan u uzorcima.

Faktor sličnosti (f_2) računat prema jednačini 18, korišćen je kako bi se statistički procenila razlika između profila brzina oslobađanja ispitivanih uzoraka. Vrednost f_2 manja od 65 ukazuje da su profili značajno različiti, dok vrednost f_2 u opsegu od 65 do 100 ukazuje na sličnost između profila od preko 95 % (169).

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^t (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (18)$$

U prikazanoj jednačini n je broj uzorkovanja, R_t i T_t predstavljaju procenat rastvorenog genciopikrozida nakon vremena t , u slučaju referentnog i ispitivanog uzorka, navedenim redosledom.

3.2.2.7.4 Analiza kinetike oslobađanja genciopikrozida

Kinetika oslobađanja genciopikrozida je analizirana korišćenjem podataka dobijenih ispitivanjem *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz formulisanih tableta. Modeli u koje je vršeno uklapanje (fitovanje) podataka prikazani su u Tabeli 12. Model koji najbolje opisuje kinetiku oslobađanja genciopikrozida iz razvijenih formulacija izabran je na osnovu najviše vrednosti koeficijenta determinacije (R^2). Pored toga, izračunat je i eksponent modela (n), na osnovu koga se može pretpostaviti mehanizam oslobađanja (Tabeli 13).

Tabela 12. Jednačine kinetičkih modela.

Model	Jednačina	Parametri
Kinetika nultog reda	$F = K_0 \times t$	F – količina lekovite supstance nakon vremena t;
Kinetika prvog reda	$F = 100 \times [1 - \text{Exp}(-K_1 \times t)]$	K ₀ , K ₁ , K _h , K _p – konstante brzine oslobađanja odgovarajućeg modela;
Higuchi	$F = K_h \times t^{1/2}$	t – vreme;
Korsmeyer-Peppas	$F = K_p \times t^n$	n – eksponent modela, ukazuje na mehanizam oslobađanja.

Tabela 13. Procena mehanizma oslobađanja aktivne supstance iz sistema sa geometrijom cilindra razmatranjem vrednosti eksponenta modela (n).

Eksponent modela	Mehanizam oslobađanja
$n < 0,45$	Kvazi <i>Fick</i> -ova difuzija ili <i>Case I transport</i>
$n = 0,45$	<i>Fick</i> -ova difuzija, difuzioni mehanizam
$0,45 < n < 0,89$	Anomalni transport (<i>non-Fickian</i> difuzija), difuzija i relaksacija (erozija) istovremeno zastupljeni
$n = 0,89$	<i>Case II transport</i> , kinetika nultog reda
$n > 0,89$	<i>Super Case II transport</i> , relaksacija odnosno erozija

3.2.2.7.5 Procena disperzibilnosti tokom *in vitro* oslobađanja

U cilju procene disperzibilnost tabletiranih praškova (A, B, C i D) u uzorcima prikupljenim na početku (15 minuta) i na kraju (6 sati) ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida meren je hidrodinamički prečnik (z-ave) i raspodela veličine asocijata, izražena kao indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PdI), korišćenjem fotonske korelacione spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS). Uzorci su analizirani korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) sa integrisanim He-Ne laserom na 633 nm, pod uglom rasipanja svetlosti od 90 °C. Merenja su vršena na temperaturi $20 \pm 0,1$ °C.

3.2.3 Rezultati i diskusija

3.2.3.1 Razvoj dvostrukih emulzija

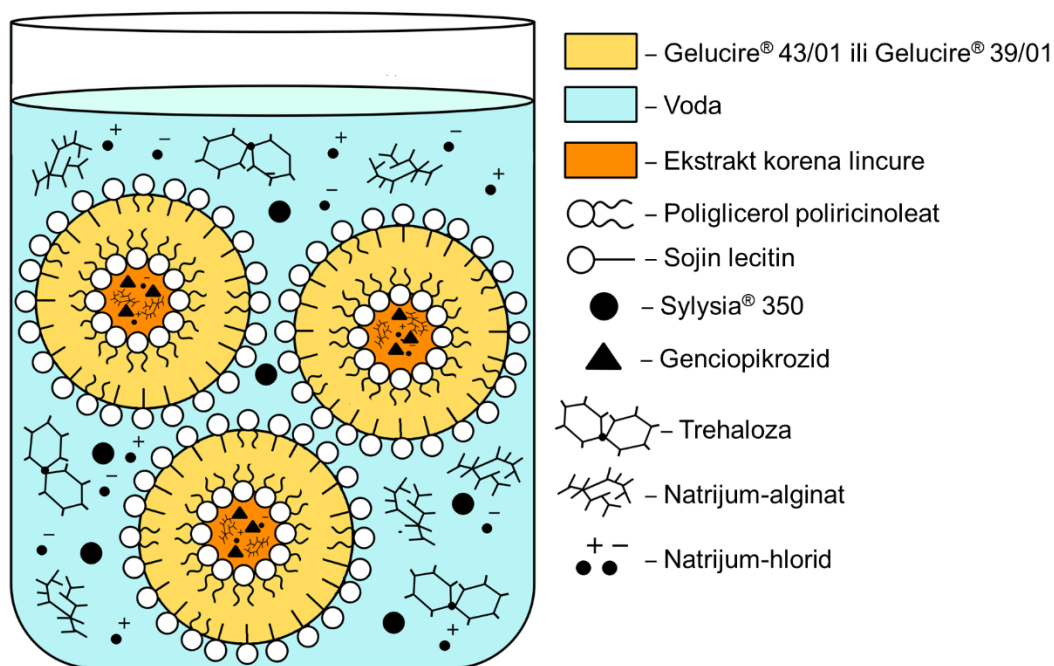
Razvoj dvostrukih (V/U/V) emulzija predstavlja izazovan zadatak zbog njihove niske termodinamičke stabilnosti (170), kao i ograničenosti po pitanju izbora emulgatora koji se mogu koristiti u slučaju dijetetskih suplemenata i farmaceutskih preparata namenjenih za peroralnu primenu (171). Pored toga, u okviru ovog istraživanja, pri izboru pomoćnih supstanci treba imati na umu da formulisane višestruke emulzije predstavljaju međuproizvod koji treba da omogući formiranje gastroretentivnih nosača.

Čvrsti lipidi, Gelucire® 43/01 i Gelucire® 39/01 izabrani su kao potencijalne komponente masne faze, s obzirom da imaju nisku temperaturu topljenja (približno 43 °C i 39 °C, navedenim redosledom), te se inkapsulacija ekstrakta lincure može vršiti na relativno niskim temperaturama, pri čemu se zbog niske gustine i lipofilnog karaktera uspešno koriste u formulaciji gastroretentivnih nosača (172,173). Pored toga, literaturni podaci ukazuju da lipidi Gelucire® 43/01 i Gelucire® 39/01, zbog toga što predstavljaju smešu mono-, di- i triglicerida mogu da utiču na povećanje apsorpcije bioaktivnih jedinjenja, tako što podstiču kontakt između bioaktivnih jedinjenja i intestinalnih membrana i doprinose formiranju hilomikrona (174).

Sorbitan monooleat je široko korišćen niskomolekularni lipofilni emulgator, međutim formulacije u kojima je bio prisutan u koncentraciji od 5 % nisu bile stabilne, tj. uočeno je razdvajanje faza već nakon manje od 5 minuta. Sa druge strane, V/U emulzije sa PGPR-om u istoj koncentraciji (5 %) bile su stabilne tokom jednog meseca skladištenja na sobnoj temperaturi. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima, jer je pokazano da su sa PGPR-om, zbog izraženije hidrofobnosti u odnosu na sorbitan monooleat, formulisane emulzije značajno uže raspodele veličine kapi, kao i da je bilo moguće sprečiti koalescenciju i dobiti stabilne V/U emulzije (171). Stoga, PGPR je izabran kao odgovarajući emulgator za stabilizaciju primarne (V/U) emulzije.

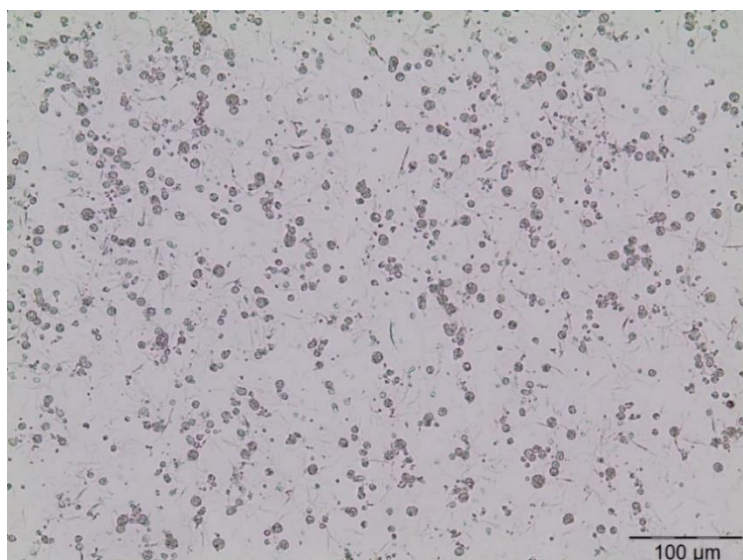
Pored toga, prisustvo biopolimera kao što je natrijum-alginat u unutrašnjoj vodenoj fazi obezbeđuje formiranje viskoelastične barijere usled interakcije između polisaharida i lipofilnog emulgatora, čime se sprečava koalescencija (171). Takođe, termodinamička stabilnost primarne emulzije može se poboljšati dodatkom elektrolita kao što je natrijum-hlorid, jer se na taj način smanjuje intenzitet privlačnih sila među kapima, kao i površinski napon, a samim tim redukuje se i frekvencija sudara, što utiče na smanjenje veličine kapi emulzije. Iz navedenih razloga su u unutrašnju vodenu fazu dodati natrijum-alginat (1,3 %) i natrijum-hlorid (0,05 M) (175,176). Kako bi osmotski pritisak u primarnoj (V/U) i sekundarnoj (V/U/V) emulziji bio jednak i da bi se izbegla difuzija između unutrašnje i spoljašnje vodene faze, natrijum-hlorid i natrijum-alginat su u istoj koncentraciji dodati i u spoljašnju vodenu fazu.

U cilju odabira optimalnog hidrofilnog emulgatora pripremljene su dvostruke emulzije sa polisorbatom 80, polisorbatom 20 i lecitinom. Odmah nakon pripreme, u emulzijama sa polisorbatom 80 i polisorbatom 20 došlo je do evidentnog razdvajanja faza. S druge strane, dvostruke emulzije sa lecitinom (uzorci A – D) bile su stabilne tokom nedelju dana skladištenja u frižideru. Treba napomenuti da je u spoljašnju vodenu fazu formulacija sa Gelucire®-om 43/01 i Gelucire®-om 39/01 dodat visoko porozni adsorbens na bazi silicijum-dioksida (Sylysia® 350) u niskoj koncentraciji (1 %) u cilju analize uticaja ovog ekscipijensa na karakteristike ispitivanih nosača. Šematski prikaz formulisanih dvostrukih emulzija predstavljen je na Slici 28.



Slika 28. Šematski prikaz pripremljenih dvostrukih emulzija.

Emulzije A – D su bile žute i homogene i nije bilo promena u konzistenciji i homogenosti. Pored toga, nije došlo do razdvajanje faza ni nakon testa centrifugiranja. Provodljivost ispitivanih emulzija A ($4,03 \pm 0,24 \mu\text{S/cm}$), B ($4,28 \pm 0,31 \mu\text{S/cm}$), C ($4,53 \pm 0,18 \mu\text{S/cm}$) i D ($4,77 \pm 0,13 \mu\text{S/cm}$) ukazuje na to da je spoljašnja faza formulisanih emulzija bila vodena. Naime, poznato je da se provodljivošću većom od $1 \mu\text{S/cm}$ karakterišu emulzije tipa U/V ili V/U/V (177). Na osnovu mikrografija prikazanih na Slici 29, ispitivane emulzije sa Gelucire[®]-om 43/01 i Gelucire[®]-om 39/01 kao čvrstim lipidima, kao i sa ili bez Sylsia[®] 350 okarakterisane su kao dvostruke (V/U/V) emulzije sa složenom unutrašnjom strukturom tj. emulzije tipa mikrosfere (tip C). Poznato je da na tip dvostruke emulzije značajno utiče tip hidrofilnog emulgatora i koncentracija hidrofobnog emulgatora. Tačnije, emulzije sa višom koncentracijom hidrofobnog emulgatora su najčešće dvostruke emulzije tipa mikrosfere, koje su prepoznate kao stabilne emulzije sa visokom efikasnošću inkapsulacije (139,178).

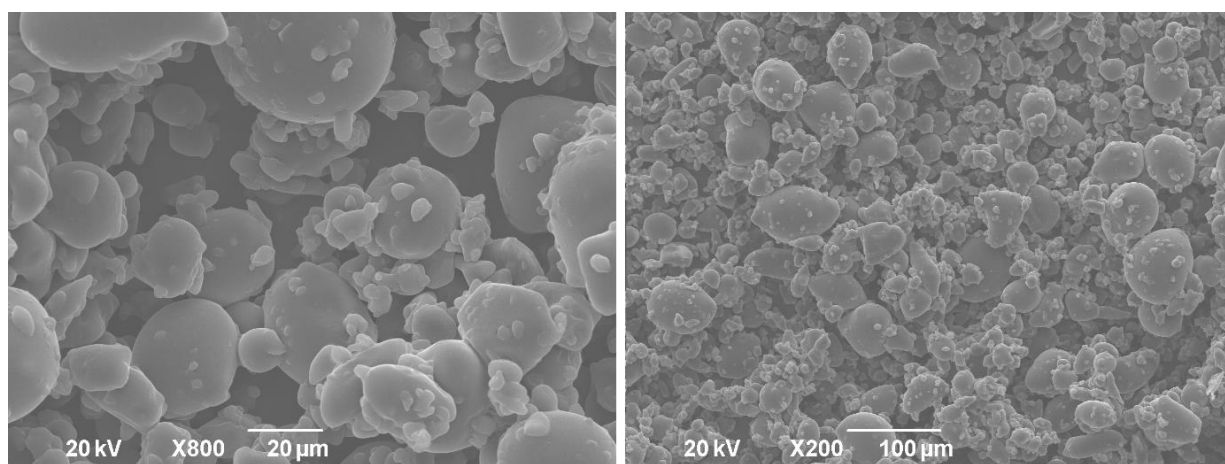


Slika 29. Mikrografija emulzije D.

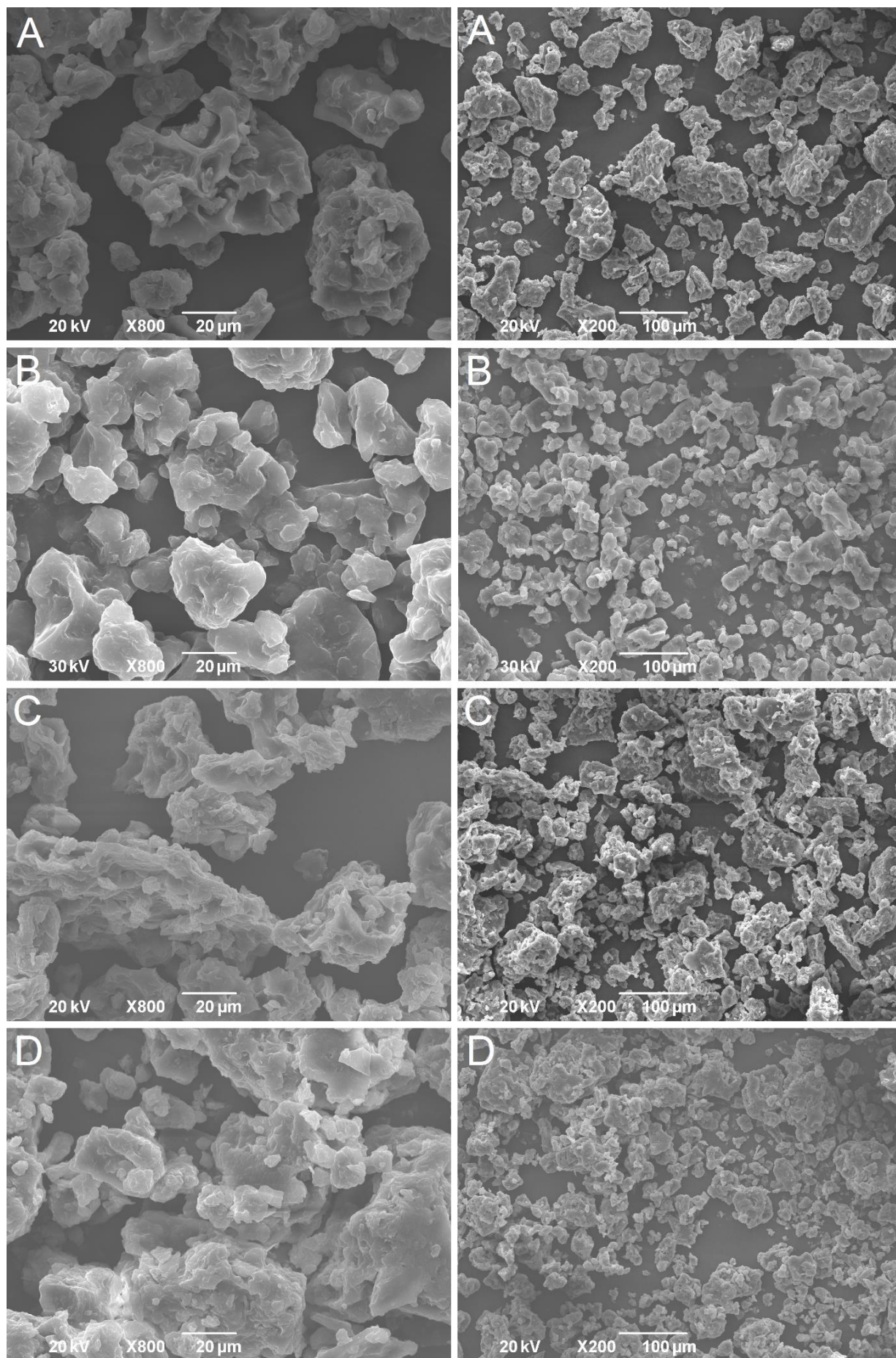
3.2.3.2 Karakterizacija praškova

3.2.3.2.1 Morfologija

Prašak dobijen sušenjem ekstrakta korena lincure bio je tamno žute boje, izrazito higroskopan, te je tokom čuvanja već nakon mesec došlo do tamnjenja i stvaranja aglomerata. Na SEM mikrografijama ovog praška se uočavaju sferične čestice neujednačene veličine, pri čemu porozna struktura nije primećena (Slika 30). Sa druge strane, praškovi dobijeni nakon liofilizacije dvostrukih emulzija bili su homogeni i žuti tokom više od godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Na osnovu SEM mikrografija prikazanih na Slici 31 utvrđeno je da je prašak imao amorfnu strukturu, pri čemu su čestice imale oblik nalik na pahuljice različitih veličina. Ovaj oblik se često sreće kod mikročestica dobijenih postupkom liofilizacije koje su naknadno podvrgavaju mlevenju (179). Veličina (prečnik) čestica, čak i uz izvesnu agregaciju, bila je ispod 1000 μm , što ukazuje da su formulisane čvrste lipidne mikročestice. Pri većim uvećanjima uočava se porozna struktura čestica, a ranija istraživanja su pokazala da se pore u mikročesticama mogu formirati usled sublimacije kristala leda tokom liofilizacije (180).



Slika 30. SEM mikrografije praškova ekstrakta korena lincure dobijenog nakon procesa liofilizacije.



Slika 31. SEM mikrofografije praškova A – D.

3.2.3.2.2 Prinos i efikasnost inkapsulacije

Prinos čvrstih lipidnih mikročestica bio je veoma visok kod svih ispitivanih formulacija (A – D). Pored toga, efikasnost inkapsulacije svih formulacija bila je veoma visoka. Rezultati pokazuju da je preko 95 % genciopikrozida inkorporirano u čvrste lipidne mikročestice (Tabela 14). Može se zaključiti da iako se navodi da je genciopikrozid nestabilno jedinjenje (30), nije došlo do njegove degradacije tokom izrade čvrstih lipidnih mikročestica. Zhang i sar. (181) su inkorporirali genciopikrozid i oleanolnu kiselinu u nanostrukturirane lipidne nosače, ali je ukupna efikasnost inkapsulacije (48,34 %) bila značajno niža. Pored toga, literaturni podaci pokazuju da je genciopikrozid inkapsuliran u PLGA nanosfere i m-PEG/PVP nanovlakna, a efikasnost inkapsulacije iznosila je 55,78–87,99 % i 85,52 %, navedenim redosledom (182,183). Iako su u okviru dosadašnjih istraživanja razmatrane mikro/nanočestice u koje je inkapsuliran genciopikrozid, nema podataka o farmaceutsko-tehnološkim i fizičko-hemijskim osobinama sistema u koje je inkapsuliran ekstrakt korena lincure, a poznato je da je bioraspoloživost genciopikrozida dva puta veća kada se primenjuje ekstrakt korena lincure nego izolovano jedinjenje (33).

Shodno tome, čvrste lipidne mikročestice sa Gelucire®-om 43/01, kao i sa Gelucire®-om 39/01 mogu se smatrati adekvatnim nosačima za inkapsulaciju ekstrakta korena lincure, tj. hidrofilnih bioaktivnih jedinjenja kao što je genciopikrozid. Pored toga, pokazano je da je moguća priprema višestrukih emulzija sa navedenim čvrstim lipidom, što otvara nove mogućnosti za inkapsulaciju hidrosolubnih jedinjenja i ekstrakata, a kako je njihova temperatura topljenja relativno niska predstavljaju pogodne lipide i u slučaju termolabilnih supstanci. Takođe, novija istraživanja pokazuju da se sa Gelucire®-om kao lipidnom komponentom mogu formulisati čvrste lipidne nanočestice, koje karakteriše visoka efikasnost inkapsulacije. Smatra se da se visoka efikasnost inkapsulacije može dovesti u vezu sa heterogenim sastavom Gelucire®-a, usled čega dolazi do formiranja nesavršenosti u strukturi kristalne rešetke, čime se ostavlja veći prostor za inkorporiranje aktivne supstance (184).

Literaturni podaci pokazuju da se postupkom dispergovanja višestrukih emulzija topljenjem karnauba voska mogu dobiti mikročestice koje su se odlikovale visokom efikasnošću inkapsulacije (iznad 80 %) pseudoeferin hidrohlorida, aktivne supstance sa dobrom rastvorljivošću (185). Time je pokazano da je ova metoda vrlo pogodna za inkapsuliranje hidrofilnih aktivnih supstanci u čvrste lipidne mikročestice bez upotrebe organskog rastvarača. S druge strane, Peres i sar. (145) su istom metodom inkapsulirali takođe hidrofilnu supstancu u čvrste lipidne nanočestice, ali je efikasnost enkapsulacije bila niža (63 %). U oba navedena slučaja lipidne mikro/nano čestice su dobijene naglim hlađenjem V/U/V emulzija u većoj količini vode, što je moglo da dovede do smanjenja sadržaja hidrofilnih supstanci tokom ovog procesa i posledičnog smanjenja efikasnosti inkapsulacije.

Prikazani rezultati ukazuju da se visoka efikasnost inkapsulacije ekstrakta korena lincure, tj. genciopikrozida kao marker jedinjenja može postići izborom odgovarajućeg sastava V/U/V emulzije i izborom adekvatne metode. Pored toga, dobijeni rezultati sugerišu da je prisustvo silicijum-dioksida (Sylsia® 350) u formulisanim praškovima dodatno doprinelo unapređenju efikasnosti inkapsulacije genciopikrozida, s obzirom da su formulacije B i D okarakterisane efikasnošću inkapsulacije koja iznosi približno 100 %.

Tabela 14. Prinos i efikasnost inkapsulacije (EE) genciopikrozida u praškovima A, B, C i D

Uzorak	A	B	C	D
EE (%)	98,92 ± 1,06 ^a	103,02 ± 0,15 ^{ab}	98,77 ± 4,28 ^a	104,32 ± 0,16 ^b
Prinos (%)	92,05 ± 1,48 ^a	95,17 ± 1,03 ^a	91,85 ± 2,03 ^a	93,57 ± 1,87 ^a

Različita slova u istom redu označavaju statističku značajnost na nivou $p < 0,05$ (Tukey test).

3.2.3.2.4 Poroznost

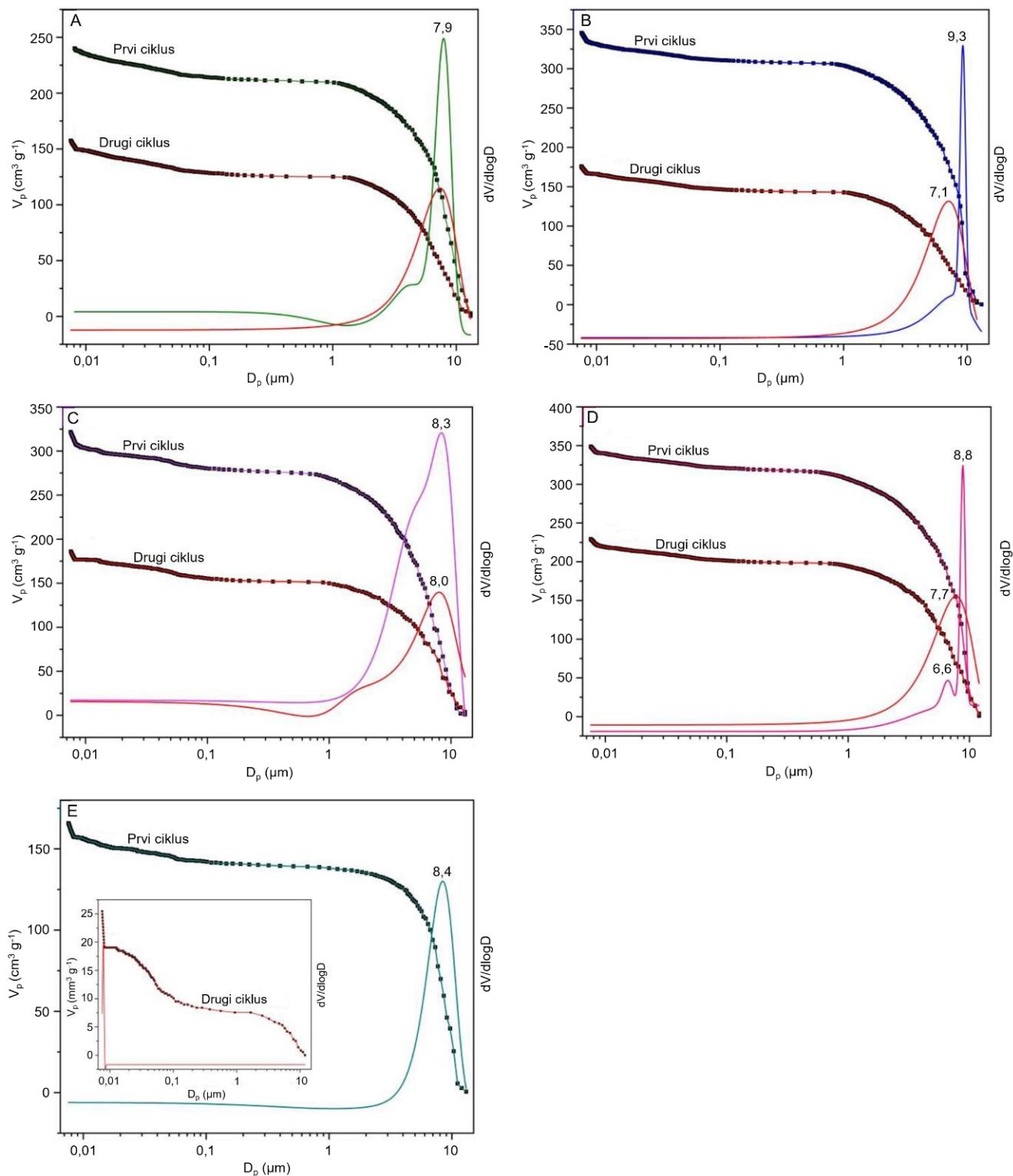
Poroznost predstavlja jednu od bitnih karakteristika gastroretentivnih praškova, jer je pokazano da porozne mikročestice mogu da flotiraju, usled niske gustine, što dovodi do produženog zadržavanja u želucu (186). Iz tog razloga živinom porozimetrijom procenjen je porozitet, ukupna zapremina pora, prosečan dijametar pora, *bulk* gustina, kao i specifična površina praškova čvrstih lipidnih mikročestica (A, B, C i D) i suvog ekstrakta lincure (Tabela 15).

Tabela 15. Ukupna zapremina pora (V_{tot}), specifična površina (S_{Hg}), prosečan dijametar pora (D_{av}), *bulk* gustina (BD), porozitet (P) praškova čvrstih lipidnih mikročestica (A, B, C i D) i suvog ekstrakta korena lincure.

Uzorak	Ciklus	V_{tot} (cm ³ /g)	S_{Hg} (m ² /g)	D_{av} (μm)	BD (g/cm ³)	P (%)
A	I	0,24	6,4	9,78	1,03	24,7
	II	0,16	8,2	9,78	1,03	16,2
B	I	0,35	11,2	9,78	0,95	32,8
	II	0,18	8,6	9,00	0,95	16,7
C	I	0,32	13,3	6,29	0,93	29,9
	II	0,19	8,1	9,78	0,93	17,3
D	I	0,35	8,3	9,0	0,93	32,4
	II	0,23	8,3	9,0	0,93	21,3
Ekstrakt korena lincure	I	0,17	7,6	9,8	1,22	20,2
	II	0,03	4,5	0,01	1,22	3,10

Raspodela veličina pora prikazana je na Slici 32. Najveću gustinu (engl. *bulk density*) je imao suvi ekstrakt korena lincure (1,22 g/cm³), dok je gustina formulisanih čvrstih lipidnih mikročestica bila niža (0,93–1,03 g/cm³). Posledično, praškovi A – D su plutali na površini mobilne faze (0,1 M HCl), dok je suvi ekstrakt korena lincure bio rastvoren gotovo trenutno nakon kontakta sa medijumom. Generalno, praškovi čija je gustina niža od gustine želudačne tečnosti (1,004 g/cm³) mogu se smatrati flotirajućim sistemima (88). Manja *bulk* gustina praškova A – D može se dovesti u vezu sa njihovim sastavom i poroznošću. Naime, Gelucire® 43/01 (stvarna gustina 0,0856 g/cm³) i Gelucire® 39/01 su čvrsti lipidni ekscipijensi niske gustine, a čvrste lipidne mikročestice su u svom sastavu imale približno 20 % jednog od navedenih ekscipijenasa (172,173). Pored toga, na SEM mikrofografijama (Slika 32) je uočeno da čvrste lipidne mikročestice karakteriše površinska poroznost, a ovaj rezultat je potvrđen i živinom porozimetrijom. Poroznost čvrstih lipidnih mikročestica u prvom ciklusu bila je u rasponu od 24,7 % do 32,8 %, dok je poroznost utvrđena u drugom ciklusu bila niža i varirala je u rasponu od 16,2 % do 21,3 %. Evidentno je da se u drugom ciklusu zapremina utisnute žive smanjila, što može ukazati na intračestičnu poroznost i/ili na prisustvo posebnog tipa pora u literaturi poznatih kao bočica sa mastilom (engl. *ink bottle-shaped*) (187). Karakteristično je da se pore ovog oblika ne mogu isprazniti tokom faze ekstruzije u okviru prvog ciklusa, te prostor ostaje ispunjen živom i nedostupan je tokom drugog ciklusa intruzije. Dalje, na osnovu raspodele veličina pora (Slika 32) može se zaključiti da je kod svih uzoraka prisutna unimodalna raspodela pora, čija veličina je bila u opsegu od 7,9 μm do 9,3 μm, što odgovara prečniku makropora. Najveća poroznost nakon prvog ciklusa uočena je u slučaju formulacija B i D, koje su u svom sastavu imale 1 % Sylysia® 350, ekscipijensa sa visokom poroznošću (188).

Formulacija D je okarakterisana najvećom poroznošću u drugom ciklusu i najmanjom *bulk* gustinom ($0,93 \text{ g/cm}^3$). Sa druge strane, poroznost suvog ekstrakta korena lincure izračunata nakon drugog ciklusa bila je značajno niža (3,1 %) nego nakon prvog (20,2 %), što ukazuje na izraženu interčestičnu poroznost karakterističnu za praškove. Takođe, SEM mikrografijama potvrđeno je da suvi ekstrakt korena lincure nije imao poroznu strukturu (Slika 30).



Slika 32. Krive raspodele veličine pora uzoraka A, B, C, D, E (suvi ekstrakt korena lincure).

3.2.3.2.5 Protočnost

Tokom proizvodnje tableta i kapsula, kao i drugih čvrstih farmaceutskih oblika neophodno je obezbediti neprekidan i ravnomeran protok praškova kako bi punjenje bilo precizno i ujednačeno punjenje, a doziranje tačno. Iz tog razloga, protočnost dobijenih praškova procenjena je izračunavanjem *Carr*-ovog indeks (indeks kompresibilnosti) i *Hausner*-ovog odnosa. Rezultati prikazani u Tabeli 16 ukazuju da praškovi A, B, C i D poseduju dobru do odličnu protočnost prema klasifikaciji navedenoj u Ph. Eur. 11.0 (38). Sa druge strane, suvi ekstrakt korena lincure imao je lošiju protočnost. Stoga, inkapsulacijom ekstrakta korena lincure u čvrste lipidne mikročesice poboljšana je protočnost ovog ekstrakta.

Formulacije A i C (bez Sylsya[®] 350) su pokazale bolju protočnost u odnosu na formulacije istog sastava koje su sadržale 1% Sylsya[®] 350 (B i D). Isti trend je primećen u slučaju dodavanja koloidnog silicijum-dioksida (Aerosil[®]) čvrstoj disperziji Gelucire[®] 44/14 i kurkumina (189). Sa druge strane, pri visokim udelima Sylsya[®] 350 je doprinela poboljšanju protočnosti čvrstih disperzija sa Gelucire[®]-om 50/13 i Poloxamer[®]-om 188 (190).

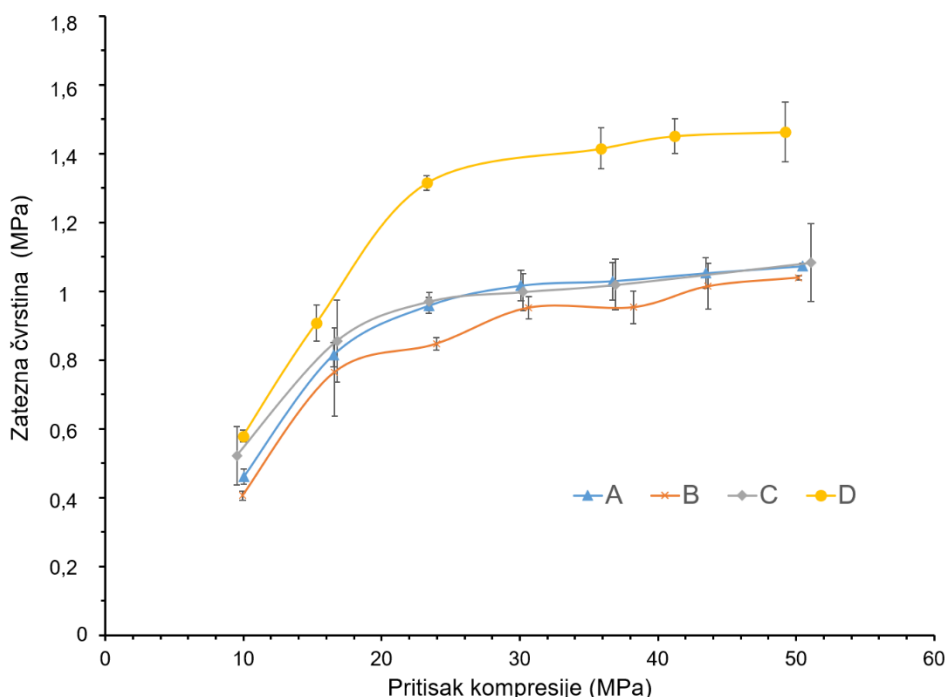
Tabela 16. Protočnost praškova A, B, C i D i suvog ekstrakta korena lincure.

Uzorak	<i>Hausner</i> -ov odnos	<i>Carr</i> -ov index (%)	Protočnost
A	1,13 ± 0,04	11,84 ± 3,11	dobra
B	1,23 ± 0,02	18,67 ± 1,26	prosečna
C	1,10 ± 0,02	9,73 ± 1,48	odlična
D	1,12 ± 0,03	10,64 ± 2,18	dobra
Suvi ekstrakt lincure	1,28 ± 0,08	21,95 ± 5,26	prihvatljiva

3.2.3.2.6 Tabletabilna svojstva

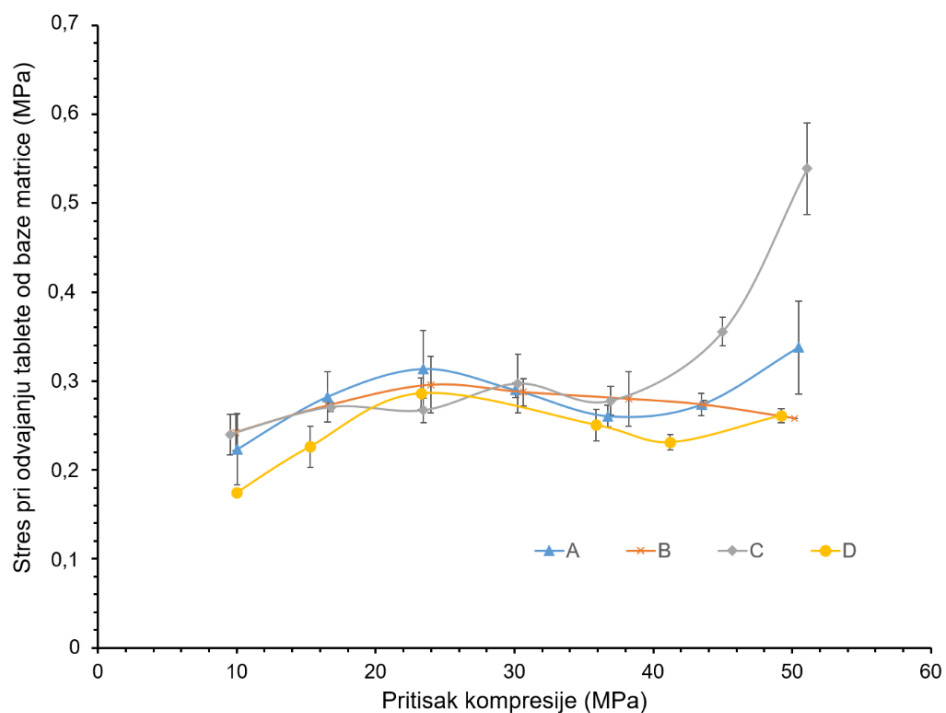
U cilju procene tabletabilnih svojstava praškova dobijenih liofilizacijom višestrukih emulzija izračunata je zatezna čvrstina, ejekcioni stres i stres pri odvajanju tablete od baze matrice, a rezultati su prikazani grafički (Slike 33,34,35). Treba napomenuti da prašak dobijen liofilizacijom ekstrakta korena lincure nije bilo moguće komprimovati postupkom direktne kompresije pod uslovima pri kojima su komprimovani praškovi A, B, C i D.

Rezultati pokazuju da je zatezna čvrstoća tableta izrađenih direktnom kompresijom praškova A, B, C i D pod pritiskom kompresije u opsegu od 10 do 50 MPa, bila u rasponu od 0,4 do 1,5 MPa (Slika 33). Tablete komprimovane pod pritiskom ispod 10 MPa bile su previše krhke, te čvrstoća tableta nije bila merljiva. Generalno, zatezna čvrstoća tablete treba da bude veća od 1 MPa (191). Zatezna čvrstoća tableta izrađenih direktnom kompresijom praškova A, B i C bila je slična, dok su se tablete dobijene tabletiranjem praška D odlikovale većom zateznom čvrstoćom, pri istim pritiscima kompresije. Dakle, na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je dodatak Sylsya[®] 350 doprineo porastu zatezne čvrstine tableta izrađenih sa Gelucire[®]-om 43/01. Pozitivan uticaj koloidnog silicijum-dioksida (Aerosil[®] 200) na čvrstinu tableta uočen je i u slučaju fizičkih smeša Eudragita RS i RL sa propranololom kao aktivnom supstancom (192).

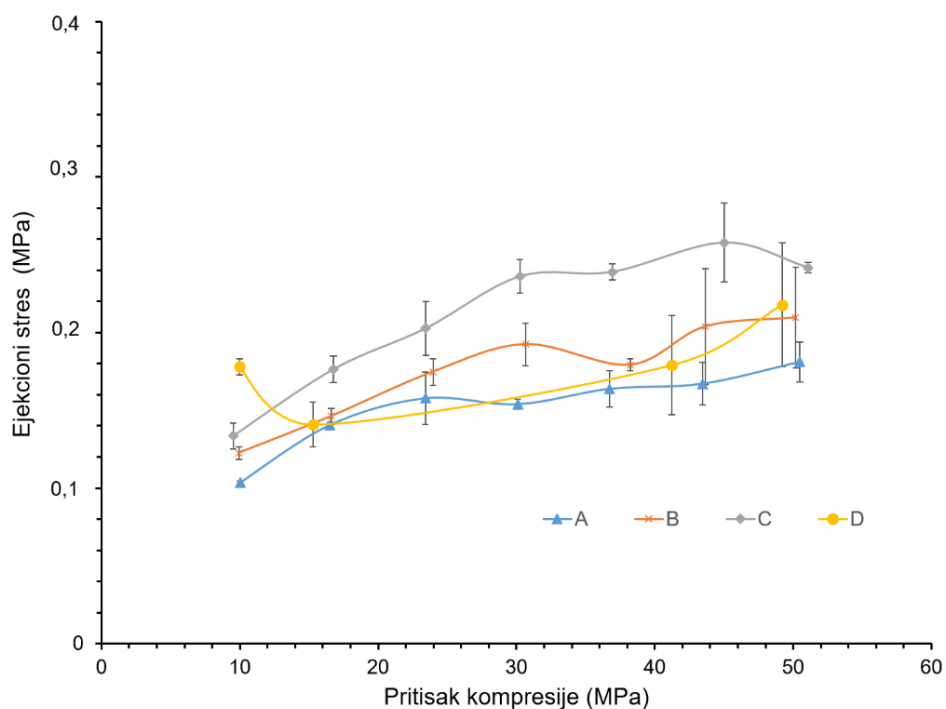


Slika 33. Zatezna čvrstina ispitivanih praškova A – D.

Ejekcioni stres je fizička veličina na osnovu koje je moguće proceniti rizik od laminacije (listanja) i kapingovanja (odvajanja površinskog sloja) tablete prilikom njenog izbacivanja iz matrice. Poznato je da se sa povećanjem ejekcionog stresa povećava rizik od oštećenja tablete, a literaturni podaci ukazuju da je poželjno da vrednost ejekcionog stresa bude niža od 3 MPa, odnosno 5 MPa kod tableta koje neće biti izlagane velikom mehaničkom stresu nakon komprimovanja (167,193). Kada su vrednosti ejekcionog stresa visoke u sastav formulacije neophodno je uključiti lubrikanse i/ili antiadhezive. Na osnovu dobijenih rezultata evidentno je da je kod svih formulacija ejekcioni stres (0,09 do 0,26 MPa) u razmatranom opsegu pritiska kompresije bio veoma nizak. Shodno tome, ovaj rezultat ukazuje da nije potrebno dodavati ni lubrikanse ni antiadhezive ni u jednu od ispitivanih formulacija. Ejekciji tableta, tj. fazi izbacivanja tablete iz matrice prethodi odvajanje tablete od baze matrice. Iako se stres pri odvajanju tablete od matrice ne koristi često u cilju procene tabletabilnih karakteristika materijala, ovaj parametar takođe može da ukaže na rizik od oštećenja tablete. Pored toga, visoke vrednosti stresa nastalog pri odvajanju tablete od baze matrice mogu biti pokazatelj interakcije između čestica praška i matrice (167). Stres odvajanja tablete od matrice može biti manji ili veći u poređenju sa ejkcionim stresom. Međutim, drastično veće vrednosti stresa pri odvajanju tablete od matrice u odnosu na ejekcioni stres bi mogle ukazati da postoji značajna interakcija praška i materijala od koga je izrađena matrica. Na prikazanim graficima (Slike 34 i 35) se uočava da je kod praškova B i D stres pri odvajanju od matrice bio sličan ili nešto viši od ejekcionog stresa. Sa druge strane, u slučaju formulacija A i C pri pritiscima većim od 50 MPa primećene su veće razlike između ejekcionog stresa i stresa pri odvajanju od baze matrice. Ovaj rezultat sugerise da su formulacije sa Sylsia®-om 350 okarakterisane nižim ejkcionim stresom i manjim razlikama između ejekcionog stresa i stresa pri odvajanju tablete od matrice.



Slika 34. Stres pri odvajanju tablete od baze matrice praškova A – D.



Slika 35. Ejekcioni stres praškova A – D.

Konačno, tablete izrađene kompresijom praška D pod niskim pritiskom (23–50 MPa) su se odlikovale dovoljnom zateznom čvrstoćom (≥ 1 MPa) i niskim vrednostima ejekcionog stresa i stresa pri odvajanju tablete od baze matrice. Ovi rezultati sugerišu da se prašak D može smatrati adekvatnim, ukoliko se razmatraju njegova tabletabilna svojstva.

3.2.3.2.7 Procena mukoadhezivnih svojstava tableta

Jačina mukoadhezije često se procenjuje na osnovu merenja sile potrebne za odvajanje tablete od mukoznih membrana ili supstrata, korišćenjem analizatora teksture (Kurčić, 2020). Rezultati prikazani u Tabeli 17 pokazuju da su tablete pripremljene direktnom kompresijom praškova A, B, C i D posedovale mukoadhezivna svojstva, pošto su ispitivane formulacije bile okarakterisane prosečnom silom adhezije u opsegu od 1,73 do 2,46 N. Među formulacijama nisu uočene statistički značajne razlike ($p = 0,506$). Razmatrajući sastav formulisanih tableta, pretpostavka je da se mukoadhezivnost ispitanih formulacija može dovesti u vezu sa prisustvom natrijum-alginata, koji je poznat kao anjonski mukoadhezivni polimer (194). Pored toga, iako je primećeno da Gelucire® 43/01 i 39/01 nemaju bioadhezivna svojstva, pokazano je da ovi ekscipijensi doprinose formiranju stabilnije gel strukture i posledično adheziji tableta sa hidroksipropil metilcelulozom i hitozanom kao hidrofilnim polimerima (169).

Rezultati ranijih istraživanja su pokazali da je optimizovani gastroretentivni sistem za isporuku alopurinola, čiji mehanizam gastroretencije je bio zasnovan na mukoadheziji i flotaciji, omogućio gastroretenciju *in vivo* na modelu albino zečeva, pri čemu je sila adhezije ovih tableta iznosila 0,94 N (195). Na osnovu prikazanih rezultata, može se očekivati da bi razvijene tablete ispoljile mukoadhezivna svojstva *in vivo*, s obzirom da su sve formulacije okarakterisane silom adhezije većom od 0,94 N, što bi moglo da doprinese produženom vremenu zadržavanja na ciljanom mestu (tj. u želucu). Pored toga, blizak kontakt između formulisanih tableta i sluznice želuca mogao bi da unapredi apsorpciju aktivnih jedinjenja, kao i da podstakne ispoljavanje lokalnog efekta lincure u želucu.

Tabela 17. Sila adhezije tableta izrađenih direktnom kompresijom praškova A – D

Uzorak	A	B	C	D
Sila adhezije (N)*	1,73 ± 0,66 ^a	2,02 ± 0,46 ^a	2,08 ± 0,64 ^a	2,46 ± 0,12 ^a

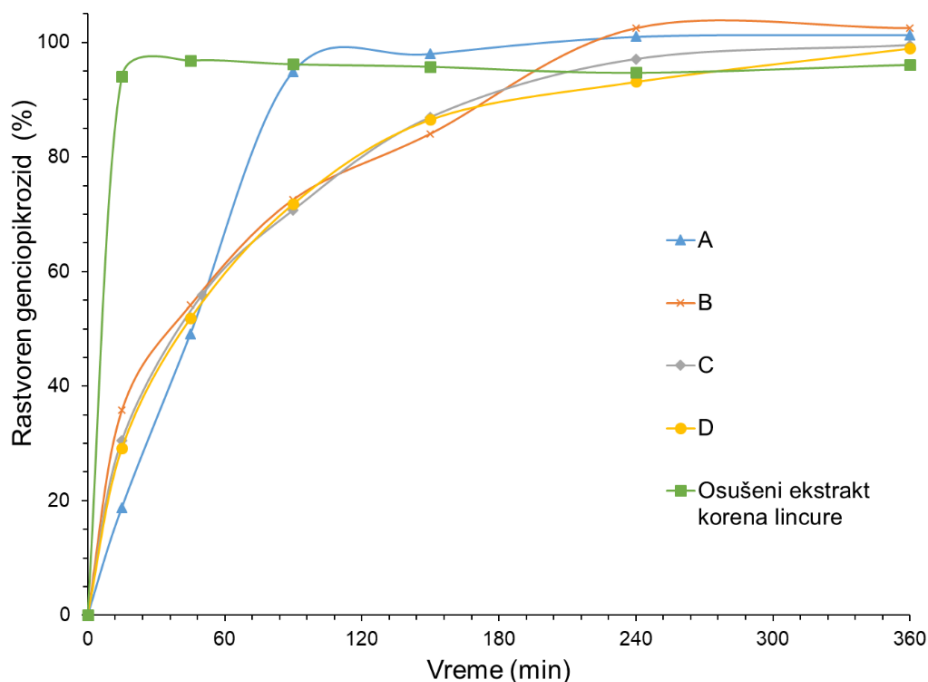
* Različita slova u istom redu označavaju statističku značajnost na nivou $p < 0,05$ (Tukey test).

3.2.3.2.8 Ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida

Profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta dobijenih direktnom kompresijom praškova čvrstih lipidnih mikročestica sa ekstraktom korena lincure prikazani su na Slici 36. Pored toga, na istom grafiku je prikazan i profil brzine rastvaranja genciopikrozida iz suvog ekstrakta korena lincure u obliku praška.

Rastvaranje genciopikrozida iz suvog ekstrakta korena lincure bilo je izuzetno brzo. Tačnije, pokazano je da je nakon 15 minuta genciopikrozid bio gotovo potpuno rastvoren, što je očekivano s obzirom da se ovo jedinjenje dobro rastvara u vodi (37). Na profilima brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta (A – D) uočava se bifazno oslobađanje, tj. u prvih 45 minuta se genciopikrozid brzo oslobađao, dok nakon toga dolazi do sporijeg oslobađanja. Brzo oslobađanje u toku prve faze se može dovesti u vezu sa poroznom strukturom mikročestica, jer je pokazano da porozna struktura mikročestica omogućava brži prodor molekula vode, dok je put koji treba da pređe aktivna supstanca pri oslobađanju kraći (172). Pored toga, brže oslobađanje genciopikrozida u prvoj fazi može biti posledica njegovog prisustva na površini mikročestica. Usporeno oslobađanje genciopikrozida u drugoj fazi ukazuje da je ekstrakt korena lincure efikasno inkapsuliran u čvrste lipidne mikročestice. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima, s obzirom da su i ranije formulisani gastroretentivni sistemi sa Gelucire®-om 39/01 i 43/01 i da je postignuto produženo oslobađanje aktivnih supstanci (173,196). Pored toga, poznato je da se natrijum-alginat u kiselj sredini transformiše u hidrogel, koji može da kontroliše brzinu oslobađanja bioaktivnih jedinjenja (197). S obzirom da je ovo ispitivanje vršeno u kiselj sredini ($pH = 1,2$), moguće je da je prisustvo

natrijum-alginata doprinelo usporenom oslobađanju genciopikrozida. Takođe, bifazno oslobađanje je postignuto u slučaju gastroretentivnih sistema, koji su sadržali Gelucire® 39/01 i 50/13 i pokazno je da je na taj način tri puta poboljšana biološka raspoloživost cefuroksimaksetila (198).



Slika 36. Profili *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta (A, B, C i D) i praška suvog ekstrakta korena lincure.

Profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz formulacija A i B sa Gelucire®-om 39/01 kao lipidnom komponentom su bili međusobno različiti (Tabela 18), što ukazuje da je prisustvo Sylysia® 350 (1 %) uticalo na smanjenje brzine oslobađanja genciopikrozida iz formulacija koje su sadržale Gelucire® 39/01. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima, s obzirom da su Petchsomrit i sar. 2017 pokazali da koloidni silicijum-dioksid doprinosi sporijem oslobađanju kurkumina iz alginatnih gastroretentivnih nosača (197). Pored toga, koloidni silicijum dioksid (Aerosil® 200) u niskoj koncentraciji (1 %) usporio je oslobađanje propranolola iz fizičke smeše sa Eudragit®-om RS ili RL (192). Sa druge strane, profili oslobađanja formulacija C i D su bili slični, što ukazuje da dodavanje Sylysia® 350 nije uticalo na brzinu oslobađanja genciopikrozida iz tableta koje su sadržale Gelucire® 43/01.

Prema dobijenim rezultatima ($f_2 < 65$) zaključeno je da profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz formulacija A i C, kao ni profili oslobađanja formulacija B i D nisu bili slični (Tabela 18). Sporije oslobađanje je postignuto iz tableta sa Gelucire®-om 43/01 nego iz tableta sa Gelucire®-om 39/01, što ukazuje da izbor čvrstog lipida ima značajan uticaj na brzinu oslobađanja genciopikrozida iz tableta. Slično je pokazano u slučaju granula sa tenofovirom, tj. primećeno je da je sporije oslobađanje postignuto kada je kao čvrsti lipid korišćen Gelucire® 43/01 nego Gelucire® 39/01 (169).

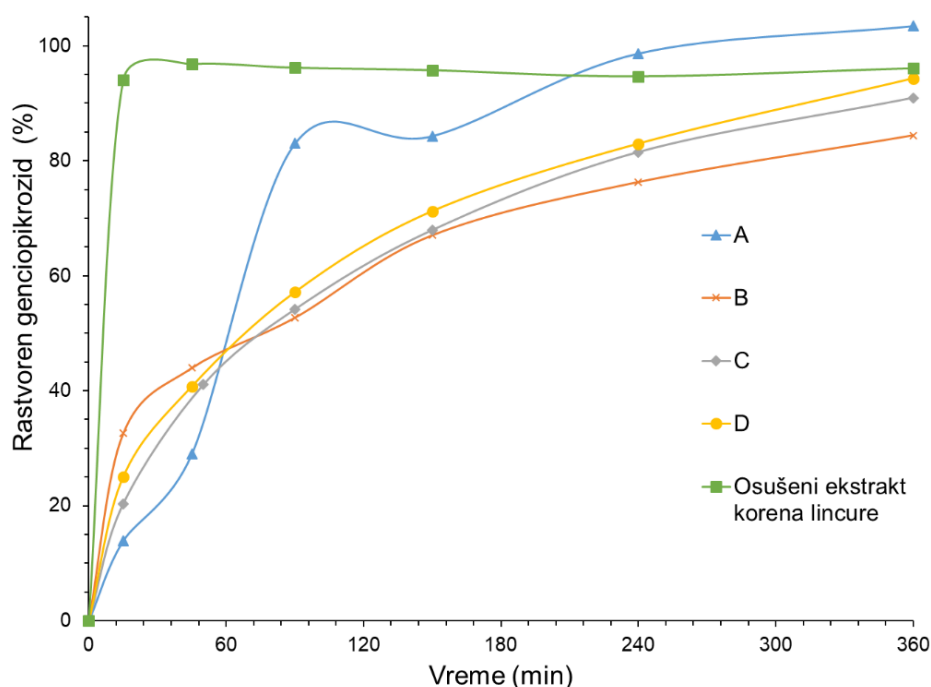
Tabela 18. Faktori sličnosti izračunati poređenjem profila brzina oslobađanja formulacija tableta (A – D) i ekstrakta korena lincure u obliku praška.

Referentni uzorak	Test uzorak	f_2 (faktor sličnosti)
Suvi ekstrakt korena lincure	A	21,81
Suvi ekstrakt korena lincure	B	19,72
Suvi ekstrakt korena lincure	C	24,21
Suvi ekstrakt korena lincure	D	23,44
A	B	44,28
A	C	45,06
A	D	45,52
B	C	71,08
B	D	64,23
C	D	78,98

Matematičko modelovanje kinetike oslobađanja genciopikrozida iz formulisanih farmaceutskih oblika je primenjeno u cilju što boljeg razumevanja mehanizama koji utiču na oslobađanje marker jedinjenja. Koeficijenti korelacije (R^2) izračunati su nakon uklapanja (fitovanja) eksperimentalnih podataka dobijenih ispitivanjem *in vitro* brzine oslobađanja u različite matematičke modele kojima se opisuje kinetika oslobađanja (Tabela 19). *Korsmeyer-Peppas* model je na najbolji način mogao da opiše kinetiku oslobađanja genciopikrozida iz sve četiri formulacije. EkspONENT modela (n) tableta formulacije A iznosio je 0,5523 što znači da je u pitanju anomalni transport tj. da se uz difuziju istovremeno odvija i erozija. Sa druge strane formulacije tableta B, C i D okarakterisane su eksponentom modela koji je bio manji od 0,45 i zaključeno je da se genciopikrozid dominantno oslobađa prateći Fikovu difuziju. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima, jer je oslobađanje klopido-grel-bisulfata iz pripremljenih mikročestica sa Gelucire®-om 43/01 opisano *Korsmeyer-Peppas* modelom, pri čemu je zaključeno da se oslobađanje aktivne supstance dominantno odvija Fikovom difuzijom (172).

Tabela 19. Korelacioni koeficijenti matematičkih modela kojima se opisuje kinetika oslobađanja genciopikrozida iz tableta (A – D) i eksponent modela (n).

Uzorak	Koeficijent korelacije (R^2)				n
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	<i>Korsmeyer-Peppas</i>	
A	0,6241	0,4783	0,8422	0,8524	0,5523
B	0,7433	0,7319	0,9423	0,9819	0,3532
C	0,7268	0,6628	0,9339	0,9601	0,3825
D	0,7279	0,6600	0,9339	0,9601	0,3924



Slika 37. Profili *in vitro* brzina oslobađanja genciopikrozida iz praškova (A, B, C i D) i suvog ekstrakta korena lincure u obliku praška.

Poređenjem brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta i praškova istog sastava ustanovljeno je da je brzina oslobađanja genciopikrozida iz praškova svih formulacija (A – D) bila sporija nego iz tableta (Slike 36 i 37), što je potvrđeno i izračunavanjem faktora sličnosti (Tabela 20). Ovaj rezultat navodi na zaključak da je prilikom kompresije formulisanih lipidnih praškova došlo do „migracije“ inkapsuliranog ekstrakta na površinu čestice, što je uticalo na brže oslobađanje genciopikrozida iz tableta nego iz praška.

Tabela 20. Faktori sličnosti izračunati poređenjem profila brzina oslobađanja formulacija tableta (A – D) i odgovarajućih praškova (A – D).

Referentni uzorak	Test uzorak	f_2 (faktor sličnosti)
A tablete	A prašak	49,91
B tablete	B prašak	37,98
C tablete	C prašak	41,75
D tablete	D prašak	48,04

3.2.3.2.9 Procena disperzibilnosti uzoraka

Na Slici 38 prikazana je raspodela veličina kapi disperzija uzorkovanih tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta A – D, a u Tabeli 21 su sumirane vrednosti dijametara kapi, kao i intenziteti koji odgovaraju svakom od pikova.

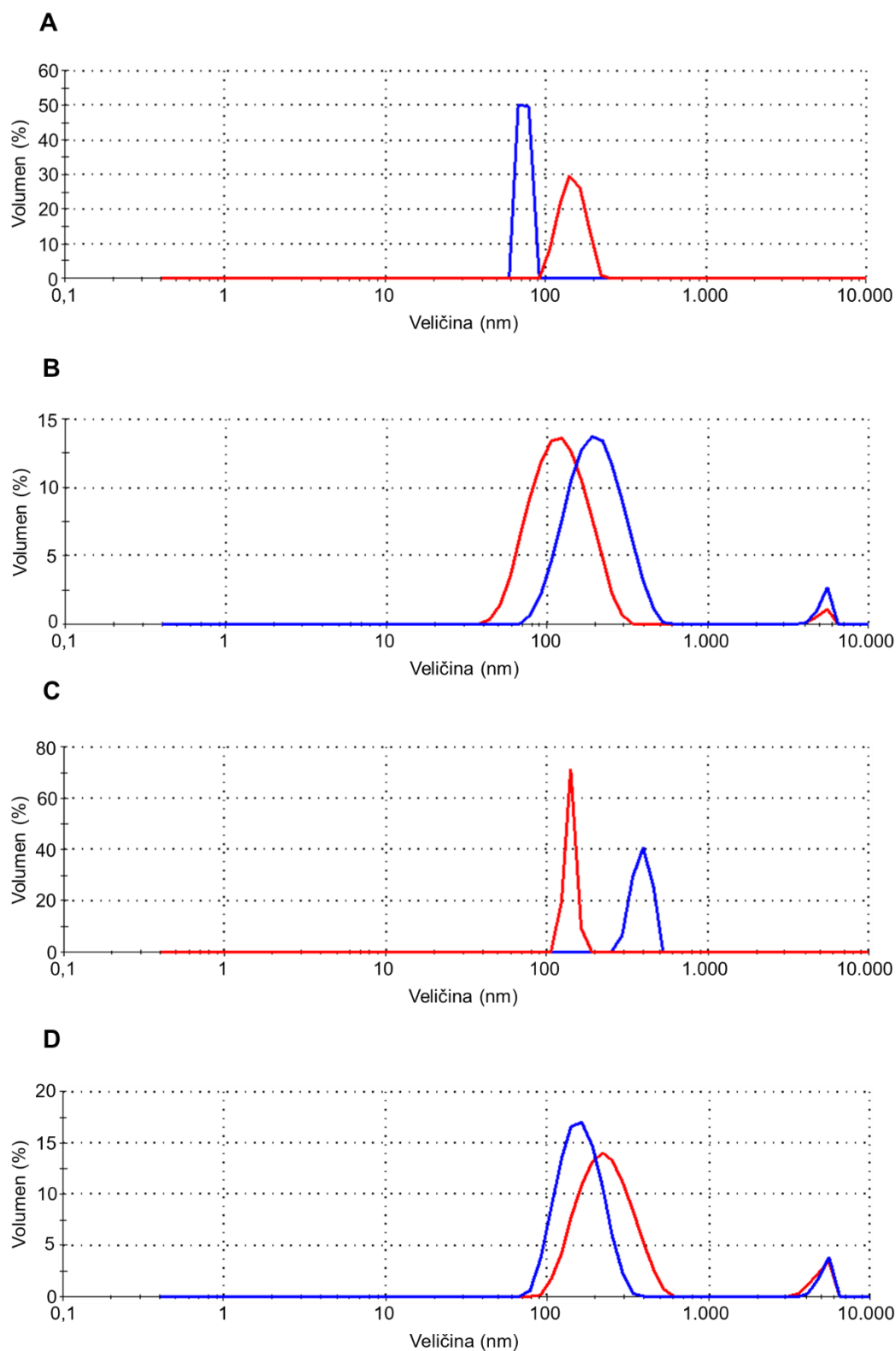
U svim testiranim uzorcima, nakon samo 15 minuta uočeni su nanoasocijati veličine manje od 500 nm. Pored toga, u medijumu u kome su testirane tablete B i D detektovano je prisustvo mikročestica veličine oko 5 μm , što najverovatnije predstavlja frakciju silicijum-dioksida (Sylsia® 350) koji je dodat u ove dve formulacije u koncentraciji od 1 %. Prosečna veličina čestica Sylsia® 350, prema specifikaciji proizvođača je 3,9 μm (Fuji), a povećana veličina čestica silicijum dioksida može biti posledica adsorpcije liofilizovane V/U/V emulzije (199). Razlike u disperzibilnosti čvrstih lipidnih mikročestica bile su najizraženije na samom početku testa. Nanoasocijati najmanjih

dimenzija uočeni su kod uzorka A, što bi moglo da ukaže na brže formiranje disperzije mikročestica kod tableta A, nego kod drugih uzoraka. Ovaj rezultat se može dovesti u vezu sa rezultatima ispitivanja brzine oslobađanja, jer je primećeno da se genciopikrozid oslobađao brže iz tableta A nego iz drugih uzoraka.

Nanoasocijati su bili prisutni u uzorcima i nakon 6 sati kod sve četiri formulacije tableta. Uočeno prisustvo nanoasocijata (koji su se mogli formirati od upotrebljenih surfaktanata i lipidnih ekscipijenasa) u medijumu, koji odgovara kiseloj sredini želuca, što može biti značajno sa aspekta povećanja apsorpcije bioaktivnih jedinjenja primenjenih *in vivo* (200).

Tabela 21. Dijametar formiranih nanoasocijata tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta A – D i intenzitet pikova u krivama raspodele.

Vreme		15 minuta				6 sati			
Pik		Pik 1		Pik 2		Pik 1		Pik 2	
Uzorak	D (nm)	I (%)	D (nm)	I (%)	D (nm)	I (%)	D (nm)	I (%)	
A	73,4	100,0	/	/	147,4	100,0	/	/	
B	210,2	96,3	5319,0	3,7	126,4	98,2	5236,0	1,8	
C	389,6	100,0	/	/	140,1	100,0	/	/	
D	165,5	94,1	5271,0	5,9	239,3	93,0	5007,0	7,0	



Slika 38. Raspodela veličina kapi formiranih asocijata tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta A – D nakon 15 minuta (—) i nakon 6 sati (—).

3.3 Treći faza istraživanja – Razvoj gastroretentivnih tableta i kapsula sa mikroinkapsuliranim ekstraktom korena lincure

3.3.1 Materijali

Ekstrakt korena lincure je dobijen od Sektora proizvodnje Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (Beograd, Srbija; serija: 19910718). Poliglicerol poliricinoleat (Palsgaard, Danska), Gelucire® 43/01 (Gattefossé, Francuska) i Lipoid S 75 (Lipoid GmbH, Nemačka) dobijeni su kao poklon uzorci. Pored toga, trehaloza dihidrat (TCI Chemicals, Japan), natrijum-alginat (Fisher Scientific, SAD), natrijum-hlorid (Fisher Scientific, SAD) i Sylsia® 350 (Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan) su korišćeni pri pripremi emulzija. Procena mukoadhezivnih svojstava tableta izvršena je korišćenjem mucina izolovanog iz svinjskog želuca, tip II (Sigma-Aldrich, Kina). *In vitro* digestija je sprovedena korišćenjem zečijeg gastričnog ekstrakta (engl. *rabbit gastric extract*) (Lipolytech, Francuska), svinjskog pankreatina (Sigma-Aldrich, Nemačka), žučnih soli (Sigma-Aldrich, Nemačka), kao i ostalih reagenasa u skladu sa preporukom INFOGEST protokola (201). Za procenu antioksidativne aktivnosti pripremljenih uzoraka korišćen je troloks (engl. *trolox*) (97%), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin, gvožđe(III)hlorid heksahidrat, natrijum-acetat, 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil, Tween® 20, linolna kiselina i β -karoten, koji su kupljeni od Sigma-Aldrich-a (SAD). Svi ostali reagensi su bili analitičkog kvaliteta, uključujući ortofosforu kiselinu (Sigma-Aldrich, Nemačka), acetonitril (Merck, Germany), etanol, metanol, hlorovodoničnu kiselinu i glacijalnu sirćetnu kiselinu (Fisher Chemicals, SAD). Standard genciopikrozida je nabavljen od ChromaDex-a, SAD. Ultra čista voda je pripremljena korišćenjem Milli-Q sistema za prečišćavanje (Millipore, Francuska).

3.3.2 Metode

3.3.2.1 Priprema ekstrakta korena lincure

Ekstrakt korena lincure je pripremljen pod uslovima opisanim u poglavlju 3.2.2.1.

3.3.2.2 Procena rizika

Ishikawa dijagram (sin. dijagram riblje kosti) kreiran je u cilju razmatranja uticaja atributa materijala (MA) i parametara procesa (PP) na kvalitet, bezbednost i efikasnost gastroretentivnih kapsula i tableta, pripremljenih direktnom kompresijom praškova dobijenih liofilizacijom dvostrukih (V/U/V) emulzija. Dalje, kako bi identifikovali CMA i CPP, tj. parametre procesa i attribute materijala koji imaju najveći uticaj na kritične attribute kvaliteta (CQAs), formirana je matrica procene rizika (REM) dodeljivanjem niskog, srednjeg i visokog ranga u skladu sa očekivanim rizicima (202,203).

3.3.2.3 Priprema dvostrukih emulzija

Dvostruke emulzije su pripremljene u skladu sa procedurom opisanom u poglavlju 3.2.2.2. Ukratko, zagrejana vodena faza (tečni ekstrakt lincure, natrijum-alginat i natrijum-hlorid) su dodati u otopljenu masnu fazu (Gelucire® 43/01 i PGPR) uz stalno mešanje (500 rpm) na magnetnoj mešalici pri temperaturi u opsegu od 48 do 53 °C. Primarne (V/U) emulzije u slučaju formulacija H i J su homogenizovane na 15000 obr/min tokom 3 minuta, dok su emulzije G i I homogenizovane na 15000 obr/min tokom 6 minuta korišćenjem rotor-stator homogenizatora (Ultra-Turrax, IKA®, Nemačka). U sledećem koraku, primarna emulzija (V/U) je dispergovana u zagrejanu spoljašnju vodu. Koncentracija trehaloze u pripremljenim emulzijama G i H iznosila je 3,94 %, dok je u emulzijama I i J koncentracija bila viša (7,88 %). Adsorbens (Sylsia® 350) je dodat nakon formiranja homogene disperzije, a potom su emulzije homogenizovane na 3000 obr/min, tokom 4,5 minuta pomoću rotor-stator homogenizatora. Nakon toga, emulzije su neprekidno mešane laboratorijskom mešalicom sve dok temperatura pripremljene emulzije nije bila približno 25 °C. U Tabeli 22 je prikazan sastav emulzija (G, H, I i J) i teorijski sastav praškova (G, H, I i J) nakon liofilizacije.

Tabela 22. Sastav dvostrukih V/U/V emulzija (G – J) i dobijenih praškova.

		Emulzija*		Prašak	
		I i J	G i H	I i J	G i H
V	Ekstrakt lincure (%)	13,13	13,13	19,35	23,26
	Natrijum-hlorid (%)	0,06	0,06	0,25	0,30
	Natrijum-alginat (%)	0,26	0,26	1,12	1,35
U	Gelucire® 43/01 (%)	5,32	5,32	22,73	27,33
	Poliglicerol poliricinoleat (%)	0,98	0,98	4,21	5,06
V	Prečišćena voda (%)	68,00	71,93	0	0
	Natrijum hlorid (%)	0,23	0,23	0,99	1,19
	Natrijum-alginat (%)	1,58	1,58	6,73	8,09
	Trehaloza (%)	7,88	3,94	33,66	20,20
	Lecitin (%)	1,58	1,58	6,73	8,09
	Sylysia® 350 (%)	1,00	1,00	4,23	5,09

*Formulacija I i G su homogenizovane 6 minuta pri brzini od 15000 obr/min, dok su formulacija H i J homogenizovane 3 minuta prilikom pripreme voda/ulje emulzija.

3.3.2.4 Priprema praška

Praškovi G, H, I, J, kao i suvi ekstrakt korena lincure su pripremljeni postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.4. Teorijski sastav praškova dobijenih nakon liofilizacije dvostrukih emulzija prikazani su u Tabeli 22.

3.3.2.5 Izrada tableta

Tablete G – J, čija masa je iznosila približno 100 mg izrađene su direktnom kompresijom fizičke smeše, koja je sadržala 92,5 % praška (G, H, I ili J) i 7,5 % natrijum-bikarbonata pomoću uniaksijalne tablet mašine (Gamlen tablet press, series D, Gamlen Tableting Ltd, Engleska) sa klipom prečnika 6 mm, ravne površine, pri brzini kompresije od 60 mm/min i vremenu zadržavanja klipa od 0,08 sekundi. U cilju formulisanja tableta sa adekvatnim vremenom odlaganja u okviru preliminarne studije izrađene su i tablete koje su sadržale samo prašak G – J, kao i tablete sa 92,5 % praška (G, H, I ili J) i 7,5 % jedne od navedenih pomoćnih supstanci (kalcijum karbonata/hipromeloze/natrijum-alginata/natrijum-kroskarmeloze). Pored toga, izrađene su i tablete koje su sadržale 90 % praška (G, H, I ili J) i 10 % natrijum-bikarbonata.

3.3.2.6 Izrada kapsula

Praškovi (G, H, I i J) su punjeni u tvrde želatinske kapsule br. 1 korišćenjem uređaja za poluautomatsko punjenje kapsula (Optima Aluminium®, Farmalabor s.r.l., Milano, Italija).

3.3.2.7 Karakterizacija dvostrukih emulzija

Mikroskopska analiza je izvršena korišćenjem optičkog mikroskopa (Olympus BX41 sa kamerom Olympus SC30, Japan) nakon razblaživanja uzoraka prečišćenom vodom. Električna provodljivost je merena pomoću konduktometra (Radiometar, Danska) u skladu sa metodom opisanom u poglavlju 3.2.2.3.1, dok je pH uzoraka određen potenciometrijskom metodom uranjanjem elektrode pH metra HI 9321 (Hanna Instruments, SAD) u uzorak. Stabilnost emulzija je analizirana sprovođenjem testa centrifugiranja (15000 obr/min tokom, 15 min na temperaturi od 22 ± 2 °C), kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.3.2.

Emulzije su pripremljene i čuvane na sobnoj temperaturi 24 sata pre reološke karakterizacije. Reološka merenja su vršena na rotacionom reometru Rheolab MC 120 (PaarPhysica, Austrija) korišćenjem kupa/ploča mernog sistema MK 22 (prečnik kupe 50 mm, rastojanje između kupe i ploče 50 μm , 1° ugao nagiba). Merenja su izvedena na temperaturi od $20 \pm 0,1$ $^\circ\text{C}$. Primenjena je procedura kontrolisane brzine smicanja (engl. *controlled shear rate*, CSR). Tačnije, brzina je rasla od 0 s^{-1} do 200 s^{-1} i tako je formirana uzlazna kriva protoka, dok je silazna kriva formirana smanjenjem brzine sa 200 s^{-1} na 0 s^{-1} . Svaki interval sadrži 30 mernih tačaka, sa zadržavanjem u trajanju od 10 sekundi u svakoj tački.

3.3.2.8 Karakterizacija praška

Skenirajuća elektronska mikroskopija je izvedena na način opisan u poglavlju 3.2.2.5.1. Efikasnost inkapsulacije je određena prema proceduri navedenoj u poglavlju 3.2.2.5.2, dok je prinos određen u skladu sa metodom iz poglavlja 3.2.2.5.3. Pored toga, protočnost praškova je ispitana prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.2.5.5.

3.3.2.8.1 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Termalna analiza praška G, H, I i J, kao i suvog ekstrakta korena lincure izvedena je metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), pomoću instrumenta DSC1 (Mettler Toledo, Nemačka). Precizno izmereni praškovi su stavljeni u aluminijumske posude i podvrgnuti zagrevanju na 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ u opsegu od -60 do 200 $^\circ\text{C}$ u struji azota ($50 \text{ ml}/\text{min}$). Prazna aluminijumska posudica je korišćena kao referentni uzorak.

3.3.2.8.2 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektroskopija je korišćena u cilju otkrivanja potencijalno prisutnih interakcija između ekstrakta i pomoćnih supstanci. Analiza je vršena na uređaju Agilent Technologies Cari 630 (SAD) sa Diamond-ATR modulom. Spektri ispitivanih uzoraka su snimani u intervalu od 4000 cm^{-1} do 500 cm^{-1} , sa rezolucijom od 8 cm^{-1} .

3.3.2.8.3 Analiza sadržaja vlage

Sadržaj vlage u uzorcima je određen gravimetrijski korišćenjem analizatora vlage HB43-S (Mettler Toledo, Švajcarska).

3.3.2.8.4 Ispitivanje sposobnosti flotiranja

Vreme odlaganja (t_{lag}) i vreme flotiranja tableta i kapsula određeno je postavljanjem uzoraka u staklene čaše koje su se nalazile u vodenom kupatilu sa šejkerom, pri brzini od $50 \text{ obr}/\text{min}$ i temperaturi od $37 \pm 0,5$ $^\circ\text{C}$. U cilju oponašanja uslova u želucu korišćeni medijum (200 ml) je sadržao $0,1 \text{ M HCl}$ i $0,2 \%$ metilceluloze (204). Vreme odlaganja je određeno kao vreme koje protekne od unošenja uzorka do njegovog isplivavanja na površinu tečnosti, dok je vreme flotiranja određeno kao vreme tokom kog uzorak ostaje na površini čaše.

3.3.2.8.5 Određivanje efikasnosti inkapsulacije genciopikrozida nakon 18 meseci čuvanja u uslovima prirodnog starenja

Sadržaj genciopikrozida u praškovima G – J nakon 18 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi određen je HPLC metodom (poglavlje 3.1.2.6). Dobijeni rezultati su upoređeni sa vrednostima određenim odmah nakon pripreme praškova istom metodom. Efikasnost inkapsulacije nakon 18 meseci čuvanja ($EE_{18 \text{ meseci}}$) izražena je u skladu sa jednačinom 19. Ispitivanje je vršeno u tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

$$EE_{18 \text{ meseci}} = \frac{\text{Sadržaj genciopikrozida nakon 18 meseci}}{\text{Inicijalno određen sadržaj genciopikrozida}} \times 100 \quad (19)$$

3.3.2.8.6 Antioksidativna aktivnost

Poređena je antioksidativna aktivnost pripremljenih praškova (G, H, I, J) nakon 12 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi i svežeg tečnog ekstrakta korena lincure u cilju procene stabilnosti praškova, tj. utvrđivanje uticaja skladištenja i uslova izrade na antioksidativnu aktivnost formulisanih praškova.

Antioksidativni kompozitni indeks (ACI) je izračunat na osnovu rezultata dobijenih izvođenjem DPPH i FRAP testova, kao i testa inhibicije obezbojavanja beta karotena. Vrednost indeksa od 100 dodeljivana je najvišoj vrednosti antioksidativnog potencijala (svež ekstrakt korena lincure) u svakom testu, a zatim je prema sledećoj jednačini (20) vršeno izračunavanje indeksa za sve ostale uzorke u okviru pojedinačnog testa:

$$ACI (\%) = \text{rezultat uzorka} / \text{najviši rezultat} \times 100 \quad (20)$$

Srednja vrednost sva tri testa predstavlja antioksidativni kompozitni indeks analiziranih uzoraka. Za merenje apsorbancije ispitivanih uzoraka korišćen je čitač mikroploča (BIOTEK, SAD).

FRAP test

Ovaj test je sproveden u skladu sa metodom koju su opisali Benzie i Strain (205). Apsorbancija uzoraka je merena na 630 nm. Izračunavanja su vršena metodom standardne krive, koja je konstruisana na osnovu rastvora troloksa u etanolu, kao standardne supstance u opsegu koncentracija 100–800 μM . Rezultati su izraženi kao μmol troloks ekvivalenata (TE) po g uzorka ($\mu\text{M TE/g}$).

Test neutralisanja DPPH radikala

Test neutralisanja DPPH radikala izveden je primenom metode koju su opisali Brand-Williams i sar. (206). Apsorbancije uzoraka merene su na 490 nm. Izračunavanje je izvršeno metodom standardne krive koja je konstruisana na osnovu rastvora troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) u 96% etanolu kao standardne supstance, u opsegu koncentracija 200–700 μM . Rezultati su izraženi kao μM troloks ekvivalenata (TE) po g uzorka ($\mu\text{M TE/g}$).

Test inhibicije obezbojavanja beta karotena

Metoda se zasniva na merenju gubitka žute boje β -karotena usled njegove oksidacije peroksil radikalom, koji nastaje oksidacijom linolne kiseline, pri čemu dodatak antioksidanasa usporava gubitak boje β -karotena. Ispitivanje je sprovedeno u skladu sa procedurom, koju su objavili Reis i sar. (207). Apsorbancija uzoraka je merena na 450 nm, odmah nakon dodavanja emulzije β -karoten/linolne kiseline, kao i nakon perioda inkubacije (120 minuta). Rezultati su izraženi kao procenat inhibicije obezbojavanja β -karotena.

3.3.2.9 Karakterizacija tableta i kapsula

Mukoadhezivnost tableta je procenjena prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.2.7.2. Ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta i kapsula izvedeno je prema proceduri navedenoj u poglavlju 3.2.2.7.3, a kinetika oslobađanja je analizirana prema poglavlju 3.2.2.7.4. Pored toga procena disperzibilnosti uzoraka izvršena je u skladu sa procedurom opisanom u poglavlju 3.2.2.7.5.

3.3.2.9.1 Ispitivanje friabilnosti

Friabilnost tableta je određena prema postupku opisanom u Ph. Eur. 11.0 (38). Ukratko, precizno odmerene i otprašene tablete su rotirane u uređaju za ispitivanje friabilnosti tableta Erweka

AR 400 (Erweka GmbH, Nemačka) pri brzini od 25 ± 1 obr/min. Nakon toga, tablete su odprašene i merena je njihova masa. Friabilnost je izražena kao relativni gubitak mase tableta u skladu sa sledećom jednačinom (21):

$$\text{Friabilnost} = \frac{\text{masa tableta pre testa} - \text{masa tableta nakon testa}}{\text{masa tableta pre testa}} \times 100 \quad (21)$$

3.3.2.9.2 Ispitivanje *in vitro* digestije

Ispitivanje *in vitro* digestije optimalnog uzorka tableta i kapsula je sprovedena prema INFOGEST protokolu, pri čemu je praćen udeo rastvorenog genciopikrozida. Aktivnost enzima je određena prema proceduri koju su opisali Brodkorb i sar. (201). Eksperiment je izveden u vodenom kupatilu sa šejkerom na $37 \pm 0,5$ °C pri brzini mešanja od 40 obr/min. Simulirana salivarna tečnost (engl. *simulated salivary fluid*, SSF), simulirana gastrična tečnost (engl. *simulated gastric fluid*, SGF) i simulirana intestinalna tečnost (engl. *simulated intestinal fluid*, SIF) pripremljene su sa natrijum-hloridom umesto natrijum-bikarbonatom da bi se izbeglo stvaranje mehurića, kao što je opisano u INFOGEST protokolu.

Aдекватna masa uzorka izračunata je uzimanjem u obzir pojedinačne doze tečnog ekstrakta lincure (1 g) i procenjene zapremine crevne tečnosti (200 ml) (208). Tačno odmereni uzorci dodati su u SSF, koji je prethodno zagrejan na 37 °C. Enzim (α -amilaza) nije uključen u oralnu fazu, jer se tablete i kapsule ne zadržavaju u ustima nego se odmah gutaju. Nakon inkubacije (30 sekundi) na 37 °C, oralnom bolusu je dodata prethodno zagrejana SGF i zečji želudačni ekstrakt (engl. *rabbit gastric extract*, RGE), pri čemu je aktivnost lipaze bila 60 U/ml u finalnoj želudačnoj smeši. Potom je prethodno zagrejanom SIF-u dodat želudačni himus i rastvor žučnih soli, tako da je finalna koncentracija žučnih soli bila 10 mM. Pankreatin je dodat ovoj smeši u količini koja je odgovarala aktivnosti lipaze od 2000 U/ml, s obzirom da su ispitivane lipidne formulacije. U cilju inaktivacije enzima gastrične faze pH je podignut na 8, dok je intestinalnoj fazi dodat orlistat (tetrahidrolipstatin) sa konačnom koncentracijom od 5 mM. Kako bi procenili uticaj enzima, kontrolni uzorci su ispitani pod istim uslovima, pri čemu nisu korišćeni enzimi i žučne soli.

3.3.2.9.3 Variranje mase kapsula

Pojedinačno je izmerena masa 20 napunjenih tvrdih kapsula. Na osnovu mase intaktne kapsule i mase čaurice kapsule izračunata je masa sadržaja kojim su napunjene kapsule. Ispitivanje i procena rezultata su izvedeni prema zahtevima Ph. Eur. 11.0 (38).

3.3.2.10 Statistička obrada rezultata

Uticaj kritičnih faktora na CQA je procenjen korišćenjem dvofaktorske ANOVA. Statistička analiza je izvršena korišćenjem IBM SPSS® Statistics version 22 (probna verzija) programa. P vrednost $\leq 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja i dobijeni rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

3.3.3 Rezultati i diskusija

Ciljani profil kvaliteta proizvoda (QTPP) je razvijen razmatrajući bezbednosni profil i efikasnost gastroretentivnih tableta i kapsula sa ekstraktom korena lincure (Tabela 23).

Tabela 23. Ciljani profil kvaliteta proizvoda (QTPP) za gastroretentivne tablete i kapsule.

Cilj		Objašnjenje
Put primene	Oralni	Prema monografiji koju je objavila EMA (39), ekstrakt korena lincure se primenjuje oralnim putem.
Indikacija	Dispeptični simptomi/gastrointestinalni poremećaji: gorušica, povraćanje, bol u stomaku, mučnina, gubitak apetita, zatvor, nadimanje	Pored toga, ekstrakt i izolovana bioaktivna jedinjenja iz korena lincure pokazuju adaptogeno, hepatoprotektivno delovanje, kao i antibakterijsko, antioksidativno i antifungalno delovanje.
Farmaceutski oblik	Tablete/kapsule sa gastroretentivnim svojstvima	Poželjno je produžiti vreme zadržavanja ekstrakta lincure u želucu zbog neadekvatne stabilnosti u donjim partijama intestinalnog trakta, niske bioraspoloživosti i kratkog poluvremena eliminacije genciopikrozida primenjenog u konvencionalnim oblicima, kao i zbog lokalnog delovanja lincure u želucu (13,32,35).
Tip nosača za isporuku	Flotirajući nosači na bazi lipida ili lipidni nosači kod kojih je gastroretencija zasnila na dualnom mehanizmu flotacije i gastroretencije	Apsorpcija bioaktivnih jedinjenja može biti poboljšana usled kontakta lipidne formulacije sa intestinalnim membranama. Takođe, kombinacija flotirajućeg i mukoadhezivnog pristupa može doprineti gastroretenciji (88,91,174).
Profil brzine oslobađanja	Modifikovano oslobađanje	Produženo oslobađanje genciopikrozida na mestu delovanja (želudac) je potrebno da bi se postigla i održala terapijska koncentracija.
Stabilnost	Rok upotrebe najmanje 18 meseci	Čuvanje na suvom mestu na sobnoj temperaturi.

U sledećem koraku su definisani kritični atributi kvaliteta, što je prikazano u Tabeli 24.

Tabela 24. Kritični atributi kvaliteta gastroretentivnih kapsula i tableta.

	Cilj	Da li je CQA ?	Objašnjenje
Olfaktorna/palatabilna svojstva	Prihvatljiva za pacijente	Ne	Ovaj parametar nema značajan uticaj na efikasnost i bezbednost proizvoda.
Viskozitet emulzija	Što manji maksimalni/prividni viskozitet	Da	Kako bi se proces sušenja pospešio potrebno je da emulzija ima nizak viskozitet (144).
Fizička stabilnost emulzija	Nema razdvajanja nakon testa centrifugiranja	Ne	Izuzetno je važno da dvostruke emulzije budu stabilne, ali kako je u toku preliminarnih studija pokazano da su ispitivane formulacije bile stabilne, ovo se ne smatra kritičnim parametrom.
Električna provodljivost	1–50 μ S/cm	Ne	Električna provodljivost može da ukaže na tip emulzije (209). Kako su preliminarna istraživanja pokazala da su sve emulzije dobijene postupkom opisanim u ovoj disertaciji bile V/U/V tipa, ovaj parametar nije smatran kritičnim.
Efikasnost inkapsulacije genciopikrozida	$\geq 80 \%$	Da	Neophodno je postići visoku efikasnost inkapsulacije, jer se na taj način smanjuju troškovi proizvodnje. Pored toga, kada je efikasnost inkapsulacije visoka moguće je primeniti veće doze aktivnih jedinjenja, što rezultira smanjenom učestalošću doziranja i poboljšanjem komplijanse pacijenata.
Efikasnost inkapsulacije genciopikrozida nakon 18 meseci skladištenja	$\geq 90 \%$	Da	Važno je obezbediti stabilnost i sačuvati visok sadržaj aktivnih jedinjenja tokom skladištenja.
Prinos	$\geq 80 \%$	Ne	Neophodno je postići visok prinos kako bi se smanjili troškovi proizvodnje. Međutim, ovaj parametar se ne smatra kritičnim jer je tokom preliminarnih studija pokazano da je prinos ispitivanih formulacija visok.
Antioksidativni kompozitni indeks – posle 12 meseci	$\geq 70 \%$	Ne	Od značaja je zadržati visoku antioksidativnu aktivnost ekstrakta tokom proizvodnje i skladištenja. Međutim, na metode koje se koriste za određivanje ACI može uticati niz faktora, kao što su vrsta i količina

			korišćenog rastvarača, prisustvo i koncentracija jona metala, kao i zamućenost uzorka (210).
Sadržaj vlage	< 10 %	Da	Sadržaj vlage je kritičan atribut, jer povišen sadržaj vlage može imati negativan uticaj na fizičko-hemijsku i mikrobiološku stabilnost, kao i na protočnost.
Protočnost	<i>Carr</i> -ov indeks ≤ 15 <i>Hausner</i> -ov odnos $\leq 1,18$	Da	Praškovi koji lako protiču su pogodni za izradu tableta i kapsula, jer omogućavaju uniformno punjenje matrice/kapsule.
Vreme flotiranja	≥ 6 sati	Ne	Poželjno je da flotiranje tableta/kapsula traje što duže. Ovaj parametar se ne smatra kritičnim jer su tokom preliminarnih studija ispitivane formulacije plutale duže od 6 sati.
Vreme odlaganja (t_{lag})	0–5 minuta	Da	Poželjno je da t_{lag} bude što kraće. Sa porastom vremena raste rizik da će tableta/kapsula biti prerano eliminisane iz želuca, što može uticati na efikasnost primenjenog proizvoda.
Brzina oslobađanja	$20 \% \leq Q_{45 \text{ min}} \leq 40 \%$ $60 \% \leq Q_{6 \text{ h}} \leq 100 \%$	Da	Rezultati ranijih istraživanja pokazuju da genciopikrozid brzo doseže maksimalne koncentracije u plazmi i da nakon toga nivo genciopikrozida naglo opada, te je poluvreme eliminacije kratko (2,8 sati) (32). Zbog toga je važno postići početnu efektivnu dozu i nakon toga obezbediti produženo oslobađanje kako bi se povećala bioraspoloživost i smanjila učestalost doziranja.
Friabilnost tableta	Manje od 1 %	Ne	Ovaj parametar se ne smatra kritičnim jer su tokom preliminarnih studija sve ispitivane formulacije ispunile ovaj zahtev.
Mukoadhezivnost (tableta)	Više od 0,94 N	Da	Tablete čija se gastoretencija zasniva na kombinovanom pristupu koji podrazumeva flotiranje i mukoadheziju, produženo su se zadržavale u želucu pri čemu je sila adhezije iznosila 0,94 N (195).
Variranje mase (kapsula)	U skladu sa zahtevima Ph. Eur. 11.0	Ne	U toku preliminarnih istraživanja zapaženo je da su sve kapsule odgovarale navedenim zahtevima (38).
Disperzibilnost	$PdI \leq 250$ $z\text{-ave} \leq 1000 \text{ nm}$	Da	U cilju dobijanja stabilnih disperzija i povećanja apsorpcije <i>in vivo</i> poželjno je da $z\text{-ave}$ i PdI budu niski.

3.3.3.1 Procena rizika

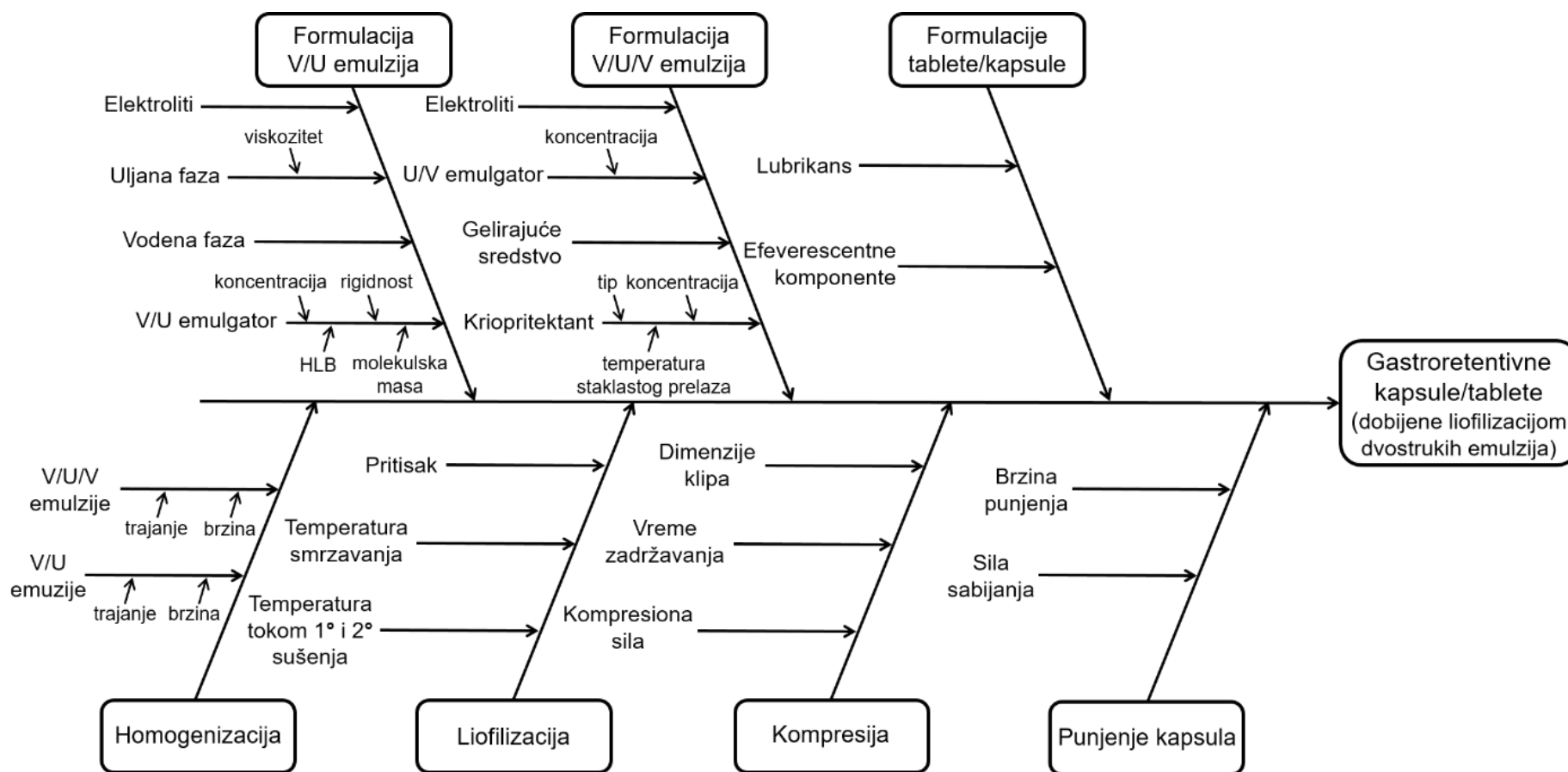
Procena rizika zasnovana je na prethodnim rezultatima, znanju i iskustvu, kao i relevantnim informacijama o lipidnim gastroretentivnim nosačima i čvrstim lipidnim mikročesticama (171,203,211,212). *Ishikawa* dijagram je prikazan na Slici 39, pri čemu su predstavljeni formulacioni i procesni parametri koji mogu uticati na karakteristike finalnog proizvoda. Faktori iz određenih kategorija (osoblje, sredina i oprema) su izostavljeni na osnovu pretpostavke da njihov uticaj na QTPP gastroretentivnih kapsula/tableta može biti zanemaren uzimajući u obzir rezultate preliminarno sprovedenih eksperimenata.

U prethodnom delu istraživanja nosač dobijen sušenjem emulzije D sa Gelucire®-om 43/01 i silicijum-dioksidom (Sylsia® 350) okarakterisan je kao adekvatan, uzimajući u obzir visoku efikasnost inkapsulacije genciopikrozida, mukoadhezivna svojstva, bifazno oslobađanje genciopikrozida, *bulk* gustinu ($0,93 \text{ g/cm}^3$) manju od $1,004 \text{ g/cm}^3$, dobru protočnost, kao i zateznu čvrstinu, ejekcioni stres i stres pri odvajanju od matrice koji su bili u okviru optimalnih vrednosti. Formulacija D je korišćena kao polazna formulacija kako bi bio ispitivan uticaj atributa materijala i procesnih parametara, a pored toga i razvijen čvrst farmaceutski oblik (tablete i kapsule) na bazi gastroretentivnih nosača.

Kvalitativna procena rizika parametara (atributi materijala i parametri procesa) koji utiču na CQA sprovedena je primenom REM analize, a rezultati su prikazani u Tabeli 25. Zaključeno je da među prikazanim atributima materijala sadržaj trehaloze ima najznačajniji uticaj, dok je vreme homogenizacije izdvojeno kao najznačajniji procesni parametar. Procenjeno je da vreme homogenizacije tokom pripreme U/V emulzije ima veći uticaj na kvalitet finalnog proizvoda nego u slučaju pripreme V/U/V emulzije, jer se V/U/V emulzija homogenizuje pri malim brzinama.

Naime, u toku procesa liofilizacije usled uticaja pritiska i temperature može doći da stvaranja nepravilnih kristala leda čime se doprinosi stvaranju porozne mikrostrukture, što može uticati na protočnost, ujednačenost sadržaja, efikasnost inkapsulacije i druge osobine od značaja. S toga je izbor tipa i koncentracije krioprotektanta od suštinskog značaja. Najčešće se kao krioprotektanti koriste monosaharidi i disaharidi, a trehaloza se najčešće koristi zbog visoke temperature staklastog prelaza (T_g) i potencijala da stvori intermolekularne vodonične veze (213,214). Ranije je pokazano da sadržaj trehaloze utiče na brzinu oslobađanja proteina i drugih aktivnih supstanci (bendroflumetiazid, levonorgestrel), kao i na stabilnost bioaktivnih jedinjenja (β -karoten) (215–217). Rezultati prikazani u okviru drugog dela istraživanja su pokazali da se gastroretentivna formulacija zadovoljavajućih karakteristika može dobiti liofilizacijom dvostrukih emulzija koje su sadržale 7,88 % trehaloze, tj. 33,66 % u finalnom prašku. U cilju analize uticaja koncentracije trehaloze ispitane su emulzije koje su sadržale trehalozu u koncentraciji od 7,88 % i u koncentraciji od 3,94 % (50 % manje). Smanjenje udela trehaloze važno je sa aspekta primene, jer se sa smanjenjem udela pomoćnih supstanci može povećati udeo aktivnih principa, čime se utiče na smanjenje mase doznog oblika, a otvara se mogućnost za smanjenje učestalosti doziranja ukoliko se primene veće doze bioaktivnih jedinjenja, koja se produženo oslobađaju.

Takođe, pokazano je da proces homogenizacije može uticati na veličinu čestica, a samim tim i na efikasnost inkapsulacije, kao i na stabilnost (218,219). Stoga su vreme i brzina homogenizacije važni procesni parametri, pri čemu je u preliminarnoj studiji procenjeno da optimalna brzina homogenizacije V/U emulzije iznosi 15000 obr/min. U prethodnoj studiji V/U emulzije su homogenizovane 3 minuta (63), a u cilju procene uticaja vremena homogenizacije na karakteristike čvrstih farmaceutskih oblika na bazi gastroretentivnih nosača ispitivan je uticaj ovog parametra na dva nivoa (3 minuta i 6 minuta).



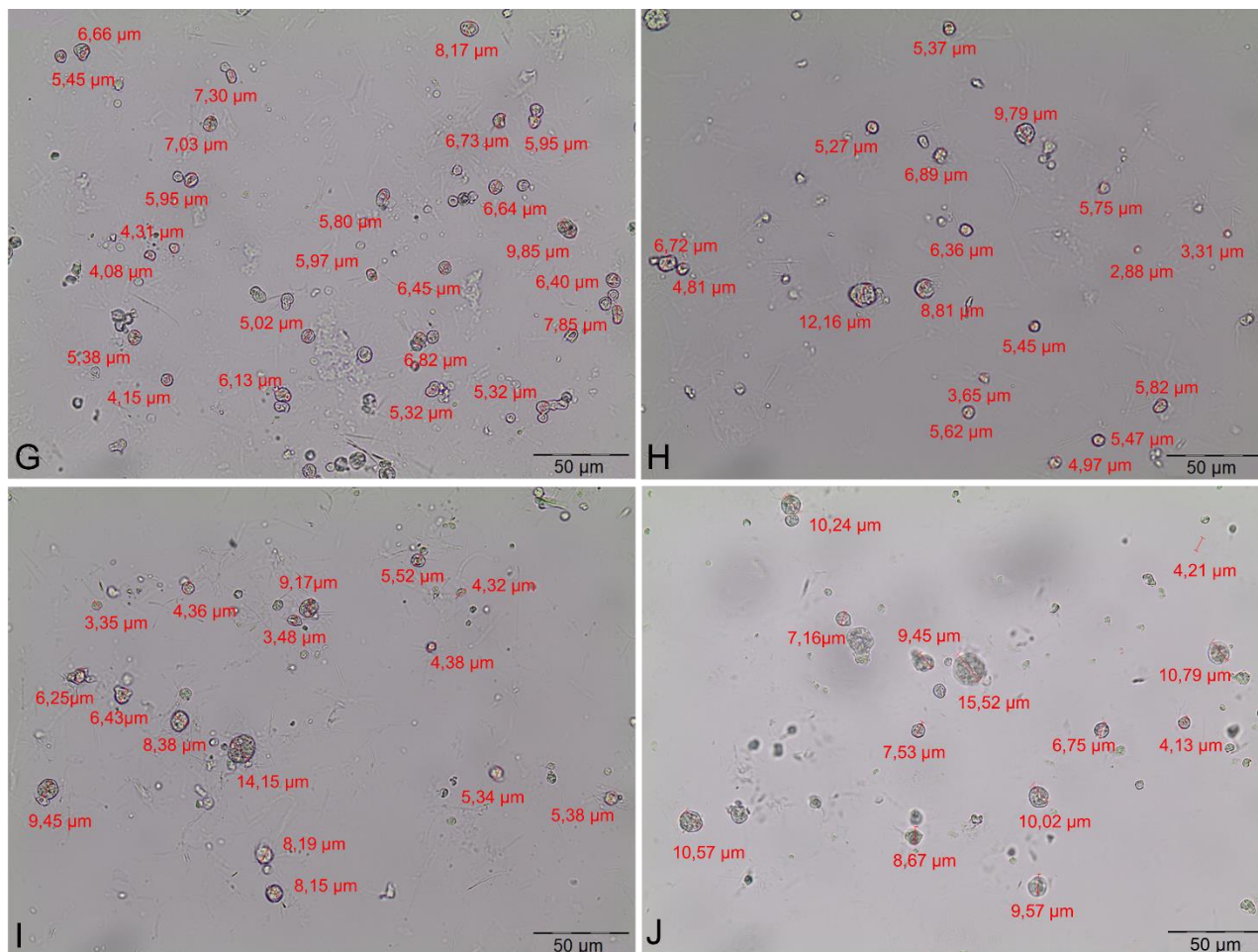
Slika 39. Ishikawa dijagram.

Tabela 25. Matrica procene rizika za gastroretentivne kapsule i tablete.

CQA	Atributi materijala							Procesni parametri									
	Udeo čvrstog lipida	Udeo V/U emulgatora	Udeo U/V emulgatora	Udeo trehaloze	Udeo Sylsya [®] 350	Udeo natrijum -alginata	Udeo natrijum -hlorida	Vreme mešanja	Brzina mešanja	Brzina homogenizacije	Vreme homogenizacije	Trajanje liofilizacije	Pritisak liofilizacije	Temperatura liofilizacije	Sila kompresije	Vreme zadržavanja pri kompresiji	Punjenje kapsula
Viskozitet	Srednji	Srednji	Nizak	Srednji	Nizak	Visok	Nizak	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji						
Vreme odlaganja	Srednji	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Nizak	Srednji	Nizak	Visok	Srednji	Nizak
Brzina oslobađanja genciopikrozida	Visok	Srednji	Srednji	Visok	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Visok	Srednji	Srednji	Nizak	Srednji	Srednji	Nizak
Sila adhezije	Nizak	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Visok	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak
Efikasnost inkapsulacije genciopikrozida	Visok	Visok	Visok	Visok	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Srednji	Visok	Visok	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak
Efikasnost inkapsulacije genciopikrozida posle 18 meseci	Srednji	Visok	Visok	Visok	Nizak	Srednji	Srednji	Srednji	Srednji	Visok	Visok	Srednji	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak
Protočnost	Srednji	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak
Sadržaj vlage	Nizak	Nizak	Nizak	Visok	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Srednji	Visok	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak
Disperzibilnost	Nizak	Srednji	Srednji	Srednji	Nizak	Nizak	Nizak	Nizak	Srednji	Srednji	Srednji	Srednji	Srednji	Nizak	Srednji	Srednji	Nizak

3.3.3.2 Karakterizacija emulzije

Formulisane emulzije (G, H, I i J) su imale konzistentno žutu boju i homogen izgled odmah nakon pripreme i nakon sedam dana stajanja u frižideru. Pored toga, nakon testa centrifugiranja svi ispitivani uzorci su bili homogeni i nije uočeno da je došlo do destabilizacije emulzija. pH ispitivanih emulzija bio je u opsegu od 4,39 do 4,46 (Tabela 26). Električna provodljivost analiziranih uzoraka bila je u opsegu od 4,25 do 5,54 $\mu\text{S}/\text{cm}$, što ukazuje da je vodena faza bila spoljna faza emulzija (177). Nastanak dvostrukih (V/U/V) emulzija je potvrđen mikroskopskom analizom u slučaju svih (G – J) uzoraka (Slika 40). Uočeno je da su formulisane dvostruke emulzije sa složenom unutrašnjom strukturom, kao i u slučaju prethodno razmatranih emulzija (poglavlje 3.2.3.1). Ovaj tip dvostrukih emulzija je u literaturi poznat kao tip mikrosfera i za njih je karakteristično da poseduju visoku efikasnost inkapsulacije i dobru stabilnost (127).

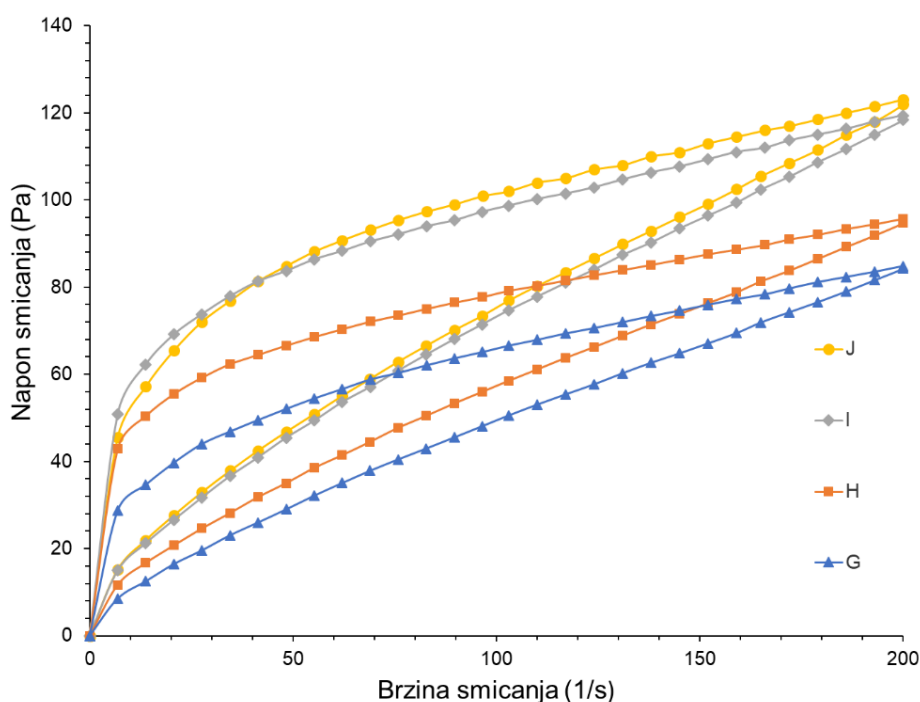


Slika 40. Mikrografije formulisanih emulzija G – J.

Tabela 26. Električna provodljivost, pH, maksimalni prividni viskozitet ($\eta_{\max}$, na $6,9 \text{ s}^{-1}$), minimalni prividni viskozitet ($\eta_{\min}$, na 200 s^{-1}) i histerezna površina (HA) za pripremljene dvostruke emulzija (G – J).

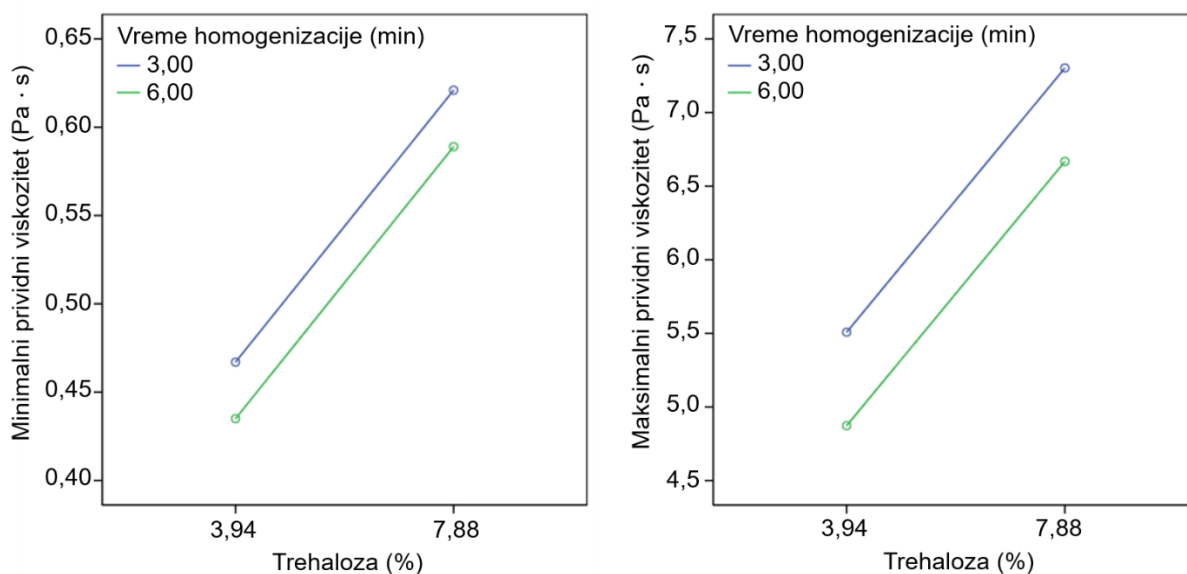
	pH	Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	$\eta_{\max}$ (Pa·s)	$\eta_{\min}$ (Pa·s)	HA (Pa/s)
G	$4,46 \pm 0,18$	$4,25 \pm 0,32$	$4,17 \pm 0,02$	$0,424 \pm 0,007$	2963,45
H	$4,39 \pm 0,11$	$5,54 \pm 0,28$	$6,21 \pm 0,07$	$0,478 \pm 0,008$	3997,54
I	$4,39 \pm 0,09$	$5,21 \pm 0,24$	$7,37 \pm 0,30$	$0,600 \pm 0,044$	4932,91
J	$4,40 \pm 0,13$	$4,78 \pm 0,17$	$6,60 \pm 0,06$	$0,610 \pm 0,006$	4815,73

Na Slici 41 predstavljene su krive proticanja dvostrukih emulzija G, H, I i J na kojima se uočava da ispitivani sistemi pokazuju nenjutnovsko proticanje, tj. pseudoplastično ponašanje. Prisustvo histerezne površine potvrđuje da su svi uzorci pokazali vremenski zavisno – tiksotropno ponašanje. U Tabeli 26 su prikazane izmerene vrednosti maksimalnog prividnog viskoziteta ($\eta_{\max}$), minimalnog prividnog viskoziteta ($\eta_{\min}$) i izračunate vrednosti histerezne površine (HA), koja ukazuje na stepen tiksotropije uzoraka. Prividni viskozitet emulzija opadao je sa povećanjem brzine smicanja, krećući se od maksimalnih do minimalnih vrednosti (Slika 41). Nakon postepenog smanjenja brzine smicanja do 0 s^{-1} , vrednosti prividnog viskoziteta su bile jednake početnim vrednostima. Dakle, u pitanju je vremenski zavisni proces privremenog narušavanja unutrašnje strukture disperzionog sistema i njegovog oporavka nakon prestanka delovanja napona smicanja, pri čemu tiksotropija ukazuje da je proces oporavka bio sporiji od narušavanja strukture (220). Ovaj tip reološkog ponašanja je karakterističan za dvostruke emulzije koje u spoljašnjoj vodenoj fazi sadrže tiksotropni hidrosolubilni polimer (221). S toga se tiksotropni karakter ispitivanih dvostrukih emulzija dovodi u vezu sa natrijum-alginatom, koji je prisutan u spoljašnjoj i unutrašnjoj vodenoj fazi (Tabela 22).



Slika 41. Reogrami uzoraka dvostrukih emulzija G – J.

Poređenjem maksimalne i minimalne vrednosti prividnog viskoziteta ispitivanih dvostrukih emulzija, utvrđeno je da viskozitet raste sledećim redosledom $G < H < J < I$. Površine histereznih petlji su pratile isti trend, krećući se od 2963,45 Pa/s (G) do 4932,91 Pa/s (I). Dakle, formulaciju G karakteriše najmanji stepen destabilizacije polimerne mreže prisutne u spoljašnjoj vodenoj fazi i relativno najbrži oporavak pri uslovima u kojima je izvršeno reološko merenje. Sa druge strane, emulzija I je pokazala najveći stepen destabilizacije polimerne mreže i najsporiji oporavak, iako je koncentracija natrijum-alginata u svim emulzijama bila ista (Tabela 22). Pored toga, uočeno je da su vrednosti minimalnog i maksimalnog prividnog viskoziteta i histerezne površine formulacija G i H sa nižim sadržajem trehaloze (3,94 %) bile niže u poređenju sa formulacijama I i J, koje su sadržale veću koncentraciju trehaloze (7,88 %). Statistička analiza je pokazala da je sadržaj trehaloze bio važan parametar formulacije koji je uticao na minimalni prividni viskozitet ($p < 0,0001$) i maksimalni prividni viskozitet ($p = 0,004$), kao što je prikazano na Slici 42. Sa druge strane, vreme nije značajno uticalo na ispitivane parametre ($p = 0,215$; $p = 0,054$, poštujući redosled).

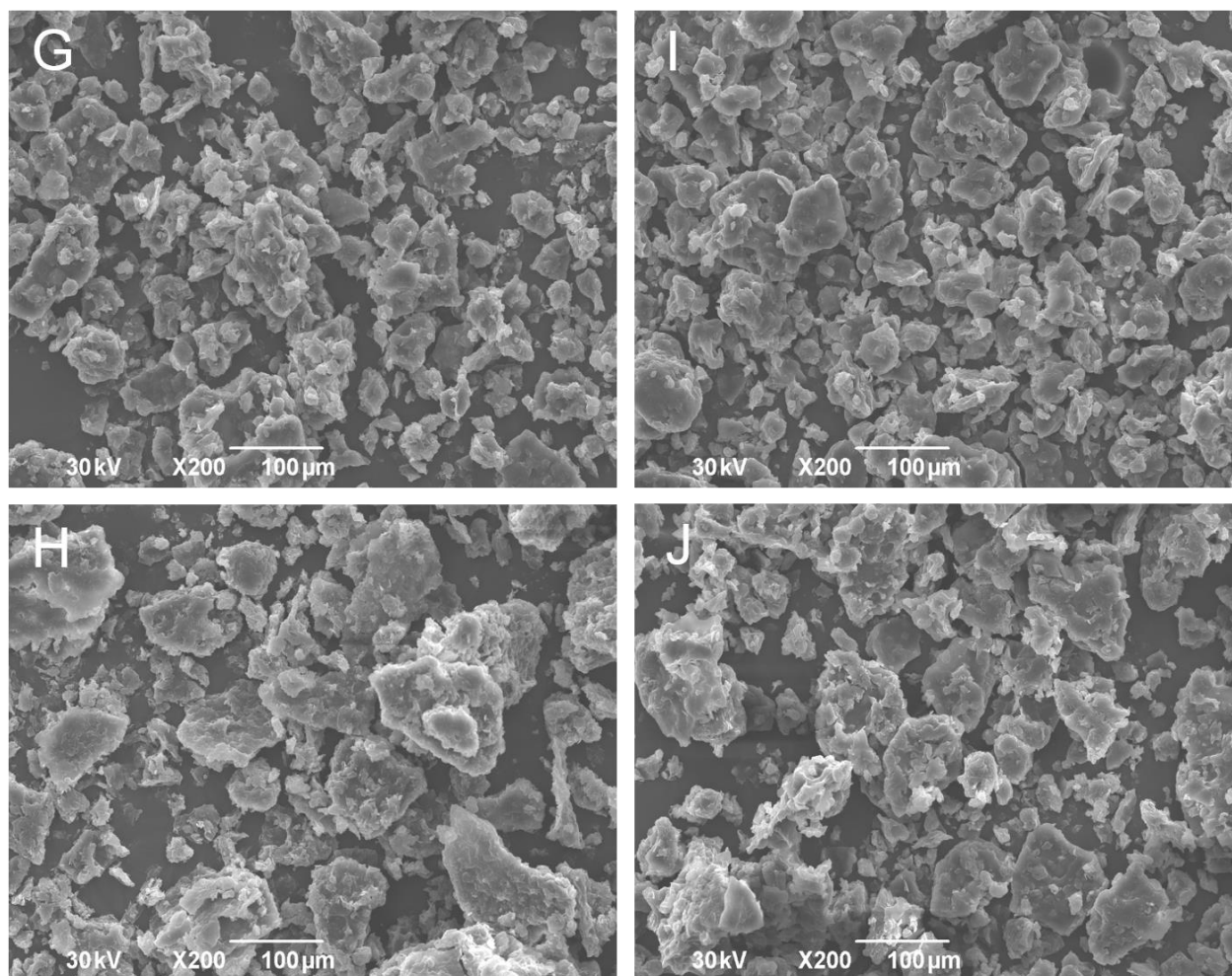


Slika 42. Uticaj trehaloze na minimalni i maksimalni prividni viskozitet.

Domian i sar. (222) su pokazali da su U/V emulzije sa trehalozom u opsegu koncentracija od 6 do 26 % bile nenjutnovske tečnosti pseudoplastičnih osobina u ispitivanom opsegu brzina smicanja, što je bilo u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za ispitivane dvostruke emulzije G – J. Literaturni podaci pokazuju da u vodenim rastvorima, kao i u spoljašnjoj vodenoj fazi U/V emulzija, trehaloza formira vodonične veze sa vodom iznad i ispod temperature staklastog prelaza (T_g) (223,224). Trehaloza, kao disaharid sa najvišom temperaturom staklastog prelaza, ostaje u staklastom stanju u širem opsegu temperatura, te viskozitet navedenih sistema ostaje relativno visok (225). Može se pretpostaviti da trehaloza formira matriks šećer-voda stvaranjem vodoničnih veza u spoljašnjoj vodenoj fazi ispitivanih dvostrukih emulzija, posebno pri većem sadržaju trehaloze u formulacijama I i J, što je dovelo do viših vrednosti prividnog viskoziteta u poređenju sa formulacijama G i H.

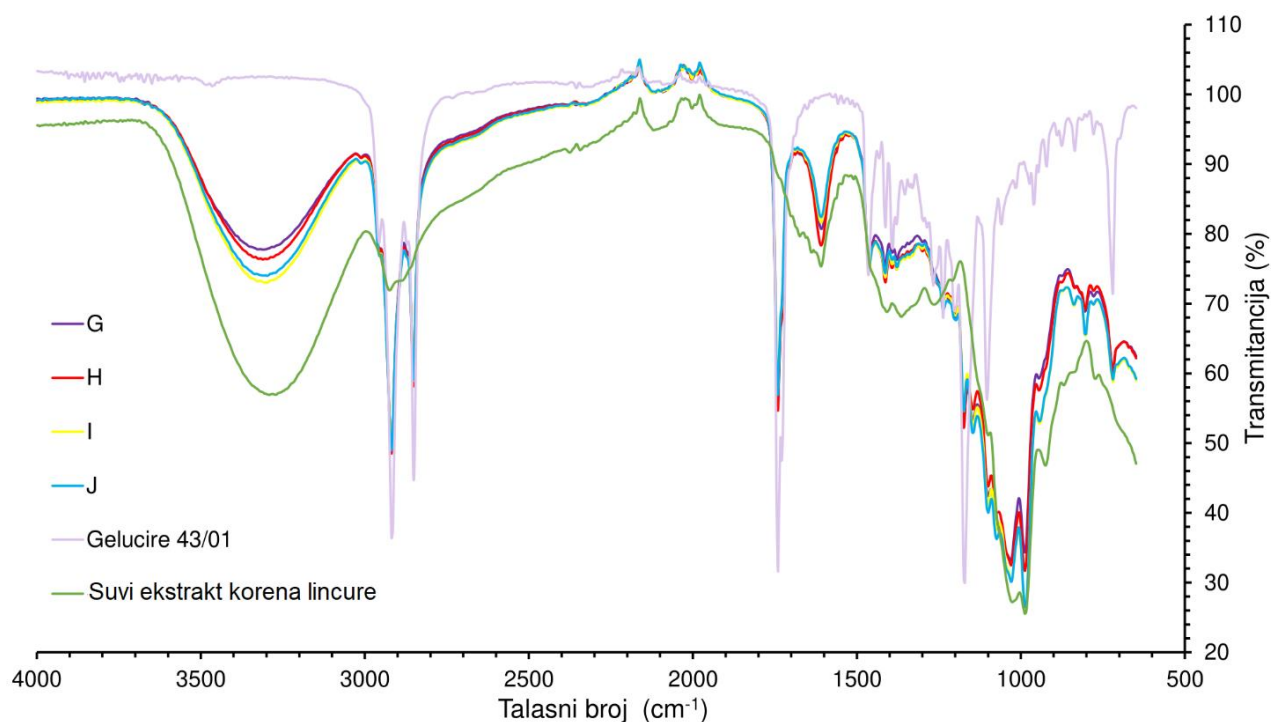
3.3.3.3 Karakterizacija praškovova

Praškovi (G – J) pripremljeni liofilizacijom dvostrukih emulzija bili su žuti i homogeni. Na osnovu SEM mikrofografija utvrđeno je da su dobijeni amorfni praškovi, pri čemu je veličina čestica bila ispod 1000 μm , što sugeriše da su razvijene čvrste lipidne mikročestice (Slika 43). Oblik čestica je podsećao na pahuljice, izbrazdanih ivica sa poroznom strukturom. Kao što je ranije objašnjeno, ovakav oblik čestica je uobičajen za praškove dobijene liofilizacijom i naknadnim mlevenjem, dok se pore formiraju usled sublimacije kristala leda (179,180).



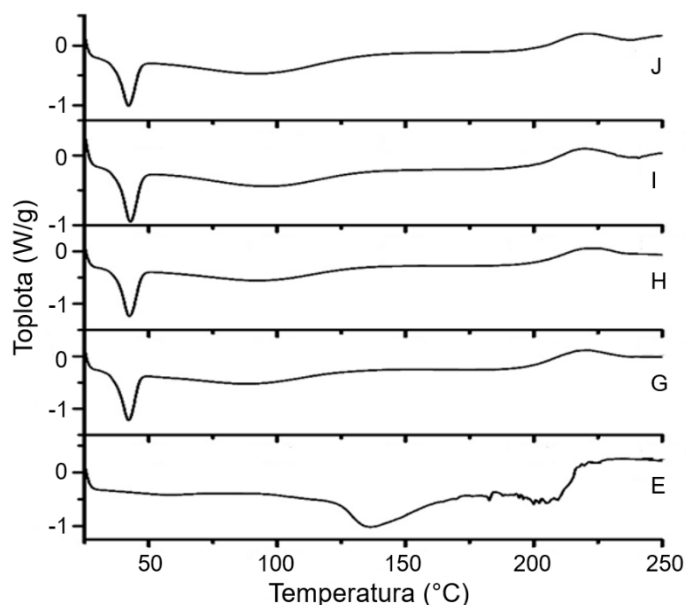
Slika 43. SEM mikrofografije praškova G – J.

Na FT-IR spektru ekstrakta korena lincure se uočava nekoliko reprezentativnih apsorpcionih traka, koje odgovaraju dominantnim bioaktivnim jedinjenjima. Tačnije, uočava se apsorpciona traka usled vibracionih rastezanja -OH grupe na 3272 cm^{-1} , dok su pikovi na $2929\text{--}2896\text{ cm}^{-1}$ karakteristični za vibracije istezanja C-H grupe. Zona istezanja dvostruke veze ($\text{C}=\text{O}$ i $\text{C}=\text{C}$) uključuje pikove u oblasti talasnih dužina od 1729 cm^{-1} do 1606 cm^{-1} , što ukazuje na prisustvo karbonilnih funkcionalnih grupa i aromatičnih veza koje su karakteristične za sekoiridoide i iridoide prisutne u ekstraktu korena lincure (226). Intenzivni apsorpcioni pikovi sa centrom na 1025 cm^{-1} i 987 cm^{-1} mogu se pripisati C-O istezanju skeleta glukoze (227). Na FT-IR spektru praškova (G – J) prisutne su reprezentativne vibracije karakteristične kako za ekstrakt korena lincure, tako i za Gelucire[®] 43/01 (Slika 44). Međutim, promene u intenzitetu nekoliko karakterističnih apsorpcionih traka ekstrakta korena lincure sugerišu prisustvo interakcija između hidroksilnih i karbonilnih funkcionalnih grupa glavnih bioaktivnih jedinjenja ekstrakta korena lincure i ekscipijenasa. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim rezultatima jer je pokazano da $\text{C}=\text{O}$ grupa može da formira vodonične veze sa OH grupama Gelucire[®] 43/01 (228).



Slika 44. FT-IR spektri ekstrakta korena lincure, Gelucire®-a 43/01 i praškova (G – J).

Na Slici 45 je prikazan DSC termogram liofilizovanog ekstrakta korena lincure na kome se uočava širok endotermni pik na temperaturi u opsegu od 130 °C do 140 °C, što odgovara temperaturi topljenja genciopikrozida (229), dok se pikovi na temperaturama preko 170 °C javljaju usled razlaganja prisutnih jedinjenja. Termogrami praškova G – J su vrlo slični, sa karakterističnim ostrim pikom na temperaturi oko 42 °C, što je i očekivano s obzirom da se u navedenom temperaturnom opsegu topi Gelucire® 43/01. Kod praškova G – J se ne uočavaju pikovi koji potiču od trehaloze ili ekstrakta korena lincure. Ovi podaci navode na zaključak da su komponente homogeno dispergovane u amorfnom obliku i da prilikom liofilizacije nije došlo do kristalizacije ispitivanih uzoraka.



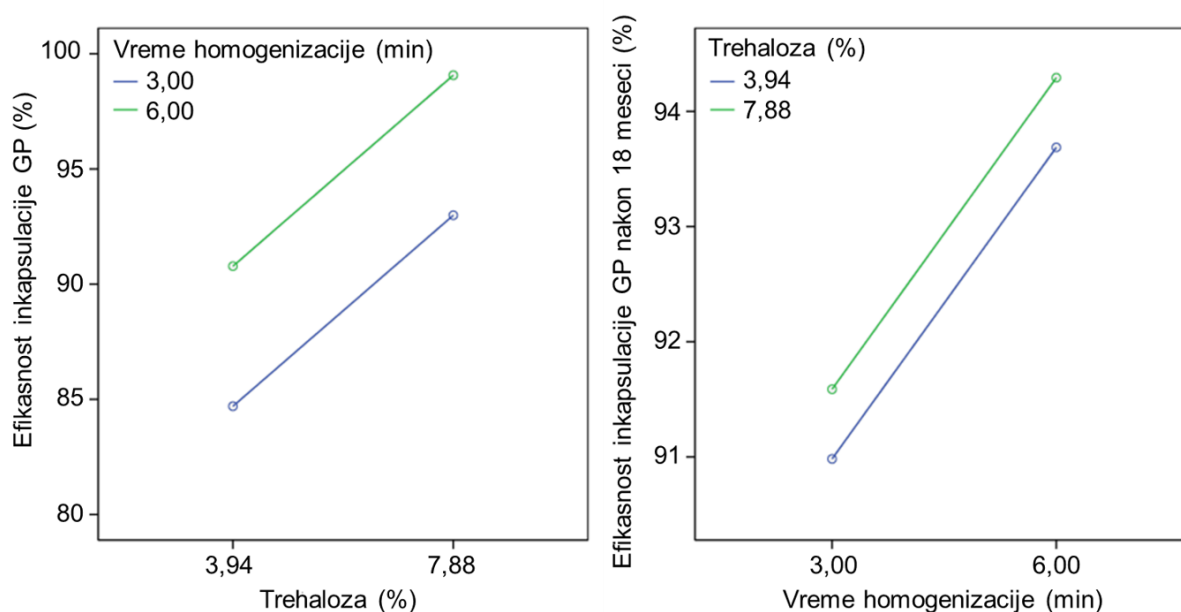
Slika 45. DSC termogram suvog ekstrakta korena lincure i praškova (G – J)

U Tabeli 27 su predstavljeni rezultati koji se odnose na efikasnosti inkapsulacije, prinos, protočnost, sposobnost flotiranja, sadržaj vlage i stabilnost ispitivanih praškova. Stabilnost praškova je razmotrena sagledavajući rezultate efikasnosti inkapsulacije posle 18 meseci i antioksidativnu aktivnost posle 12 meseci.

Tabela 27. Karakteristike praškova – efikasnost inkapsulacije, efikasnost inkapsulacije posle 18 meseci prinos, *Carr*-ov indeks, *Hausner*-ov odnos, vreme odlaganja (t_{lag}), vreme flotiranja (t_{flot}), sadržaj vlage i antioksidativni kompozitni indeks (ACI).

	Efikasnost inkapsulacije (%)	Efikasnost inkapsulacije posle 18 meseci (%)	Prinos (%)	<i>Carr</i>-ov indeks (%)	<i>Hausner</i>-ov odnos	Sadržaj vlage (%)	t_{lag} (s)	t_{flot} (h)	ACI – 12 meseci (%)
G	95,13 ± 0,68	94,34 ± 1,31	92,31 ± 2,11	13,53 ± 0,23	1,16 ± 0,01	6,23 ± 1,04	0	> 6	89,82
H	80,35 ± 1,36	90,33 ± 1,22	94,88 ± 3,16	12,92 ± 0,42	1,14 ± 0,02	7,16 ± 0,52	0	> 6	95,20
I	94,72 ± 0,75	93,64 ± 1,23	90,56 ± 1,79	13,50 ± 0,51	1,16 ± 0,01	7,70 ± 0,41	0	> 6	89,61
J	97,34 ± 0,29	92,24 ± 1,40	92,64 ± 1,94	13,35 ± 0,34	1,15 ± 0,02	8,00 ± 0,63	0	> 6	86,45

Svi praškovi (G – J) su dobijeni u visokom prinosu. Takođe, efikasnost inkapsulacije genciopikrozida bila je veoma visoka u slučaju formulacija G, I i J, dok je formulacija H bila okarakterisana nešto nižom efikasnošću inkapsulacije (Tabela 27). Ovi podaci pokazuju da je genciopikrozid, iako nestabilno i izrazito hidrofilno jedinjenje, uspešno inkapsuliran u čvrste lipidne mikročestice, što znači da su odabrani odgovarajući formulacioni i procesni parametri. Kao što je ranije rečeno, Gelucire® 43/01 je lipid heterogene prirode koji je uspešno korišćen kao lipidna komponenta u formulaciji lipidnih mikro/nanočestica i flotirajućih sistema. Pored toga, PGPR i lecitin su pogodni emulgatori, jer je pokazano da ova kombinacija emulgatora može da omogući visoku efikasnost inkapsulacije i stabilnost dvostrukih emulzija zbog komplementarnih reoloških svojstava (171). Dobijeni rezultati pokazuju da je sadržaj trehaloze ($p = 0,020$) imao pozitivan uticaj na efikasnost inkapsulacije genciopikrozida (Slika 46), dok vreme homogenizacije nije značajno uticalo ($p = 0,068$). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim zapažanjima, s obzirom da je pokazano da kada je krioprotektant prisutan u višoj koncentraciji dolazi do formiranja debljeg sloja krioprotektanta što rezultuje povećanom efikasnošću inkapsulacije u slučaju čvrstih lipidnih mikročestica dobijenih postupkom liofilizacije (230).

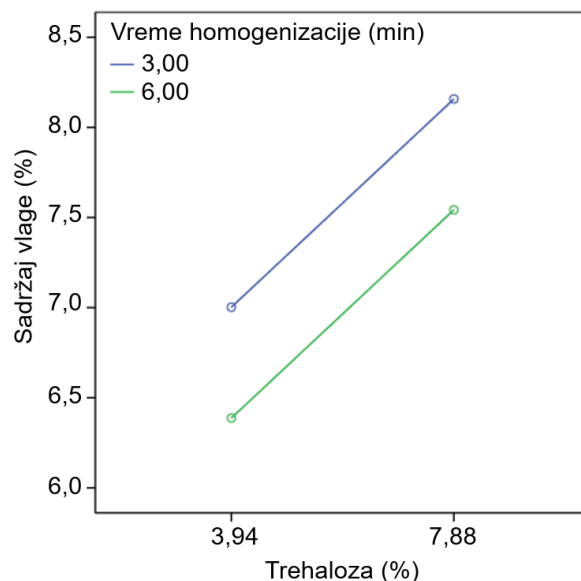


Slika 46. Uticaj trehaloze na efikasnost inkapsulacije genciopikrozida (GP) i vremena homogenizacije na efikasnost inkapsulacije genciopikrozida nakon 18 meseci čuvanja.

Rezultati pokazuju da je nakon 18 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi sadržaj genciopikrozida bio manji za 5,66 do 9,67 % (Tabela 27), pri čemu je vreme homogenizacije ($p < 0,0001$) imalo pozitivan uticaj na sadržaj genciopikrozida (Slika 46), dok uticaj koncentracije trehaloze nije bio značajan ($p = 0,221$). Može se pretpostaviti da je duže trajanje procesa homogenizacije doprinelo inkorporiranju ekstrakta lincure u V/U/V emulzije i posledično u matriks čestica, što je doprinelo boljoj zaštiti inkorporiranog genciopikrozida. Takođe, poređena je antioksidativna aktivnost tečnog ekstrakta korena lincure sa antioksidativnom aktivnošću formulisanih praškova nakon 12 meseci skladištenja. Rezultati su pokazali da je ACI bio u rasponu od 86,45 % do 95,20 %, što sugerise da je antioksidativna aktivnost ekstrakta očuvana tokom procesa izrade i skladištenja.

Sadržaj vlage je bio u rasponu od 6,23 % do 8,00 %. Praškovi G i H, odlikovali su se nižim sadržajem vlage, što je bilo očekivano s obzirom da se manje viskozne emulzije bolje suše (144). Pokazano je da je sadržaj trehaloze ($p = 0,016$) značajno uticao na sadržaj vlage u prašku (Tabela 27), tj. da je sa porastom sadržaja trehaloze rastao i sadržaj vlage (Slika 47), dok uticaj vremena homogenizacije ($p = 0,150$) nije primećen. Takođe, ranija istraživanja pokazuju da je sa porastom

viskoziteta emulzija rastao sadržaj vlage i u praškovima dobijenim nakon sušenja raspršivanjem (231).



Slika 47. Uticaj trehaloze na sadržaj vlage u praškovima dobijenim nakon sušenja V/U/V emulzija.

Primećeno je da su sva četiri praška odmah nakon kontakta sa medijumom plutala i ostajali su na površini i nakon 6 sati. Sa druge strane, suvi ekstrakt korena lincure se rastvarao odmah nakon kontakta sa istim medijumom. Kao što je ranije objašnjeno, ovaj rezultat se može dovesti u vezu sa niskom gustinom i hidrofobnošću ispitivanih praškova, s obzirom da je u njihov sastav ulazio Gelucire® 43/01, čvrsti lipid vrlo niske gustine. Pored toga, porozna struktura praškova koja se uočava na mikrografijama (Slika 43) mogla je da doprinese njihovoj sposobnosti da plutaju. Iako je niska gustina važna karakteristika flotirajućih praškova, poznato je da u isto vreme niska gustina može negativno uticati na protočnost praškova i njihovu procesabilnost (232). Sposobnost praškova da dobro protiču je važna kako bi se obezbedilo adekvatno punjenje tokom proizvodnje, što posledično utiče na doziranje finalnog proizvoda. Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 27, sva četiri praška (G, H, I i, J) su se odlikovala dobrom protočnošću prema klasifikaciji Ph. Eur. 11.0 (38), dok je suvi ekstrakt korena lincure imao lošiju protočnost (*Carr*-ov indeks 21,64; *Hausner*-ov odnos 1,28). Takođe, primećeno je da sadržaj trehaloze ($p = 0,398$) i vreme homogenizacije ($p = 0,126$) nisu imali značajan uticaj na *Carr*-ov indeks. Isti trend je uočen i u slučaju *Hausner*-ovog odnosa, jer uticaj sadržaja trehaloze ($p = 0,582$) i vremena homogenizacije ($p = 0,121$) nije bio značajan.

3.3.3.4 Karakterizacija tableta

U cilju procene mukoadhezivnosti, friabilnosti, kao i sposobnosti tableta da flotiraju (vreme odlaganja, vreme flotiranja) izvršena je karakterizacija, a rezultati su predstavljeni u Tabeli 28. Pored toga, prikazani su profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta i praćen je srednji hidrodinamički prečnik i indeks polidisperznosti tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta.

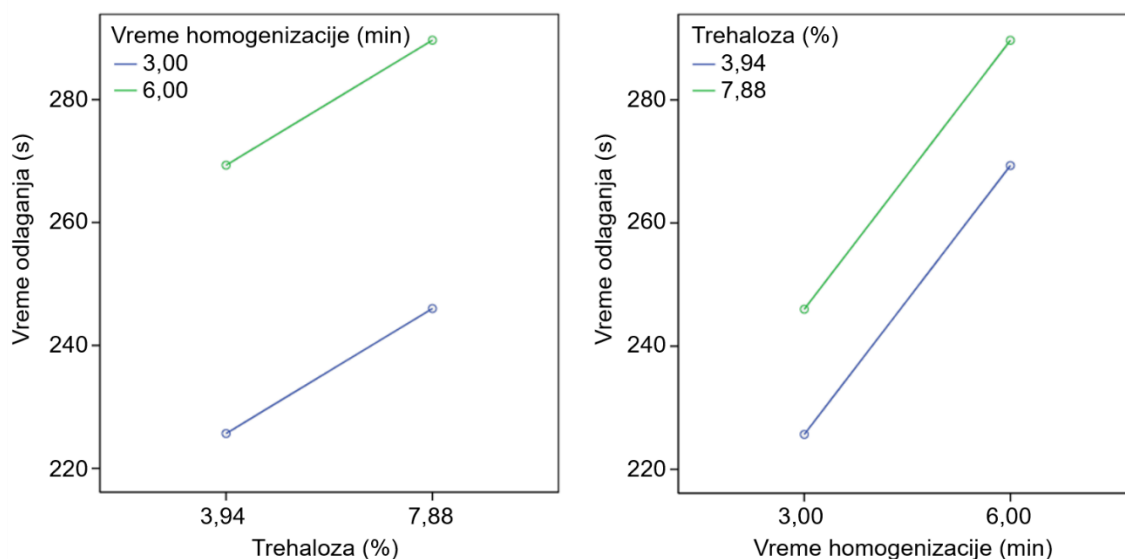
Tabletama dobijenim direktnom kompresijom praškova G – J bilo je potrebno više od 15 minuta da počnu da flotiraju, iako su praškovi od kojih su tablete izrađene plutali odmah nakon kontakta sa medijumom. Poznato je da prilikom tabletiranja usled delovanja sile kompresije dolazi do porasta gustine i posledično sporijeg vlaženja tableta. Kako bi dobili tablete odgovarajućih karakteristika sa vremenom odlaganja koje je kraće od 5 minuta, ispitana je mogućnost korišćenja komponenti koje obezbeđuju efervescenciju (natrijum-bikarbonat, kalcijum-karbonat) i polimera sa sposobnošću bubrenja, kao što su hipromeloza, natrijum-alginat i natrijum-kroskarmeloza. Dodatak

natrijum-bikarbonata u koncentraciji od 7,5 % značajno je smanjio vreme odlaganja (Tabela 28). Sa druge strane, vreme odlaganja je bilo duže od 15 minuta u slučaju tableta pripremljenih sa dodatkom jedne od pomoćnih supstanci (kalcijum karbonata/hipromeloze/natrijum-alginata/natrijum-kroskarmeloze) u koncentraciji 7,5 %. Takođe, primećeno je da tablete sa većim sadržajem natrijum-bikarbonata (10 %) nisu bile optimalnih karakteristika jer je dolazilo do lepljenja između klipa i tablete. Ranije su Thapa i Jeong (212) izvestili da se sa povećanjem količine natrijum-bikarbonata vreme odlaganja smanjuje, ali i zatezna čvrstoća tableta. Stoga je ispitana friabilnost formulisanih tableta sa natrijum-bikarbonatom (7,5 %) i utvrđeno je da je friabilnost svih formulacija tableta (G – J) bila ispod 1 %, što ukazuje da su tablete odgovarale zahtevima Ph. Eur. 11.0 (38) i da mogu da izdrže stres tokom rukovanja i transporta (Tabela 28). Iz navedenih razloga formulacije sa 7,5 % natrijum-bikarbonata su odabrane kao optimalne i dalje su analizirane.

Tabela 28. Karakteristike tableta – friabilnost, vreme odlaganja (t_{lag}), vreme flotiranja (t_{flot}), sila adhezije ($F_{adhezije}$) tableta (G – J); srednji hidrodinamički prečnik (z_{ave}), indeks polidisperznosti (PdI) uzoraka dobijenih nakon *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta nakon 15 minuta i 6 sati.

	Friabilnost (%)	t_{lag} (s)	t_{flot} (h)	$F_{adhezije}$ (N)	$Zave_{15 min}$ (nm)	PdI_{15min}	$Zave_{6 h}$ (nm)	PdI_{6 h}
G	0,51	275 ± 12	> 6	$1,18 \pm 0,35$	$521,40 \pm 71,99$	$0,530 \pm 0,193$	$529,70 \pm 6,30$	$0,520 \pm 0,052$
H	0,43	220 ± 10	> 6	$1,23 \pm 0,41$	$428,23 \pm 45,68$	$0,517 \pm 0,141$	$642,47 \pm 16,93$	$0,530 \pm 0,059$
I	0,60	284 ± 12	> 6	$1,05 \pm 0,33$	$578,90 \pm 112,81$	$0,611 \pm 0,223$	$707,60 \pm 24,94$	$0,558 \pm 0,114$
J	0,61	251 ± 7	> 6	$1,12 \pm 0,54$	$480,45 \pm 29,77$	$0,620 \pm 0,006$	$521,27 \pm 18,53$	$0,485 \pm 0,071$

Uočeno je da sadržaj trehaloze ($p = 0,015$) ima značajan uticaj na vreme odlaganja. Bilo je evidentno da se sa povećanjem sadržaja trehaloze povećava vreme odlaganja, što se može objasniti visokom relativnom gustinom trehaloze ($1,22 \text{ g/cm}^3$). Takođe, vreme homogenizacije ($p < 0,0001$) je značajno pozitivno uticalo na vreme odlaganja, što navodi na pretpostavku da je vreme homogenizacije uticalo na distribuciju lipida i/ili gustinu/porozitet praškova (Slika 48). Važno je napomenuti da su sve ispitivane formulacije (G – J) plutale duže od 6 sati.



Slika 48. Uticaj koncentracije trehaloze i vremena homogenizacije na vreme odlaganja.

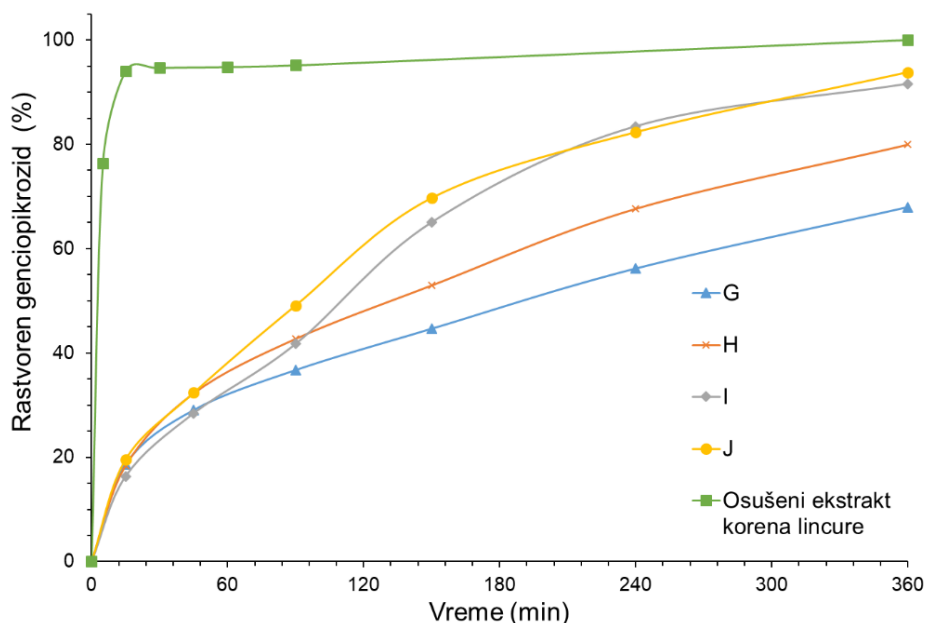
Ispitivane tablete (G – J) su pokazale i mukoadhezivna svojstva, a formulacije su se odlikovale prosečnom silom adhezije većom od 0,94 N (Tabela 28), što sugerise da su razvijene flotirajuće gastroretentivne tablete sa mukoadhezivnim svojstvima (Slika 49). Sadržaj trehaloze ($p = 0,609$) i vreme homogenizacije ($p = 0,797$) nisu značajno uticali na silu adhezije.



Slika 49. Razvijene tablete sa dualnim mehanizmom gastroretencije poseduju mukoadhezivna svojstva i flotiraju tokom *in vitro* testa.

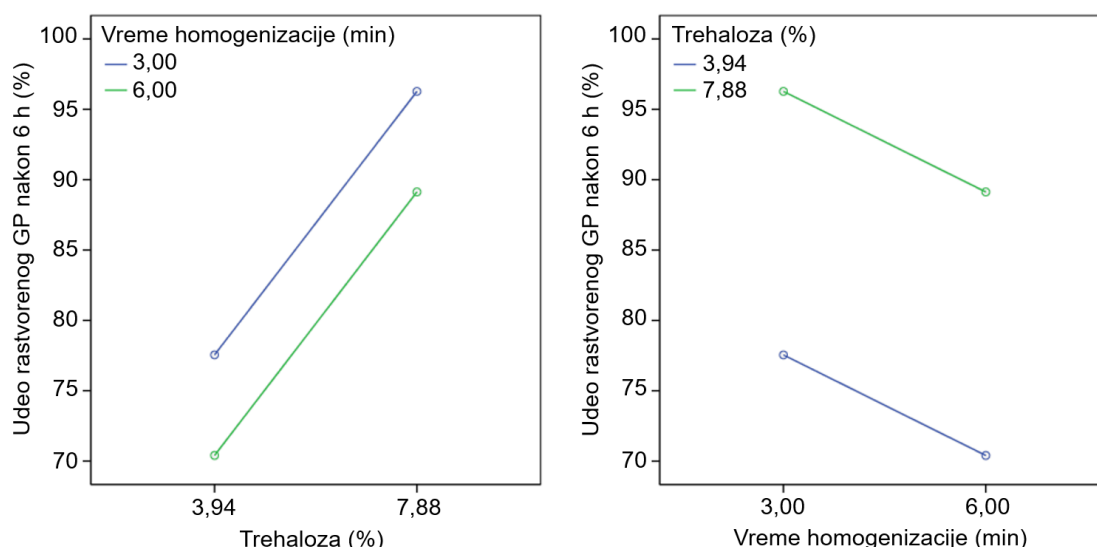
Profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz gastroretentivnih tableta u koje je inkapsuliran ekstrakt korena lincure, kao i iz suvog ekstrakta korena lincure u obliku praška predstavljeni su na Slici 50. Genciopikrozid je brzo rastvoren iz suvog ekstrakta korena lincure. S druge strane, ispitivane tablete su se odlikovale bifaznim oslobađanjem, pri čemu u toku prvih 15 minuta dolazi do brzog oslobađanja genciopikrozida, dok se nakon toga u drugoj fazi odvija produženo oslobađanje. Naglo

oslobađanje aktivne supstance, tzv. *burst* efekat u prvoj fazi može se dovesti u vezu sa poroznom strukturom čestica, kao i prisustvom genciopikrozida na površini čestica. Tačnije, moguće je da je usled delovanja sila kompresije prilikom tabletiranja došlo do „migracije“ genciopikrozida iz matriksa na površinu čestica. Produženo oslobađanje u drugoj fazi ukazuje na to da je ekstrakt korena lincure uspešno inkapsuliran u čvrste lipidne mikročestice. Isti trend je uočen i kod tableta bez natrijum-bikarbonata ispitivanih u okviru prethodne eksperimentalne faze. Međutim, primećeno je da je sporije oslobađanje postignuto u slučaju formulacija sa natrijum-bikarbonatom (G, H, I i J) nego u tabletama bez njega (A, B, C, D). Pokazano je da natrijum-bikarbonat može da smanji brzinu oslobađanja visoko rastvorljivih aktivnih jedinjenja usled formiranja CO₂, koji biva zarobljen u sloju gela, čime se ometa difuzija aktivnih jedinjenja iz matriksa (212).



Slika 50. Profili brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta (G – J) i praška suvog ekstrakta korena lincure.

Na prikazanim profilima uočava se da je oslobađanje genciopikrozida iz tableta G i H bilo sporije u odnosu na tablete I i J, koje su sadržale veći udeo trehaloze. Rezultati pokazuju da sadržaj trehaloze nije značajno uticao na oslobađanje genciopikrozida u prvih 45 minuta ($p = 0,925$), dok je pozitivan uticaj sadržaja trehaloze ($p < 0,0001$) na brzinu oslobađanja genciopikrozida primećen posle 6 sati (Slika 51). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim saznanjima, s obzirom da je utvrđeno da povećanje sadržaja trehaloze pozitivno utiče na oslobađanje levonorgestrela iz implantabilnih PLGA mikroiglica (215). Razmatrajući ovaj parametar treba uzeti u obzir i da je sadržaj Gelucire®-a 43/01 u tabletama G i H bio veći nego u tabletama I i J (Tabela 22), a poznato je da se brzina oslobađanja bioaktivnih jedinjenja smanjuje sa povećanjem sadržaja lipida zbog povećane debljine lipidnog matriksa u čvrstim lipidnim česticama (233).



Slika 51. Uticaj koncentracije trehaloze i vremena homogenizacije na udeo oslobođenog genciopikrozida iz tableta nakon 6 sati tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja.

Vreme homogenizacije ($p = 0,222$) nije značajno uticalo na udeo oslobođenog genciopikrozida tokom prvih 15 minuta. S druge strane, pokazano je da je vreme homogenizacije značajno negativno ($p = 0,051$) uticalo na udeo oslobođenog genciopikrozida nakon 6 sati, tj. da se genciopikrozid sporije oslobađao iz formulacija koje su duže homogenizovane (Slika 51). Može se pretpostaviti da je duže trajanje procesa homogenizacije doprinelo inkorporiranju ekstrakta korena lincure u V/U/V emulzije i posledično u matriks čestica, čime je omogućeno sporije oslobađanje genciopikrozida. Pored toga, poređenjem profila na osnovu faktora sličnosti (f_2) zaključeno je da su sadržaj trehaloze i vreme homogenizacije značajno uticali na brzinu oslobađanja genciopikrozida iz tableta (Tabela 29).

Tabela 29. Faktori sličnosti izračunati poređenjem profila brzina oslobađanja formulacija tableta (G – J) i ekstrakta korena lincure u obliku praška.

Referentni uzorak	Test uzorak	f_2 (faktor sličnosti)
Suvi ekstrakt korena lincure	G	14,36
Suvi ekstrakt korena lincure	H	16,79
Suvi ekstrakt korena lincure	I	17,65
Suvi ekstrakt korena lincure	J	19,52
G	H	54,40
G	I	38,35
G	J	36,13
H	I	50,87
H	J	47,82
I	J	68,00

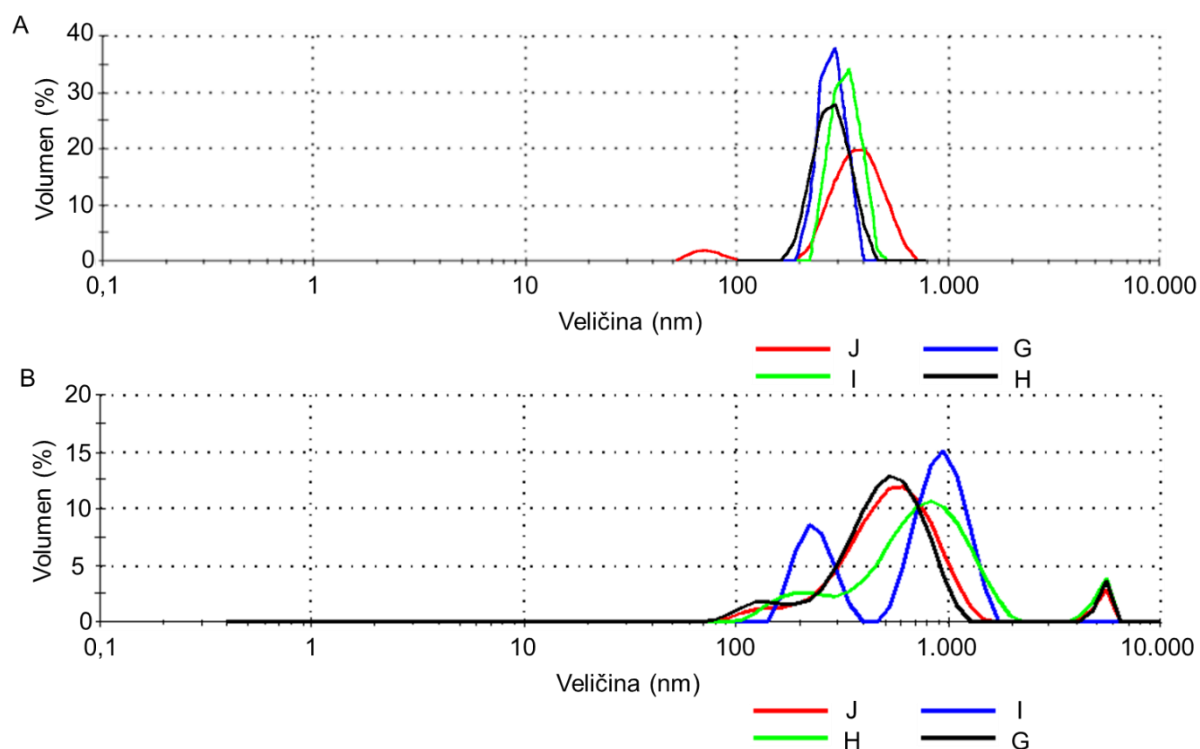
Korsmeyer-Peppas model je bio najprikladniji model za opisivanje kinetike oslobađanja genciopikrozida iz svih ispitivanih formulacija tableta (G, H, I i J). EkspONENT modela (n) bio je ispod 0,45 za tabletnu formulaciju G, što ukazuje da je difuzija genciopikrozida proporcionalna koncentraciji (Fikova difuzija). U slučaju tableta H, I i J eksponent modela (n) bio je u opsegu od 0,45 do 0,57 što znači da je prisutan kombinovani uticaj difuzionih i erozivnih mehanizama (anomalni transport), pri čemu je difuzija dominantan mehanizam oslobađanja genciopikrozida iz formulisanih tableta. Literaturni podaci pokazuju da se kinetika oslobađanja aktivnih jedinjenja iz lipidnih sistema

koji su formulisani u obliku tableta najčešće opisuje upravo *Korsmeyer-Peppas* modelom, pri čemu se difuzija navodi kao osnovni mehanizam koji obezbeđuje oslobađanje aktivnih jedinjenja (123).

Table 25. Korelacioni koeficijenti matematičkih modela kojima se opisuje kinetika oslobađanja genciopikrozida iz tableta (G – J) i eksponent modela (n).

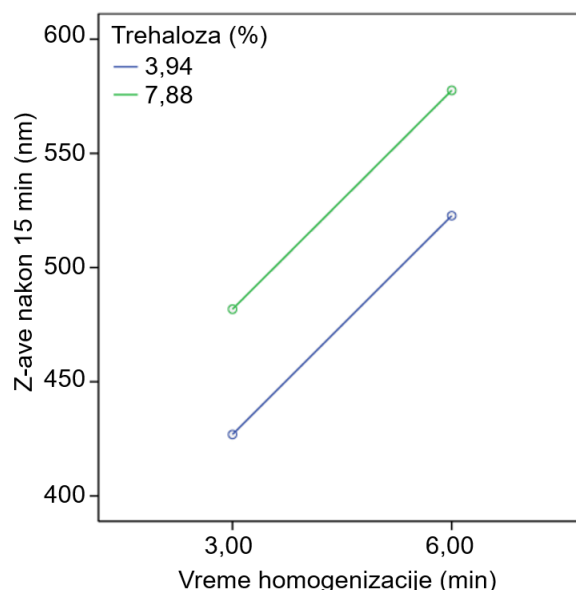
	Koeficijent korelacije (R^2)				n
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	
G	0,8778	0,8558	0,9925	0,9960	0,4061
H	0,8909	0,8190	0,9971	0,9976	0,4607
I	0,9075	0,8070	0,9828	0,9881	0,5787
J	0,8826	0,7862	0,9901	0,9916	0,5217

Takođe, analizirana je i veličina nanoasocijata formiranih tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta (Slika 52), jer bi prisustvo nanoasocijata na bazi lipida i surfaktanata u medijumu moglo da bude značajno sa aspekta povećanja apsorpcije, a samim tim i biološke raspoloživosti inkapsuliranih bioaktivnih jedinjenja (200).



Slika 52. Raspedela veličina kapi formiranih asocijata tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz G – J tableta: A) nakon 15 minuta; B) nakon 6 sati.

Nakon 15 minuta formirani su nanoasocijati čija veličina je bila u rasponu od 428,23 nm do 578,90 nm, dok su nanoasocijati formirani nakon 6 sati bila nešto veći (Tabela 28). Vreme homogenizacije je imalo značajan pozitivan uticaj ($p = 0,038$) na veličinu formiranih nanoasocijata nakon 15 minuta (Slika 53), dok uticaj koncentracije trehaloze ($p = 0,197$) nije bio značajan. Uticaj vremena homogenizacije ($p = 0,487$) nije bio značajan nakon 6 sati, kao ni uticaj koncentracije trehaloze ($p = 0,590$). Pored toga, PdI je bio u rasponu od 0,517 do 0,620; što znači da je je distribucija bila široka i da su eventualno formirani asocijati imali neujednačenu veličinu. Rezultati su pokazali da koncentracija trehaloze ($p = 0,330$), kao ni vreme homogenizacije ($p = 0,985$) nisu uticali na PdI formiranih nanoasocijata nakon 15 minuta, a ni nakon 6 sati ($p = 0,938$; $p = 0,498$, navedenim redosledom).

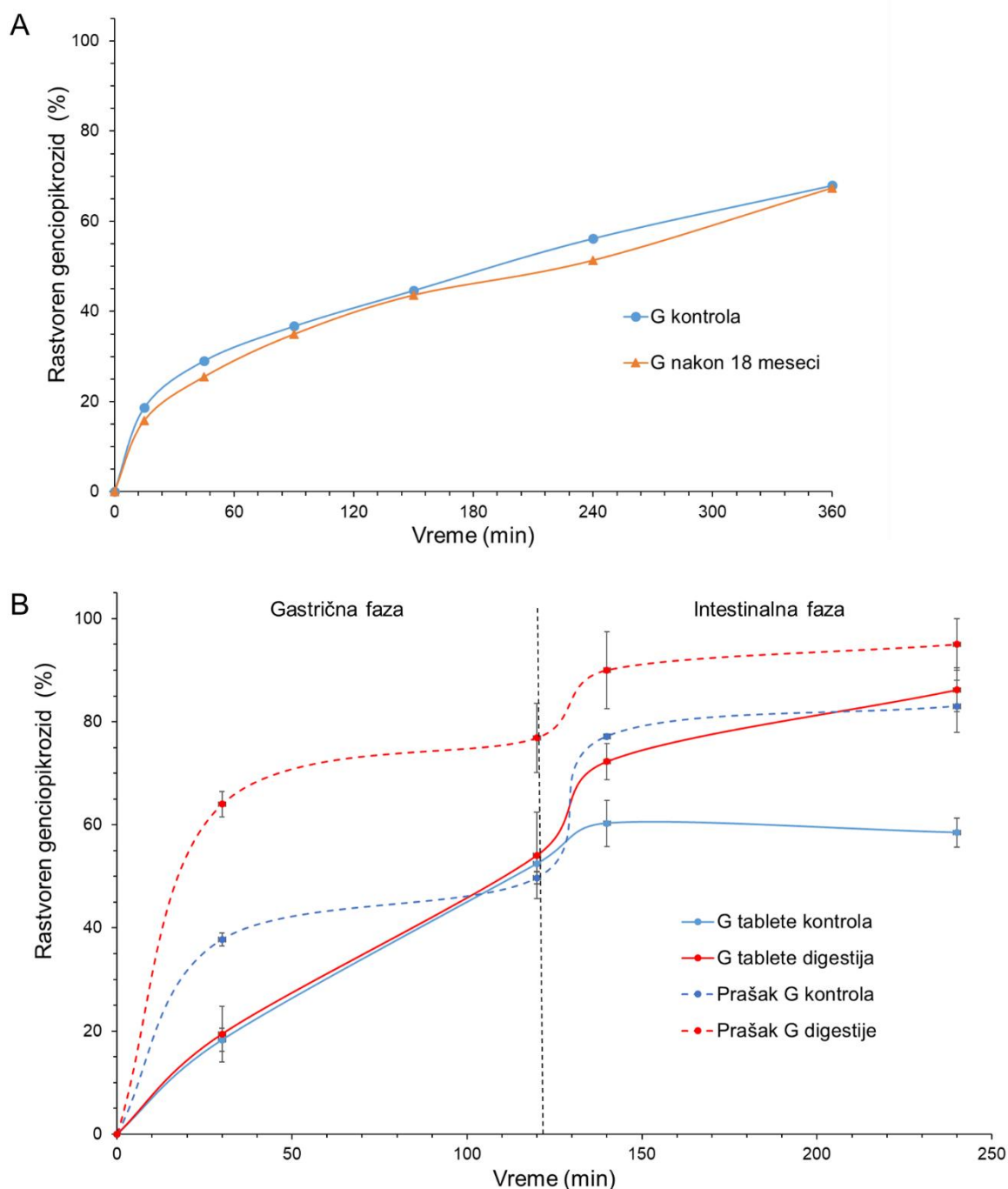


Slika 53. Uticaj vremena homogenizacije na hidrodinamički prečnik asocijata (z-ave) formiranih tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta.

Uzimajući u obzir sve prikazane rezultate, evidentno je da je dizajniran robusna metoda kojom se mogu dobiti tablete na bazi gastroretentivnih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure. Formulacija tablete G je odabrana kao optimalna, pošto je viskozitet emulzije G bio najmanji, kao i sadržaj vlage u prašku G. Rezultati su pokazali da je prašak G imao veoma visoku efikasnost inkapsulacije genciopikrozida, kao i visok sadržaj genciopikrozida nakon 18 meseci skladištenja. Pored toga, sadržaj ekstrakta korena lincure je bio veći u ovoj formulaciji nego u formulacijama I i J. Sila adhezije, vreme odlaganja, kao i vreme flotiranja bili su u skladu sa definisanim zahtevima, šta znači da su formulisane tablete sa gastroretentivnim svojstvima. Konačno, oslobađanje genciopikrozida iz ove formulacije je bilo najsporije i bilo je kontrolisano difuzijom.

Stoga, kako bi se dalje procenila stabilnost optimalne formulacije tablete, ispitana je brzina oslobađanja genciopikrozida iz tableta formulacije G nakon 18 meseci. Faktor sličnosti f_2 (72,10) je ukazao da profil oslobađanja genciopikrozida nije bio značajno različit nakon 18 meseci skladištenja od početnog profila oslobađanja (Slika 54A).

S obzirom da su lipidne formulacije supstrati za digestivne lipaze proces varenja može značajno uticati na njihova svojstva, te su tablete formulacija G podvrgnute *in vitro* digestiji. U većini *in vitro* modela ne ispituje se uticaj gastričnih lipaza, jer se pretpostavlja da je pankreasna lipaza glavni enzim uključen u lipolizu. Međutim, poznato je da se 10–30 % lipolize triglicerida vrši pod uticajem gastrične lipaze u želucu (234) i stoga bi ovaj korak mogao biti od velike važnosti u slučaju lipidnih gastroretentivnih formulacija, iako nije razmatran u prethodnim istraživanjima. Rezultati testa digestije za tablete G su predstavljeni na Slici 54B. Poređenjem kontrole i uzoraka podvrgnutih digestiji uočen je uticaj enzima intestinalne faze, dok gastrična faza nije značajno uticala na oslobađanje genciopikrozida, te je zaključeno da je pankreasna lipaza glavni enzim koji utiče na digestiju tableta formulacije G. Međutim, kako je primećeno da se tablete nisu raspale tokom gastrične faze, pretpostavljeno je da je fizička barijera onemogućila aktivnost želudačne lipaze. Kako bi ispitali ovu pretpostavku, prašak istog sastava kao tabletna formulacija G bio je testiran pod istim uslovima, a rezultati su pokazali da su gastrični enzimi uticali na digestiju praška G. Dakle, zaključeno je da je formulisani prašak G sa Gelucire®-om 43/01, kao čvrstim lipidom, PGPR-om kao V/U emulgatorom i lecitinom kao U/V emulgatorom bio supstrat za gastričnu lipazu, ali u slučaju tableta G ovaj uticaj nije primećen jer je fizička barijera onemogućila aktivnost želudačne lipaze.



Slika 54. A) Poređenje brzine oslobađanja genciopikrozida iz tableta nakon izrade (kontrola) i nakon 18 meseci skladištenja; B) Profil brzine oslobađanja iz tableta G tokom *in vitro* digestije.

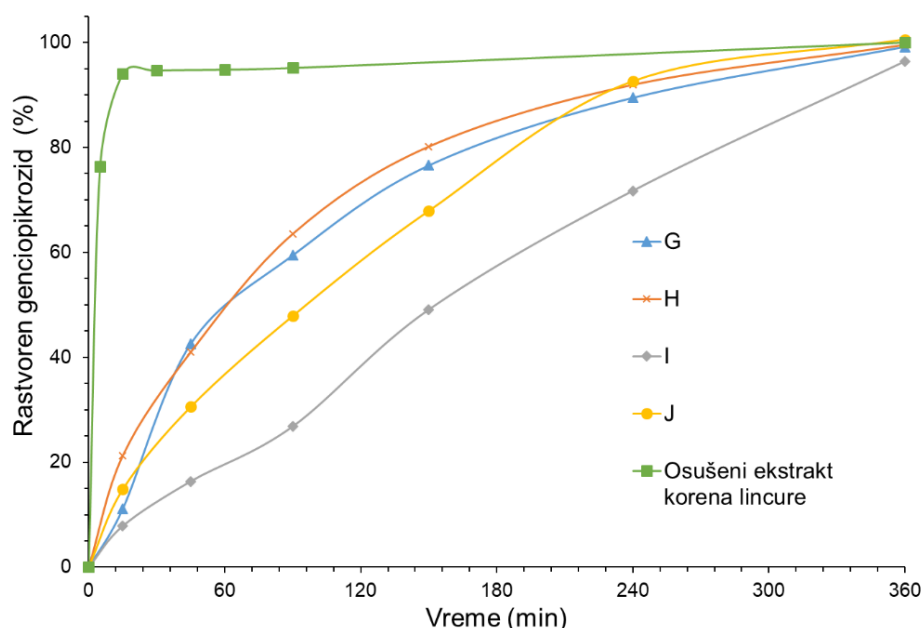
3.3.3.5 Karakterizacija kapsula

Kapsule G, H, I i J analizirane su u cilju procene njihove sposobnosti flotiranja, te je određeno vreme flotiranja i vreme odlaganja, kao i variranje mase kapsula (Tabela 30). Pored toga, ispitana je *in vitro* brzina oslobađanja genciopikrozida iz formulisanih kapsula, pri čemu je analizirana veličina formiranih nanoasocijata.

Tabela 30. Karakteristike kapsula – variranje mase, vreme odlaganja (t_{lag}), vreme flotiranja (t_{flot}) ispitivanih formulacija kapsula (G – J); srednji hidrodinamički prečnik ($z\text{-ave}$) i indeks polidisperznosti (PdI) uzoraka dobijenih nakon *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (G – J) nakon 15 minuta i 6 sati.

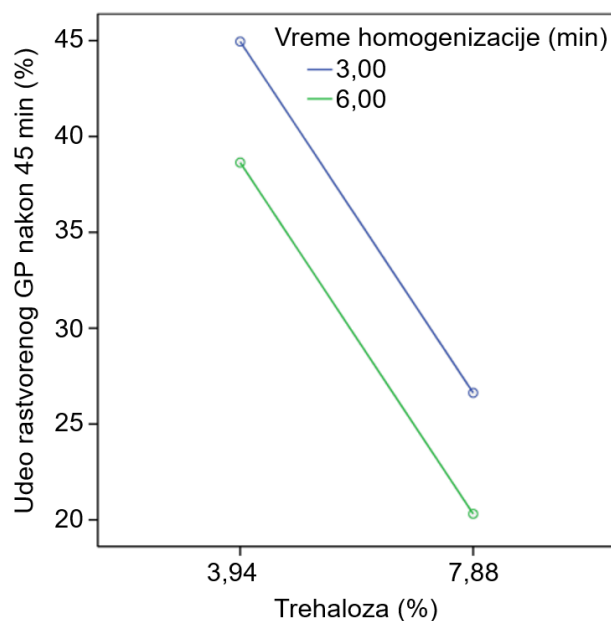
	Variranje mase (g)	t_{lag} (s)	t_{flot} (h)	$Zave_{15\text{ min}}$ (nm)	$PdI_{15\text{ min}}$	$Zave_{6h}$ (nm)	$PdI_{6\text{ h}}$
G	$0,2244 \pm 0,0075$	0	> 6	$388,17 \pm 19,41$	$0,267 \pm 0,011$	$438,97 \pm 20,50$	$0,223 \pm 0,023$
H	$0,2558 \pm 0,0076$	0	> 6	$431,57 \pm 2,85$	$0,177 \pm 0,013$	$445,73 \pm 24,61$	$0,228 \pm 0,030$
I	$0,2859 \pm 0,0073$	0	> 6	$399,77 \pm 23,58$	$0,421 \pm 0,036$	$430,93 \pm 22,95$	$0,237 \pm 0,048$
J	$0,2546 \pm 0,0073$	0	> 6	$424,67 \pm 29,85$	$0,231 \pm 0,009$	$405,77 \pm 25,19$	$0,179 \pm 0,061$

Rezultati su pokazali da je ujednačenost mase kapsula bila u skladu sa zahtevima Ph. Eur. 11.0. Ispitivane kapsule (G, H, I i J) su plutale odmah nakon kontakta sa medijumom i vreme plutanja je bilo duže od 6 sati. Kako su kapsule plutale odmah nakon kontakta sa medijumom nije bilo potrebe za dodavanjem natrijum-bikarbonata kao u slučaju tableta.



Slika 55. Profili brzina oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (G – J) i suvog ekstrakta korena lincure u obliku praška.

Kao i u slučaju tableta, brzina oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (G – J) bila je značajno sporija nego iz praška dobijenog sušenjem ekstrakta korena lincure (Slika 55). Interesantno je da kod formulacija G i H postoji faza naglog oslobađanja, dok se kod formulacija I i J ne uočava ovakvo oslobađanje. Stoga bi se moglo pretpostaviti da je manji sadržaj genciopikrozida bio prisutan na površini čestica u slučaju praškova (I i J) sa višim sadržajem trehaloze i nižim sadržajem ekstrakta, nego u slučaju praškova G i H, što se odrazilo na profile brzine oslobađanja. Primećeno je da je sadržaj trehaloze ($p = 0,001$) imao negativan uticaj na brzinu oslobađanja genciopikrozida u slučaju kapsula nakon 45 minuta (Slika 56), dok vreme homogenizacije nije značajno uticalo ($p = 0,130$). Isti trend nije uočen u slučaju tableta, jer je moguće da je prilikom kompresije došlo do redistribucije inkorporiranog ekstrakta, a samim tim i genciopikrozida. Pored toga, kapsule nisu sadržale natrijum-bikarbonat, koji može da smanji mehaničku otpornost (212). Takođe, moguće je da se kod kapsula ne uočava faza naglog oslobađanja, jer se prašak pri punjenju u kapsule izlaže manjem pritisku nego pri tabletiranju. Primećeno je da su formulacije koje su u svom sastavu imale veći sadržaj trehaloze i manji sadržaj lipida bile manje osetljive na delovanje mehaničkog pritiska koji nastaje pri sabijanju praška u kapsule. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim saznanjima, s obzirom da je pokazano da sa povećanjem udela lipida u praškovima dobijenim sušenjem raspršivanjem U/V emulzija opada njihova kompresibilnost i kompaktilnost (235). Na brzinu oslobađanja genciopikrozida nakon 6 sati nije uticao sadržaj trehaloze ($p = 0,765$), kao ni vreme homogenizacije ($p = 0,436$).



Slika 56. Uticaj koncentracije trehaloze na udeo oslobođenog genciopikrozida iz kapsula nakon 45 minuta ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja.

Poređenjem profila brzine oslobađanja na osnovu faktora sličnosti je zaključeno da su sadržaj trehaloze i vreme homogenizacije značajno uticali na brzinu oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (Tabela 31).

Table 31. Faktori sličnosti izračunati poređenjem profila brzina oslobađanja formulacija kapsula (G – J) i ekstrakta korena lincure u obliku praška.

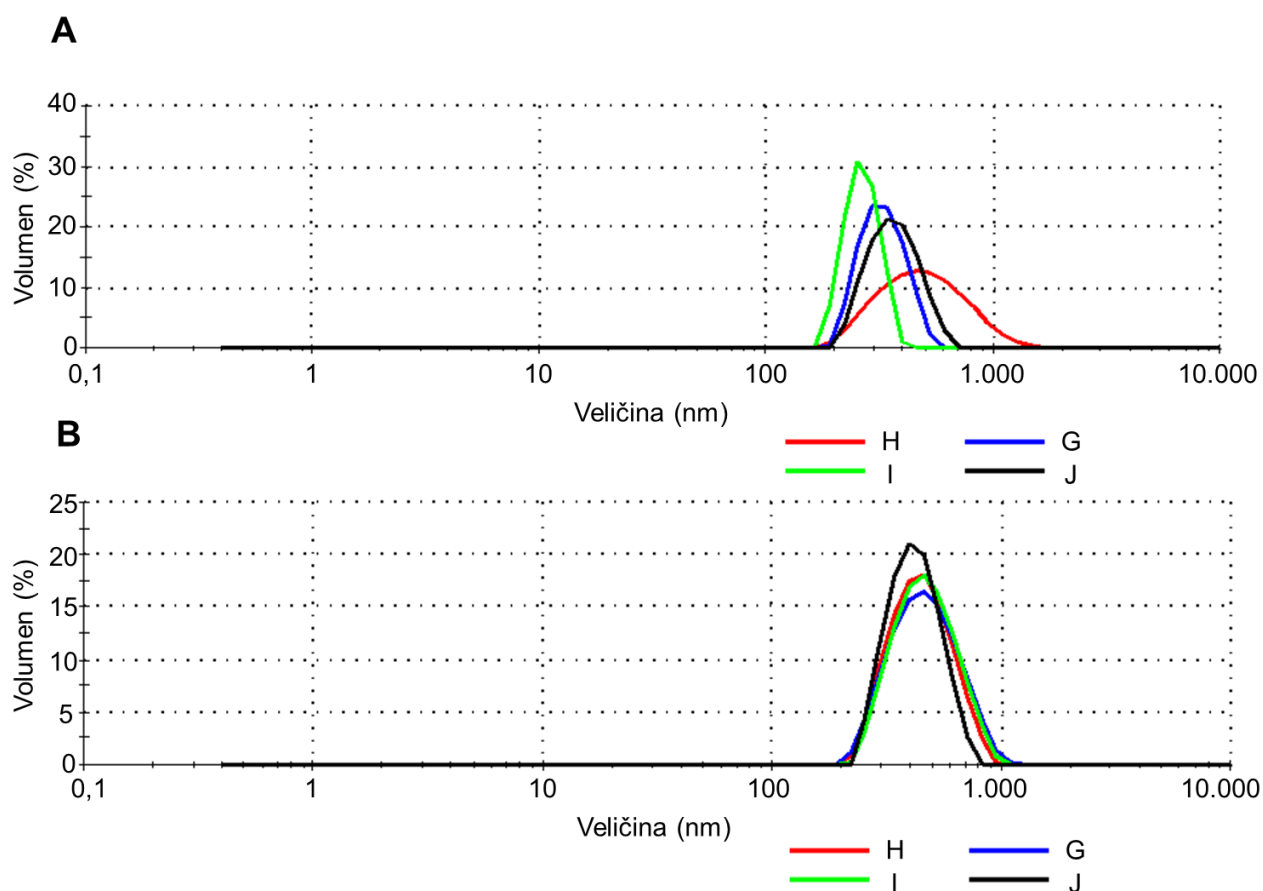
Referentni uzorak	Test uzorak	f_2 (faktor sličnosti)
Suvi ekstrakt korena lincure	G	21,97
Suvi ekstrakt korena lincure	H	23,25
Suvi ekstrakt korena lincure	I	13,08
Suvi ekstrakt korena lincure	J	16,68
G	H	65,27
G	I	33,11
G	J	54,83
H	I	30,79
H	J	50,91
I	J	40,00

Model koji je najbolje opisivao kinetiku oslobađanja genciopikrozida iz formulacija H, I i J bio je *Korsmeyer-Peppas* model, dok se u slučaju kapsula G oslobađanje moglo na najbolji način opisati *Higuchi* modelom (Tabela 32). Formulacije kapsula su okarakterisane vrednošću eksponenta modela koji je bio u rasponu od 0,49 do 0,83; što ukazuje na kombinovani uticaj difuzionih i erozivnih mehanizama.

Table 32. Korelacioni koeficijenti matematičkih modela kojima se opisuje kinetika oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (G – J) i eksponent modela (n).

	Korelacioni koeficijent (r^2)				n
	Nulti red	Prvi red	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	
G	0,8429	0,6062	0,9695	0,9112	0,6520
H	0,8332	0,7283	0,9759	0,9783	0,4866
I	0,994	0,8845	0,9364	0,9932	0,8276
J	0,9242	0,8009	0,9835	0,9925	0,6147

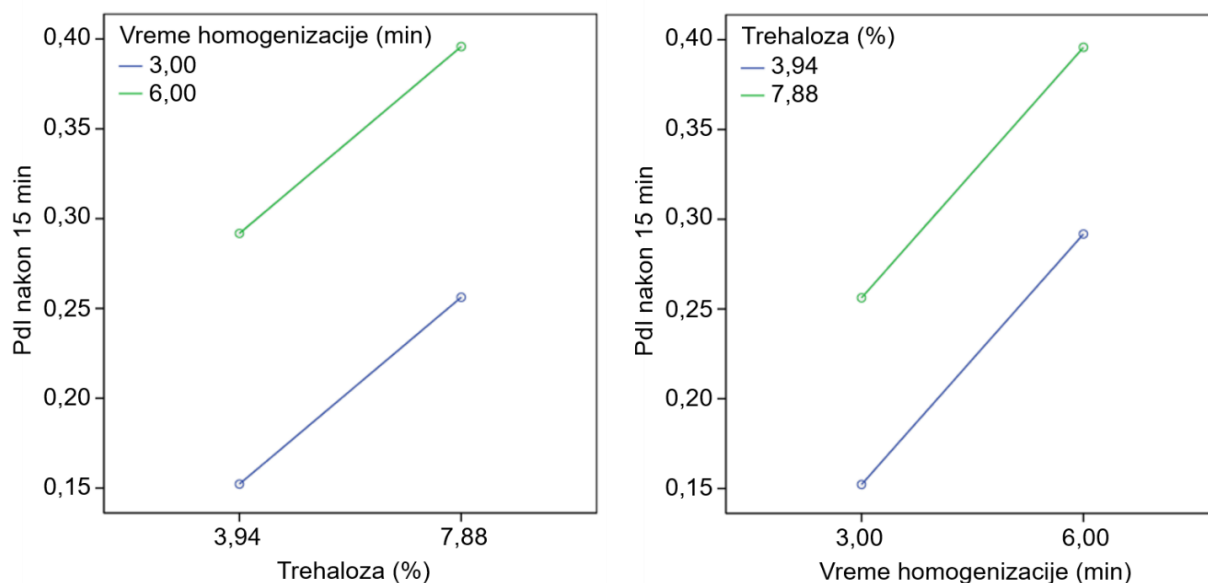
Nanoasocijati dispergovani u medijumu tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula H (PdI = 0,177) i J (PdI = 0,231) imali su ujednačenu veličinu, s obzirom da je PdI nakon 15 minuta bio manji od 0,250, dok je nakon 6 sati PdI svih formulacija bio u opsegu od 0,179 do 0,237 (Slika 57).



Slika 57. Raspodela veličina kapi formiranih asocijata tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula (G – J): A) nakon 15 minuta; B) nakon 6 sati.

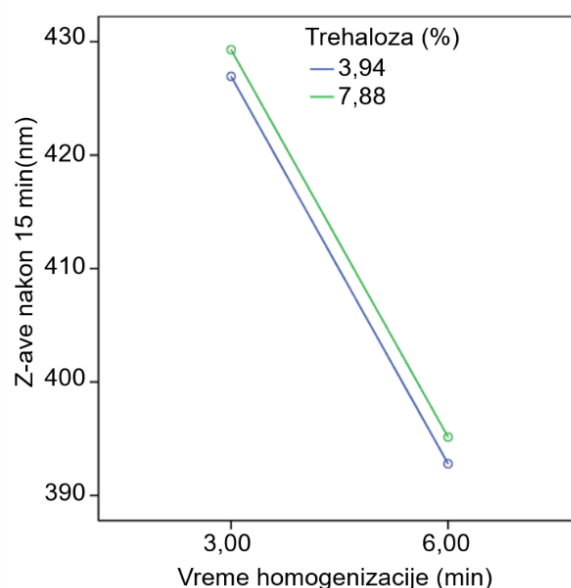
Primećeno je da je vreme homogenizacije imalo značajan ($p < 0,0001$) pozitivan uticaj na PdI formiranih nanoasocijata nakon 15 minuta, što znači da je pri dužoj homogenizaciji došlo do smanjenja homogenosti uzorka. Poznato je da pri suviše dugoj homogenizaciji V/U/V emulzija može doći do koalescencije usled smanjenja veličine kapi i povećanja slobodne površine, što vodi ka destabilizaciji uzorka (171). Pored toga, u okviru ispitivanih vrednosti, trehaloza ($p = 0,001$) je imala značajan pozitivan uticaj na PdI u toku prvih 15 minuta (Slika 58). Rezultati pokazuju da na PdI formiranih nanoasocijata nakon 6 sati nisu značajno uticali ni vreme homogenizacije ($p = 0,331$) ni koncentracija trehaloze ($p = 0,512$). U poređenju sa prethodno analiziranim tabletama, koje su pored formulisanog praška, istog sastava kao kod kapsula, sadržale i natrijum-bikarbonat, primećeno je da su vrednosti PdI disperzija nastalih tokom rastvaranja kapsula bile evidentno manje. Na osnovu

prikazanih rezultata može se pretpostaviti da je do porasta vrednosti PdI kod tableta došlo usled uticaja sile kompresije. Ranije je primećeno da u slučaju SMEDDS (samo-mikroemulgujući sistemi) praškova sila primenjena tokom procesa tabletiranja može da utiče na povećanje veličine dispergovanih kapi, a samim tim i na PdI (236).



Slika 58. Uticaj koncentracije trehaloze i vremena homogenizacije na indeks polidisperznosti (PdI) formiranih asocijata tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula.

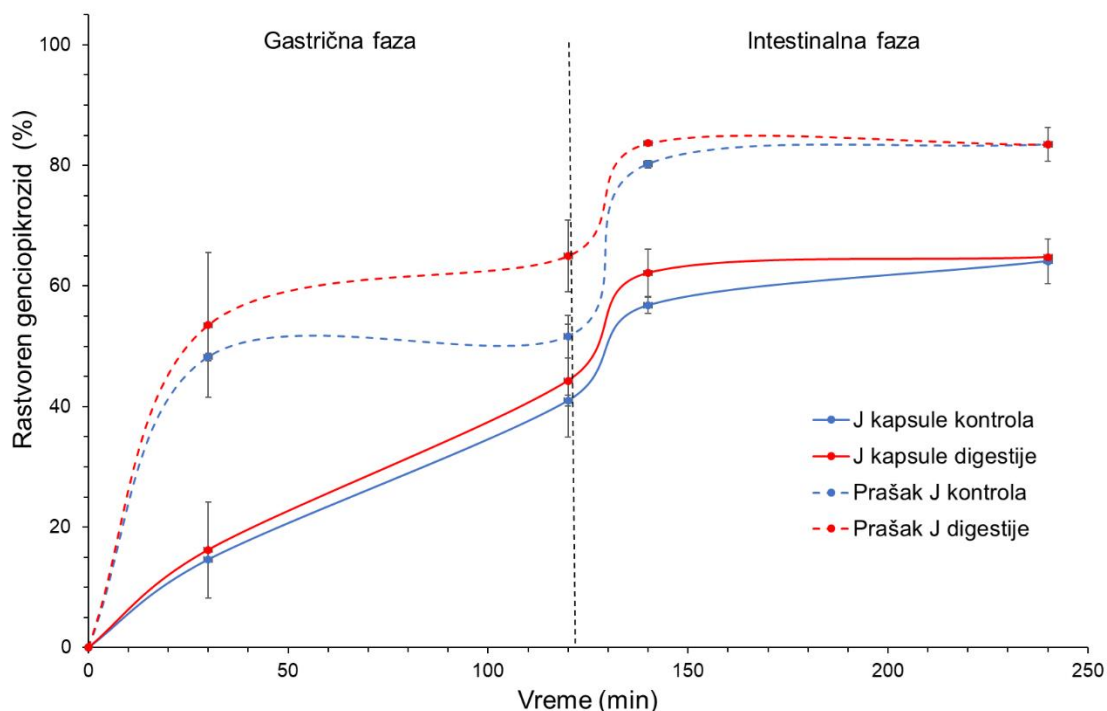
Veličina nanoasocijata formiranih nakon 15 minuta bila je u rasponu od 388,17 nm do 431,57 nm, dok su nakon 6 sati dimenzije formiranih nanoasocijata bili u opsegu od 405,77 nm do 445,73 nm (Tabela 30). Vreme homogenizacije ($p = 0,020$) je imalo značajan negativan uticaj na prosečnu veličinu formiranih nanoasocijata nakon 15 minuta (Slika 59), dok uticaj koncentracije trehaloze ($p = 0,850$) nije bio značajan. Kako je vreme homogenizacije nakon 15 minuta značajno negativno uticalo na prosečnu veličinu, a pozitivno na PdI, jasno je da je tokom homogenizacije došlo do smanjenja veličine kapi i posledičnog povećanja PdI usled porasta slobodne površine. Rezultati pokazuju da koncentracija trehaloze ($p = 0,116$) i vreme homogenizacije ($p = 0,522$) nisu uticali na veličinu kapi nakon 6 sati.



Slika 59. Uticaj vremena homogenizacije na hidrodinamički prečnik asocijata (z-ave) formiranih tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula.

Na osnovu prikazanih rezultata, formulacija kapsula J je izabrana kao adekvatna, s obzirom da je prašak J imao visoku efikasnost inkapsulacije, kao i visok prinos, dobru protočnost i stabilnost. Pored toga, postignuto je usporeno oslobađanje genciopikrozida iz ove formulacije, pri čemu je formirana homogena disperzija nanoasocijata. Takođe, primećeno je da su kapsule flotirale odmah nakon kontakta sa medijumom i flotacija je trajala duže od 6 sati.

Rezultati *in vitro* digestije ukazuju da enzimi kako гастриčne, tako i intestinalne faze nisu uticali na oslobađanje genciopikrozida iz kapsula J, jer se na Slici 60 ne uočavaju razlike u brzini oslobađanja genciopikrozida iz kontrolnog uzorka (bez enzima) i uzorka u kome je praćen uticaj enzima. Kako bi ustanovili da li je prisustvo želatinske kapsule uticalo na proces digestije, ispitan je prašak J pod istim uslovima. Pokazano je da je prašak J bio supstrat za želudačnu lipazu, dok se uticaj pankreasne lipaze ne uočava, najverovatnije zbog toga što je došlo do oslobađanja maksimalne količine genciopikrozida koja je bila dostupna nakon 240 minuta. Ovaj podatak navodi na zaključak da je želatin prisutan u čauri kapsule uticao na profil oslobađanja genciopikrozida u toku *in vitro* digestije. Ranije je uočeno da je želatin uticao na digestiju artemisina prisutnog u listovima slatkog pelina (*Artemisia annua* L., *Asteraceae*) tokom *in vitro* digestije, pri čemu je primećeno je da želatin ne intereaguje sa artemisinom dok se ne podvrgne digestiji (237). Poznato je da kod želatinskih kapsula može doći i do sporijeg oslobađanja usled prisustva aldehida ili surfaktanata, koji mogu dovesti do umrežavanja proteina prisutnih u želatinskoj kapsuli (238).



Slika 60. Profil brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula J i praška J tokom *in vitro* digestije.

Kako su u sastav formulacija G i J ulazile iste lipidne komponente (Gelucire® 43/01, lecitin, poliglicerol-poliricinoleat), može se zaključiti da su formulisani praškovi supstrati za želudačnu i pankreasnu lipazu. Međutim, očigledno je da je izbor farmaceutskog oblika značajno uticao na brzinu oslobađanja genciopikrozida tokom *in vitro* digestije.

4. ZAKLJUČAK

4.1 Zaključci prve faze istraživanja

U ovoj fazi istraživanja razvijen je efikasan metod ekstrakcije kojim je bilo moguće iz korena lincure istovremeno ekstrahovati visok sadržaj genciopikrozida, dominantnog sekoiridoidnog jedinjenja, izogentizina, predstavnika iz grupe ksantona, i ukupnih polifenola.

U fazi skrininga korišćenjem *Plackett-Burman* dizajna ispitan je uticaj većeg broja faktora (odnos droga/rastvarač, koncentracija etanola, veličina čestica, vreme, temperatura, mešanje, pretretman mikrotalasima). Kao ključni parametri izabrani su temperatura, vreme, odnos droga/rastvarač, koncentracija etanola, te je njihov uticaj dalje praćen u fazi optimizacije korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna, dok su rezultati analizirani primenom metodologije površine odgovora (RSM) i veštačkih neuronskih mreža (ANN).

Primenom RSM, zaključeno je da je visok prinos genciopikrozida, izogentizina i fenolnih jedinjenja moguće ekstrahovati korišćenjem etanola koncentracije 49 % (v/v) pri temperaturi od 65 °C, kada je odnos droga/rastvarač 1:40, a trajanje ekstrakcije iznosi 129 minuta. Adekvatnost modela potvrđena je izvođenjem ekstrakcije pod optimalnim uslovima, pri čemu je utvrđeno da postoji slaganje između predviđenih (16,82 mg/g droge; 8,59 mg/g droge; 17,26 mg GAE/g droge) i eksperimentalno (18,03 mg/g droge; 8,15 mg/g droge; 17,46 mg GAE/g droge) dobijenih vrednosti prinosa genciopikrozida, izogentizina i sadržaja ukupnih polifenola, navedenim redom.

U cilju razvoja modela sa boljim sposobnostima predviđanja u odnosu na modele razvijene RSM pristupom korišćena je ANN metodologija. Poređenjem srednje vrednosti kvadratne greške (RMSE) i koeficijenta determinacije zaključeno je da razvijeni ANN model sa visokom preciznošću vrši predviđanje sadržaja genciopikrozida ($R^2_{ANN} = 0,99$; $RMSE_{ANN} = 0,36$), izogentizina ($R^2_{ANN} = 0,99$; $RMSE_{ANN} = 0,20$) i sadržaja ukupnih polifenola ($R^2_{ANN} = 0,99$; $RMSE_{ANN} = 0,30$) u odnosu na RSM metodologiju.

Dakle, ANN metod je pouzdaniji i efikasniji u predviđanju i modelovanju ispitivanih odgovora u odnosu na RSM pristup u slučaju ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz korena lincure.

4.2 Zaključci druge faze istraživanja

U okviru ove faze razvijen je gastroretentivni nosač u koji je inkapsuliran ekstrakt korena lincure metodom koja je podrazumevala liofilizaciju dvostrukih (V/U/V) emulzija sa čvrstim lipidom. Ovaj pristup može biti veoma atraktivan i sa aspekta inkapsulacije drugih hidrofilnih biljnih ekstrakata ili bioaktivnih jedinjenja, jer se dobijaju praškovi u visokom prinosu koje karakteriše visoka efikasnost inkapsulacije, čak i u slučaju nestabilnih jedinjenja kao što je genciopikrozid, pri čemu se adekvatnim izborom formulacije može postići modifikovano oslobađanje. Prednost ove metode ogleda se i u tome što ne zahteva primenu organskih rastvarača, a izborom čvrstih lipida sa niskom tačkom topljenja može se izbeći i uticaj termalnog stresa koji je karakterističan za široko korišćene metode inkapsulacije kao što je sušenje raspršivanjem.

Formulacije čvrstih lipidnih mikročestica, koje su u svom sastavu imale Gelucire® 43/01 ili 39/01 kao čvrst lipid, poliglicerol poliricinoleat kao lipofilni emulgator, lecitin kao hidrofilni emulgator i natrijum-alginat sa ili bez dodatka Sylysia® 350 okarakterisane su veoma visokim prinosom (iznad 90 %) i efikasnošću inkapsulacije genciopikrozida (marker jedinjenja) iznad 95 %. Rezultati SEM analize i živine porozimetrije ukazuju da su formulisane čvrste lipidne mikročestice sa makroporoznom strukturom. Posledično, tako formulisani praškovi su plutali odmah nakon kontakta sa medijumom (0,1 M HCl). S druge strane, suvi ekstrakt korena lincure je bio prašak neporozne strukture, koji se brzo rastvarao u istom medijumu. Protočnost praškova dobijenih nakon liofilizacije višestrukih emulzija deklarirana je kao prosečna do odlična prema klasifikaciji Evropske farmakopeje 11.0, dok je suvi ekstrakt korena lincure pokazao lošije osobine, što znači da je inkorporiranje ekstrakta u dvostruke emulzije uticalo na poboljšanje protočnosti ovog ekstrakta.

Takođe, okarakterisane su i tablete dobijene direktnom kompresijom praškova i bilo je evidentno da dodavanje lubrikansa i antiadheziva nije neophodno, a formulacija koja je u svom sastavu imala Gelucire® 43/01 i Sylysia® 350 imala je adekvatna tabletabilna svojstva. Sve tablete pripremljene direktnom kompresijom čvrstih lipidnih mikročestica sa ekstraktom korena lincure pokazale su mukoadhezivna svojstva. Pored toga, postignuto je bifazno oslobađanje genciopikrozida iz formulisanih tableta. Primećeno je da su tablete flotirale, ali je vreme potrebno za otpočinjaje flotacije bilo duže od 15 minuta. Pored toga, u medijumu uzorkovanom tokom *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja uočeno je postojanje lipidnih nanoasocijata koji bi mogli da budu značajni sa aspekta povećanja apsorpcije bioaktivnih jedinjenja primenjenih *in vivo*.

Konačno, formulacija D sa Gelucire®-om 43/01 kao čvrstim lipidom i silicijum-dioksidom (Sylysia® 350) okarakterisana je visokom efikasnošću inkapsulacije, kao i najvećom poroznošću i najnižom *bulk* gustinom (0,93 g/cm³) među ispitivanim formulacijama. Protočnost ove formulacije je bila dobra, dok su zatezna čvrstina, ejakcioni i stres pri odvajanju od matrice bili u okviru optimalnih vrednosti, što implicira da se ova formulacija može koristiti u proizvodnji tableta direktnom kompresijom. Pored toga, mukoadhezivna svojstva tableta D, kao i bifazno oslobađanje genciopikrozida i prisustvo nanoasocijata u kiselom medijumu ukazuju da su formulisani adekvatni gastroretentivni nosači za isporuku ekstrakta korena lincure.

4.3 Zaključci treće faze istraživanja

U okviru ove faze formulisani su čvrsti farmaceutski oblici (tablete i kapsule) na bazi gastroretentivnih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure korišćenjem koncepta dizajniranja kvaliteta.

Na osnovu analize rizika utvrđeno je da su koncentracija trehaloze i vreme homogenizacije V/U emulzije kritični atributi materijala i procesni parametri, te je ispitan uticaj koncentracije trehaloze (7,88 % i 3,94 %) i vremena homogenizacije (3 minuta i 6 minuta) na kritične attribute kvaliteta međuproizvoda, kao i tableta i kapsula. Rezultati su pokazali da je koncentracija trehaloze imala značajan pozitivan uticaj na viskozitet emulzija, što se odrazilo i na porast sadržaja vlage u praškovima dobijenim nakon sušenja emulzija. Primećeno je da je sa povećanjem koncentracije trehaloze rasla i efikasnost inkapsulacije. Duže vreme homogenizacije je doprinelo očuvanju sadržaja genciopikrozida u formulisanim praškovima tokom 18 meseci skladištenja. Pored toga, duže vreme homogenizacije je uticalo na sporije oslobađanje genciopikrozida iz tableta, pri čemu se genciopikrozid sporije oslobađao i iz tableta koje su u svom sastavu imale manji udeo trehaloze tj. veći udeo čvrstog lipida. Sa druge strane, koncentracija trehaloze je negativno uticala na brzinu oslobađanja genciopikrozida iz kapsula u toku prvih 45 minuta. Duže trajanje procesa homogenizacije je uticalo na smanjenje veličine kapi i posledično povećanje indeksa polidisperznosti (PdI) disperzija formiranih tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja genciopikrozida iz kapsula.

Praškovima formulisani u okviru ove faze istraživanja su se odlikovali visokim prinosom (90,56–94,88 %) i visokom efikasnošću inkapsulacije genciopikrozida (80,35–97,34 %), dobrom protočnošću, kao i sadržajem vlage koji je bio manji od 10 %. Stabilnost praškova je bila adekvatna, s obzirom da su okarakterisani visokim sadržajem genciopikrozida i posle 18 meseci skladištenja i očuvanom antioksidativnom aktivnošću nakon godinu dana. Dalja ispitivanja su ukazala da je izbor farmaceutskog oblika (tableta ili kapsula) uticao na karakteristike finalnog proizvoda.

Sila kompresije primenjena pri tabletiranju uticala je na povećanje gustine i posledično je bilo potrebno više od 15 minuta da bi tablete počele da flotiraju, te je bilo neophodno formulisanim praškovima dodati natrijum-bikarbonat kako bi vreme odlaganja (t_{lag}) tableta bilo kraće od 5 minuta. Tako formulisane tablete su se odlikovale mukoadhezivnim svojstvima i bifaznim profilom oslobađanja genciopikrozida, pri čemu je najsporije oslobađanje genciopikrozida postignuto u slučaju formulacije G (29,04 % za 45 minuta i 67,95 % za 6 sati). Tokom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja formirani su nanoasocijati, ali je PdI svih formulacija bio iznad 0,250. Na osnovu testa *in vitro* digestije uočeno je da na oslobađanje genciopikrozida iz tableta utiču intestinalni enzima, tj. pankreasne lipaze. S druge strane uticaj gastrične lipaze primećen je u slučaju praška istog sastava, što znači da je kompresijom formirana fizička barijera u slučaju tableta onemogućila aktivnost želudačne lipaze. Kao optimalna formulacija tableta odabrana je formulacija G, koja je u svom sastavu imala 92,5 % praška dobijenog liofilizacijom V/U/V emulzija sa 3,94 % trehaloze, pri čemu je V/U emulzija homogenizovana 6 minuta.

Sa druge strane, kapsule optimalnih karakteristika je bilo moguće izraditi punjenjem formulisanih praškova u tvrde želatinske kapsule bez dodavanja drugih pomoćnih supstanci, jer su kapsule flotirale odmah nakon kontakta sa medijumom. Oslobađanje genciopikrozida je bilo produženo (30,56 % za 45 minuta i 100,57 % za 6 sati), a u početnoj fazi nije došlo do njegovog naglog oslobađanja iz kapsula koje su sadržale veći udeo trehaloze. Prilikom ispitivanja *in vitro* brzine oslobađanja formirane su disperzije nanoasocijata, pri čemu je u slučaju kapsula J PdI bio manji od 0,250. Test *in vitro* digestije kapsula pokazao je da prisutna želatinska čaura ometa aktivnost želudačnih i intestinalnih enzima pri uslovima pod kojim je sprovedeno ispitivanje. Kapsule optimalnih karakteristika su sadržale prašak sa mikroinkapsuliranim ekstraktom korena lincure koji je dobijen liofilizacijom V/U/V sa 7,88 % trehaloze, pri čemu je V/U emulzija homogenizovana 3 minuta.

4.4 Sveobuhvatni zaključak

U okviru ove doktorske disertacije optimizovan je proces ekstrakcije genciopikrozida, izogentizina i ukupnih polifenola iz korena lincure. Pored toga, razvijena je robusna metoda kojom se sušenjem višestrukih emulzija mogu dobiti lipidni gastroretentivni nosači u koje je moguće inkapsulirati hidrofilne ekstrakte, kao što je vodeni ekstrakt korena lincure. Ovom metodom dobijen je prašak u visokom prinosu, sa visokom efikasnošću inkapsulacije i modifikovanim oslobađanjem genciopikrozida, pri čemu je prašak okarakterisan dobrom protočnošću i adekvatnim tabletabilnim svojstvima. Takođe, razvijene su tablete i kapsule sa gastroretentivnim svojstvima sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure primenom koncepta dizajniranja kvaliteta. Sledeći korak u ispitivanju razvijenih gastroretentivnih kapsula i tableta uključio bi *in vivo* ispitivanja na životinjama i ljudima u cilju procene farmakokinetičkih aspekata, kao i efikasnosti formulisanih preparata.

5. LITERATURA

1. Struwe L. Classification and Evolution of the Family *Gentianaceae*. In: The *Gentianaceae* - Volume 1: Characterization and Ecology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 13–35. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54010-3_2
2. Mirzaee F, Hosseini A, Jouybari HB, Davoodi A, Azadbakht M. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. J Tradit Complement Med [Internet]. 2017 Oct;7(4):400–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2225411017300044>
3. Takhtajan AL. Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). Bot Rev. 1980;46:225–359.
4. Krstić Milošević D. Hemijsko ispitivanje farmakološki aktivnih sekundarnih metabolita nekih vrsta roda *Gentiana*. Univ Belgrade, Fac Chem. 2008;1–208.
5. Mel'nyk VM, Drobyk NM, Twardovska MO, Kunakh VA. Karyology of European species of genus *Gentiana* L. In: The *Gentianaceae* - Volume 1: Characterization and ecology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 219–30. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54010-3_7
6. Jiang M, Cui BW, Wu YL, Nan JX, Lian LH. Genus *Gentiana*: A review on phytochemistry, pharmacology and molecular mechanism. J Ethnopharmacol [Internet]. 2021 Jan;264:113391. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874120332761>
7. Ponticelli M, Lela L, Moles M, Mangieri C, Bisaccia D, Faraone I, et al. The healing bitterness of *Gentiana lutea* L., phytochemistry and biological activities: A systematic review. Phytochemistry [Internet]. 2023 Feb;206:113518. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942222004344>
8. Šavikin K, Aljančić IS, Vajs VE, Milosavljević SM, Jadranin M, Đorđević I, et al. Bioactive Secondary metabolites in several genera of *Gentianaceae* Species from the central regions of the Balkan peninsula. In: The *Gentianaceae* - Volume 2: Biotechnology and applications [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 319–47. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54102-5_14
9. Buchwald W, Mikołajczak PŁ. *Gentianae radix*. *Gentianaceae*-Volume 2 Biotechnol Appl. 2015;403–19.
10. Stevanović V, Jakovljević K. Distribution, Ecology, and some taxonomical notes of the genera *Gentiana* L. and *Gentianella* Moench (*Gentianaceae*) in the Balkans. In: The *Gentianaceae* - Volume 1: Characterization and ecology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 169–200. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54010-3_5
11. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Vulkan izdavaštvo; 2014. 370–374 p.
12. Akbar S. Handbook of 200 medicinal plants: a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications. 2020;
13. Assessment report on *Gentiana lutea* L., radix [Internet]. 2018. European Medicines Agency, EMA. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/assessment-report-gentiana-lutea-l-radix-revision-1_en.pdf

14. Josifović M. Flora SR Srbije, V tom. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1973. 415–416 p.
15. Jančić R. Lekovite biljke. Beograd: Službeni glasnik; 2014. 199 p.
16. Uredba o zaštiti prirodnih retkosti [Internet]. Sl. glasnik RS", br. 50/93 i 93/93 - ispr. Available from: http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/t2009_06/t06_0386.htm
17. Radanović D, Marković T, Aiello N, Fusani P. Cultivation trials on *Gentiana lutea* L. in Southern and South-eastern Europe. J Appl Res Med Aromat Plants [Internet]. 2014 Oct;1(4):113–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214786114000461>
18. Aberham A, Schwaiger S, Stuppner H, Ganzera M. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthonones and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC–MS. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2007 Nov;45(3):437–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507003913>
19. Kovačević N. Osnovi farmakognozijske. Beograd: Srpska školska knjiga; 2004. 189–190 p.
20. Citová I, Ganzera M, Stuppner H, Solich P. Determination of gentisin, isogentisin, and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis. J Sep Sci [Internet]. 2008 Jan 10;31(1):195–200. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200700325>
21. Dinda B, Debnath S, Banik R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. Chem Pharm Bull. 2011;59(7):803–33.
22. Junior P. Recent developments in the isolation and structure elucidation of naturally occurring iridoid compounds. Planta Med. 1990;56(1):1–13.
23. Wan Z, Li H, Wu X, Zhao H, Wang R, Li M, et al. Hepatoprotective effect of gentiopicroside in combination with leflunomide and/or methotrexate in arthritic rats. Life Sci [Internet]. 2021 Jan;265:118689. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320520314429>
24. Zhang QL, Xia PF, Peng XJ, Wu XY, Jin H, Zhang J, et al. Synthesis, and anti-inflammatory activities of gentiopicroside derivatives. Chin J Nat Med [Internet]. 2022 Apr;20(4):309–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875536422601870>
25. Xie X, Li H, Wang Y, Wan Z, Luo S, Zhao Z, et al. Therapeutic effects of gentiopicroside on adjuvant-induced arthritis by inhibiting inflammation and oxidative stress in rats. Int Immunopharmacol [Internet]. 2019 Nov;76:105840. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919309695>
26. Öztürk N, Can Başer KH, Aydın S, Öztürk Y, Çalış I. Effects of *Gentiana lutea* ssp. symphyandra on the central nervous system in mice. Phyther Res [Internet]. 2002 Nov 30;16(7):627–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.998>
27. Hu Z, Wang H, Fu Y, Ma K, Ma X, Wang J. Gentiopicroside inhibits cell growth and migration on cervical cancer via the reciprocal MAPK/Akt signaling pathways. Nutr Cancer [Internet]. 2021 Sep 14;73(8):1459–70. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2020.1801777>
28. Rojas A, Bah M, Rojas JI, Gutiérrez DM. Smooth Muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. Planta Med [Internet]. 2000 Dec;66(8):765–7. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2000-9774>
29. Ruan M, Yu B, Xu L, Zhang L, Long J, Shen X. Attenuation of stress-induced

- gastrointestinal motility disorder by gentiopicroside, from *Gentiana macrophylla* Pall. Fitoterapia [Internet]. 2015 Jun;103:265–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X15001057>
30. Aberham A, Pieri V, Croom EM, Ellmerer E, Stuppner H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC–MS and RP-HPLC. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2011 Feb;54(3):517–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708510005649>
 31. Chang-Liao WL, Chien CF, Lin LC, Tsai TH. Isolation of gentiopicroside from *Gentianae Radix* and its pharmacokinetics on liver ischemia/reperfusion rats. J Ethnopharmacol [Internet]. 2012 Jun;141(2):668–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111005654>
 32. Wang CH, Wang ZT, Annie Bligh WW, White KN, White CJB. Pharmacokinetics and tissue distribution of gentiopicroside following oral and intravenous administration in mice. Eur J Drug Metab Pharmacokinet [Internet]. 2004 Sep;29(3):199–203. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF03190598>
 33. Wang C hong, Cheng X mei, Bligh SWA, White KN, Branford-White CJ, Wang Z tao. Pharmacokinetics and bioavailability of gentiopicroside from decoctions of Gentianae and Longdan Xiegan Tang after oral administration in rats—Comparison with gentiopicroside alone. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2007 Sep;44(5):1113–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507002555>
 34. El-Sedawy AI, Hattori M, Namra T, Kobashii KK. Metabolism of gentiopicroside (gentiopicrosin) by human intestinal bacteria. Chem Pharm Bull [Internet]. 1989;37(9):2435–7. Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/37/9/37_9_2435/_article
 35. Chen G, Gao D, Zhang W. Stability of gentiopicrosin in biological fluids *in vitro*. FUDAN Univ J Med Sci. 2008;35(2):220.
 36. Antoniadi L, Bartnik M, Angelis A, Wawruszak A, Halabalaki M, Kukula-Koch W, et al. Gentiopicroside—an insight into its pharmacological significance and future perspectives. cells [Internet]. 2023 Dec 29;13(1):70. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/1/70>
 37. Zhao WN, Shang PP, Sun WJ. HPLC determination of apparent n-octanol/water partition coefficient of gentiopicroside. Chinese J Pharm Anal. 2009;29(7):1093–5.
 38. European Pharmacopoeia, 11th edition [Internet]. 2023. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>
 39. European Union herbal monograph on *Gentiana lutea* L., radix [Internet]. 2018. European Medicines Agency, EMA. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/european-herbal-monograph-gentiana-lutea-l-radix-revision-1_en.pdf
 40. Prakash O, Singh R, Kumar S, Srivastava S, Ved A. *Gentiana lutea* Linn. (Yellow Gentian): A comprehensive review. J Ayurvedic Herb Med [Internet]. 2017 Sep 30;3(3):175–81. Available from: https://www.ayurvedjournal.com/JAHM_201733_14.pdf
 41. Kusšar A, Zupančič A, Šentjerc M, Baričević D. Free radical scavenging activities of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) measured by electron spin resonance. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2006 Oct 2;25(10):599–604. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/096032706072467>
 42. Bayliak MM, Burdyliuk NI, Lushchak VI. Effects of pH on antioxidant and prooxidant

- properties of common medicinal herbs. Open Life Sci [Internet]. 2016 Jan 1;11(1):298–307. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/biol-2016-0040/html>
43. Cvetković S, Vuletić S, Vunduk J, Klaus A, Mitić-Ćulafić D, Nikolić B. The role of *Gentiana lutea* extracts in reducing UV-induced DNA damage. Mutagenesis [Internet]. 2023 Feb 3;38(1):71–80. Available from: <https://academic.oup.com/mutage/article/38/1/71/6543590>
44. Amin A. Ketoconazole-induced testicular damage in rats reduced by *Gentiana* extract. Exp Toxicol Pathol [Internet]. 2008 Apr;59(6):377–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940299307001005>
45. Mathew A, Taranalli AD, Torgal SS. Evaluation of anti-inflammatory and wound healing activity of *Gentiana lutea* rhizome extracts in animals. Pharm Biol [Internet]. 2004 Jan 3;42(1):8–12. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200390502883>
46. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phyther Res [Internet]. 2005 Nov;19(11):988–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1776>
47. Mennella I, Fogliano V, Ferracane R, Arlorio M, Pattarino F, Vitaglione P. Microencapsulated bitter compounds (from *Gentiana lutea*) reduce daily energy intakes in humans. Br J Nutr [Internet]. 2016 Nov 28;116(10):1841–50. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114516003858/type/journal_article
48. Park E, Lee CG, Kim J, Yeo S, Kim JA, Choi CW, et al. Antiobesity Effects of *Gentiana lutea* extract on 3T3-L1 Preadipocytes and a high-fat diet-induced mouse model. Molecules [Internet]. 2020 May 25;25(10):2453. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/10/2453>
49. Kesavan R, Chandel S, Upadhyay S, Bendre R, Ganugula R, Potunuru UR, et al. *Gentiana lutea* exerts anti-atherosclerotic effects by preventing endothelial inflammation and smooth muscle cell migration. Nutr Metab Cardiovasc Dis [Internet]. 2016 Apr;26(4):293–301. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475315002641>
50. Menkovic N, Juranic Z, Stanojkovic T, Raonic-Stevanovic T, Šavikin K, Zdunić G, et al. Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin. Phyther Res [Internet]. 2010 Nov 28;24(11):1693–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.3225>
51. Wölflle U, Haarhaus B, Seiwerth J, Cawelius A, Schwabe K, Quirin KW, et al. The herbal bitter drug *Gentiana lutea* modulates lipid synthesis in human keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. Int J Mol Sci [Internet]. 2017 Aug 22;18(8):1814. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1814>
52. Gebhardt R. Stimulation of acid secretion by extracts of *Gentiana lutea* L. in cultured cells from rat gastric mucosa. Pharm Pharmacol Lett. 1997;7(2):106–8.
53. Niiho Y, Yamazaki T, Nakajima Y, Yamamoto T, Ando H, Hirai Y, et al. Gastroprotective effects of bitter principles isolated from Gentian root and Swertia herb on experimentally-induced gastric lesions in rats. J Nat Med [Internet]. 2006 Jan 11;60(1):82–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11418-005-0014-2>
54. Glatzel H, Hackenberg K. Röntgenologische Untersuchungen der Wirkungen von Bittermitteln auf die Verdauungsorgane. Planta Med [Internet]. 1967 Aug 15;15(03):223–32.

- Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1099976>
55. Borgia M, Sepe N, Borgia R, Ori-Bellometti M. Pharmacological activity of an herbal extract: controlled clinical study. *Curr Ther Res.* 1981;29:525–36.
 56. McMullen MK, Whitehouse JM, Whitton PA, Towell A. Bitter tastants alter gastric-phase postprandial haemodynamics. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014 Jul;154(3):719–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874114003298>
 57. Zimmermann W, Gaisbauer G, Gaisbauer M. Wirkung von Bitterstoff-Drogen auf das darmassoziierte Immunsystem. *Z Phytother.* 1986;7:59–64.
 58. Leech B, Schloss J, Steel A. Treatment Interventions for the management of intestinal permeability: A cross-sectional survey of complementary and integrative medicine practitioners. *J Altern Complement Med* [Internet]. 2019 Jun;25(6):623–36. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/acm.2018.0374>
 59. Wegner T. Anwendung eines Trockenextraktes aus *Gentianae luteae* radix bei dyspeptischem Symptomkomplex, *Z. Phytotherapie.* 1997;19:163–4.
 60. Pharmaceutical development, ICH guideline Q8 (R2) [Internet]. International Council on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29_Guideline.pdf
 61. Quality risk management, ICH guideline Q9 (R1) [Internet]. International Council on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ich. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q9%28R1%29_Guideline_Step4_2023_0126_0.pdf
 62. Pharmaceutical quality system, ICH guideline Q10 [Internet]. International Council on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q10_Guideline.pdf
 63. Mudrić J, Arsenijević J, Maksimović Z, Ibrić S, Gopčević K, Đuriš J. Tablet and capsule formulations incorporating high doses of a dry optimized herbal extract: The case of *Satureja kitaibelii*. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2021 Dec;66:102776. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224721004561>
 64. Simões MF, Silva G, Pinto AC, Fonseca M, Silva NE, Pinto RMA, et al. Artificial neural networks applied to quality-by-design: From formulation development to clinical outcome. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2020 Jul;152:282–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641120301399>
 65. Ahmad Khan MS, Ahmad I. Herbal Medicine. In: New look to phytomedicine [Internet]. Elsevier; 2019. p. 3–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012814619400001X>
 66. Mohammad Azmin SNH, Abdul Manan Z, Wan Alwi SR, Chua LS, Mustaffa AA, Yunus NA. Herbal processing and extraction technologies. *Sep Purif Rev* [Internet]. 2016 Oct 25;45(4):305–20. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15422119.2016.1145395>
 67. Plaskova A, Mlcek J. New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Front Nutr* [Internet]. 2023 Mar 28;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2023.1118761/full>
 68. Balasubramaniam VG, Ayyappan P, Sathvika S, Antony U. Effect of enzyme pretreatment in

- the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2019 Mar 1;56(3):1583–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-03672-2>
69. Teh S, Niven BE, Bekhit AEA, Carne A, Birch EJ. Microwave and pulsed electric field assisted extractions of polyphenols from defatted canola seed cake. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 May 30;50(5):1109–15. Available from: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12749>
70. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D, Lightfoot D. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* [Internet]. 2017 Sep 22;6(4):42. Available from: <http://www.mdpi.com/2223-7747/6/4/42>
71. Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. *Farmaceutska tehnologija I*. Beograd: Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet; 2019. 423 p.
72. Sheldon RA. Green solvents for sustainable organic synthesis: State of the art. *Green Chem* [Internet]. 2005;7(5):267. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b418069k>
73. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* [Internet]. 2018 Dec 17;13(1):20. Available from: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>
74. Jha AK, Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2022 Jan;119:579–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421006191>
75. Azwanida NN. A Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* [Internet]. 2015;04(03). Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>
76. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci*. 2012;1(1):8–26.
77. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2006 Jun;17(6):300–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405003559>
78. Desai KM, Survase SA, Saudagar PS, Lele SS, Singhal RS. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. *Biochem Eng J* [Internet]. 2008 Oct;41(3):266–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X08001733>
79. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2017 Jun 3;43(6):889–901. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2017.1291672>
80. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & sons; 2017.
81. Weremfo A, Abassah-Oppong S, Adulley F, Dabie K, Seidu-Larry S. Response surface methodology as a tool to optimize the extraction of bioactive compounds from plant sources. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2023 Jan 15;103(1):26–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.12121>
82. Dejaegher B, Vander Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2011

- Sep;56(2):141–58. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708511002342>
83. Baş D, Boyacı İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* [Internet]. 2007 Feb;78(3):836–45. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877405007843>
84. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *WIREs Comput Stat* [Internet]. 2010 Mar 19;2(2):128–49. Available from:
<https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wics.73>
85. Djuris J, Ibric S, Djuric Z. Neural computing in pharmaceutical products and process development. In: *Computer-Aided Applications in Pharmaceutical Technology* [Internet]. Elsevier; 2013. p. 91–175. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781907568275500056>
86. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2000 Jun;22(5):717–27. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708599002721>
87. Krogh A. What are artificial neural networks? *Nat Biotechnol* [Internet]. 2008 Feb;26(2):195–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt1386>
88. Lopes CM, Bettencourt C, Rossi A, Buttini F, Barata P. Overview on gastroretentive drug delivery systems for improving drug bioavailability. *Int J Pharm* [Internet]. 2016 Aug;510(1):144–58. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316303866>
89. Tripathi, Thapa, Maharjan, Jeong. Current state and future perspectives on gastroretentive drug delivery systems. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Apr 20;11(4):193. Available from:
<https://www.mdpi.com/1999-4923/11/4/193>
90. Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. Gastroretentive drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2006 Mar 28;3(2):217–33. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.3.2.217>
91. Mandal UK, Chatterjee B, Senjoti FG. Gastro-retentive drug delivery systems and their *in vivo* success: A recent update. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2016 Oct;11(5):575–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087616300320>
92. Hoffman A, Stepensky D, Lavy E, Eyal S, Klausner E, Friedman M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. *Int J Pharm* [Internet]. 2004 Jun;277(1–2):141–53. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851730400122X>
93. Soybel DI. Anatomy and Physiology of the stomach. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2005 Oct;85(5):875–94. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610905000848>
94. Schneider, Koziolk, Weitschies. *In vitro* and *in vivo* test methods for the evaluation of gastroretentive dosage forms. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Aug 16;11(8):416. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/8/416>
95. Šalamon Janečić M, Močić Pavić A, Hojsak I. Gastric motility disorders and the role of electrogastrography. *Liječnički Vjesn*. 2022;144(7–8):244–53.
96. Das S, Kaur S, Rai VK. Gastro-retentive drug delivery systems: a recent update on clinical

- pertinence and drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2021 Oct 5;11(5):1849–77. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s13346-020-00875-5>
97. Koziolk M, Schneider F, Grimm M, Modeß C, Seekamp A, Roustom T, et al. Intragastric pH and pressure profiles after intake of the high-caloric, high-fat meal as used for food effect studies. *J Control Release* [Internet]. 2015 Dec;220:71–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915301917>
98. Koziolk M, Grimm M, Garbacz G, Kühn JP, Weitschies W. Intragastric Volume changes after intake of a high-caloric, high-fat standard breakfast in healthy human subjects investigated by MRI. *Mol Pharm* [Internet]. 2014 May 5;11(5):1632–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp500022u>
99. Vrettos NN, Roberts CJ, Zhu Z. Gastroretentive Technologies in tandem with controlled-release strategies: A Potent answer to oral drug bioavailability and patient compliance implications. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Sep 30;13(10):1591. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1591>
100. Shaikh R, Raj Singh T, Garland M, Woolfson Ad, Donnelly R. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2011;3(1):89. Available from: <https://journals.lww.com/10.4103/0975-7406.76478>
101. Davis DW. Method of swallowing a pill. US Patent 3418999 A [Internet]. Google Patents. 1968. Available from: <https://patents.google.com/patent/US3418999A/en>
102. Singh B. Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. *J Control Release* [Internet]. 2000 Feb 3;63(3):235–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365999002047>
103. Ahmed A, Goyal NK, Pramod KS. Effervescent floating drug delivery system: A review. *Glob J Pharmacol*. 2014;8(4):478–85.
104. Awasthi R, Kulkarni GT. Decades of research in drug targeting to the upper gastrointestinal tract using gastroretention technologies: where do we stand? *Drug Deliv* [Internet]. 2016 Feb 12;23(2):378–94. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2014.936535>
105. Iglesias N, Galbis E, Romero-Azogil L, Benito E, Lucas R, García-Martín MG, et al. Indepth study into polymeric materials in low-density gastroretentive formulations. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Jul 7;12(7):636. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/7/636>
106. Bardonnnet PL, Faivre V, Pugh WJ, Piffaretti JC, Falson F. Gastroretentive dosage forms: overview and special case of *Helicobacter pylori*. *J Control Release* [Internet]. 2006 Mar;111(1–2):1–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365905006462>
107. Prajapati VD, Jani GK, Khutliwala TA, Zala BS. Raft forming system—An upcoming approach of gastroretentive drug delivery system. *J Control Release* [Internet]. 2013 Jun;168(2):151–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365913001417>
108. Kawashima Y, Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Itoh Y. Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach. *J Pharm Sci* [Internet]. 1992 Feb;81(2):135–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002235491548757X>
109. Oh TO, Kim JY, Ha JM, Chi SC, Rhee YS, Park CW, et al. Preparation of highly porous gastroretentive metformin tablets using a sublimation method. *Eur J Pharm Biopharm*

- [Internet]. 2013 Apr;83(3):460–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964111200375X>
110. Losi E, Bettini R, Santi P, Sonvico F, Colombo G, Lofthus K, et al. Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems. *J Control Release* [Internet]. 2006 Mar;111(1–2):212–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365905007261>
 111. Chawla G, Bansal A. A means to address regional variability in intestinal drug absorption. *Pharm tech*. 2003;27(2):50–68.
 112. Nayak AK, Malakar J, Sen KK. Gastroretentive drug delivery technologies: Current approaches and future potential. *J Pharm Educ Res*. 2010;1(2):1.
 113. Shep S, Dodiya S, Lahoti S, Mayee R. Swelling system: a novel approach towards gastroretentive drug delivery system. *Indo Glob J Pharm Sci*. 2011;1(3):234–42.
 114. Chen J, Blevins WE, Park H, Park K. Gastric retention properties of superporous hydrogel composites. *J Control Release* [Internet]. 2000 Feb;64(1–3):39–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836599900139X>
 115. Vinchurkar K, Sainy J, Khan MA, Mane S, Mishra DK, Dixit P. Features and facts of a gastroretentive drug delivery system-A review. *Turkish J Pharm Sci* [Internet]. 2022 Aug 31;19(4):476–87. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_47811/TJPS-19-476-En.pdf
 116. Suri S, Ruan G, Winter J, Schmidt CE. Microparticles and nanoparticles. In: *Biomaterials Science*. Elsevier; 2013. p. 360–88.
 117. Singh MN, Hemant KSY, Ram M, Shivakumar HG. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res Pharm Sci*. 2010;5(2):65.
 118. Lengyel M, Kállai-Szabó N, Antal V, Laki AJ, Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci Pharm* [Internet]. 2019 Aug 9;87(3):20. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-0532/87/3/20>
 119. Desai KGH, Jin Park H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry Technol* [Internet]. 2005 Jul;23(7):1361–94. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
 120. Đekić L, Ćirić A. Matematičko modelovanje *in vitro* oslobađanja lekovitih supstanci iz nosača tipa polimernih mikročestica. *Arh Farm (Belgr)*. 2022;72(6):591–620.
 121. Park J, Ye M, Park K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules* [Internet]. 2005 Jan 31;10(1):146–61. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/10/1/146>
 122. Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Aug;78:34–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441730777X>
 123. Rosiaux Y, Jannin V, Hughes S, Marchaud D. Solid lipid excipients as matrix agents for sustained drug delivery. In: *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 237–71. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-20206-8_9
 124. Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J Control Release* [Internet].

- 2014 Mar;178:25–45. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591300970X>
125. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* [Internet]. 2011 Nov 4;3(4):793–829. Available from:
<http://www.mdpi.com/1999-4923/3/4/793>
126. Bhatta S, Stevanovic Janezic T, Ratti C. Freeze-Drying of plant-based foods. *Foods* [Internet]. 2020 Jan 13;9(1):87. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/1/87>
127. Tang X (Charlie), Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharm Res* [Internet]. 2004 Feb;21(2):191–200. Available from:
<http://link.springer.com/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>
128. Rey L, May JC. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical & biological products, revised and expanded. CRC Press; 2004.
129. Teunou E, Poncelet D. Batch and continuous fluid bed coating – review and state of the art. *J Food Eng* [Internet]. 2002 Aug;53(4):325–40. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087740100173X>
130. da Silva CAM, Butzge JJ, Nitz M, Taranto OP. Monitoring and control of coating and granulation processes in fluidized beds – A review. *Adv Powder Technol* [Internet]. 2014 Jan;25(1):195–210. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921883113001076>
131. Guignon B, Duquenoy A, Dumoulin ED. Fluid bed encapsulation of particles: Principles and practice. *Dry Technol* [Internet]. 2002 Feb;20(2):419–47. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-120002550>
132. Pusapati RT, Rao TV. Fluidized bed processing: A review. *Indian J Res Pharm Biotechnol*. 2014;2(4):1360.
133. Sovilj VJ, Dokić PP, Mešinkovska DJ. Investigations of the microencapsulation in the system anionic polyelectrolyte cationic surfactant. *Acta Period Technol*. 2000;(31):453–9.
134. Timilsena YP, Akanbi TO, Khalid N, Adhikari B, Barrow CJ. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019 Jan;121:1276–86. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018348967>
135. Pedroso-Santana S, Fleitas-Salazar N. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polym Int* [Internet]. 2020 May 3;69(5):443–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pi.5970>
136. Patil JS, Kamalapur M V, Marapur SC, Kadam D V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2010;5(1):241–8.
137. Lu W, Kelly AL, Miao S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016 Jan;47:1–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500240X>
138. Dubey R. Microencapsulation technology and applications. *Def Sci J*. 2009;59(1):82.
139. Ding S, Serra CA, Vandamme TF, Yu W, Anton N. Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *J Control Release* [Internet]. 2019 Feb;295:31–49. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365918307405>

140. Mudrić J, Šavikin K, Ibrić S, Đuriš J. Double emulsions (W/O/W emulsions): Encapsulation of plant bioactives. *Lek sirovine* [Internet]. 2019;(39):76–83. Available from: <https://lekovitesirovine.rs/article/93>
141. Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int J Pharm* [Internet]. 2015 Dec;496(2):173–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315303264>
142. Muschiolik G, Dickinson E. Double emulsions relevant to food systems: Preparation, stability, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2017 May 23;16(3):532–55. Available from: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12261>
143. Heidari F, Jafari SM, Ziaifar AM, Malekjani N. Stability and release mechanisms of double emulsions loaded with bioactive compounds; a critical review. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2022 Jan;299:102567. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868621002086>
144. Lamba H, Sathish K, Sabikhi L. Double emulsions: Emerging Delivery system for plant bioactives. *Food Bioprocess Technol* [Internet]. 2015 Apr 15;8(4):709–28. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-014-1468-6>
145. Becker Peres L, Becker Peres L, de Araújo PHH, Sayer C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2016 Apr;140:317–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515303829>
146. Kukizaki M, Goto M. Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2007 Feb;293(1–3):87–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775706005267>
147. Salvia-Trujillo L, Artiga-Artigas M, Molet-Rodríguez A, Turmo-Ibarz A, Martín-Belloso O. Emulsion-based nanostructures for the delivery of active ingredients in foods. *Front Sustain Food Syst* [Internet]. 2018 Nov 26;2. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2018.00079/full>
148. Giri TK, Choudhary C, Ajazuddin, Alexander A, Badwaik H, Tripathi DK. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2013 Apr;21(2):125–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016412000424>
149. Dahmoune F, Remini H, Dairi S, Aoun O, Moussi K, Bouaoudia-Madi N, et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P. lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network (ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015 Dec;77:251–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015303642>
150. Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. 1994;
151. Balijagić J, Janković T, Zdunić G, Bošković J, Šavikin K, Gočevac D, et al. Chemical profile, radical scavenging and cytotoxic activity of yellow gentian leaves (*Genitaneae luteae* folium) grown in northern regions of Montenegro. *Nat Prod Commun* [Internet]. 2012 Nov 1;7(11):1934578X1200701. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1200701119>
152. Herodež ŠS, Hadolin M, Škerget M, Knez Ž. Solvent extraction study of antioxidants from

- balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. Food Chem [Internet]. 2003 Feb;80(2):275–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602003825>
153. Pinelo M, Sineiro J, Núñez MJ. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. J Food Eng [Internet]. 2006 Nov;77(1):57–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877405004267>
154. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. J Food Eng [Internet]. 2007 Jul;81(1):236–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877406006686>
155. Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. Sep Purif Technol [Internet]. 2017 May;179:369–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586616318421>
156. Ben-Ali S, Akermi A, Mabrouk M, Ouederni A. Optimization of extraction process and chemical characterization of pomegranate peel extract. Chem Pap [Internet]. 2018 Aug 27;72(8):2087–100. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11696-018-0427-5>
157. Živković J, Janković T, Menković N, Šavikin K. Optimization of ultrasound-assisted extraction of isogentisin, gentiopicroside and total polyphenols from gentian root using response-surface methodology. Ind Crops Prod [Internet]. 2019 Nov;139:111567. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019305783>
158. Ariño A, Arberas I, Leiton MJ, de Renobales M, Dominguez JB. The extraction of yellow gentian root (*Gentiana lutea* L.). Zeitschrift für Leb und -forsch A [Internet]. 1997 Sep 26;205(4):295–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050168>
159. Mustafa AM, Caprioli G, Ricciutelli M, Maggi F, Marín R, Vittori S, et al. Comparative HPLC/ESI-MS and HPLC/DAD study of different populations of cultivated, wild and commercial *Gentiana lutea* L. Food Chem [Internet]. 2015 May;174:426–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614018184>
160. Jovanović MS, Milutinović M, Lazarević Z, Mudrić J, Matejić J, Kitić D, et al. Heat- and microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Gentiana asclepiadea* L. underground parts: Optimization and comparative assessment using response surface methodology. J Appl Res Med Aromat Plants [Internet]. 2023 Apr;34:100483. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221478612300027X>
161. Azman NAM, Gordon MH, Skowrya M, Segovia F, Almajano MP. Use of lyophilised and powdered *Gentiana lutea* root in fresh beef patties stored under different atmospheres. J Sci Food Agric [Internet]. 2015 Jul 15;95(9):1804–11. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6878>
162. Yang L, Jiang J, Li W, Chen J, Wang D, Zhu L. Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. J Sep Sci [Internet]. 2009 May 27;32(9):1437–44. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200800744>
163. Arruda HS, Pereira GA, Pastore GM. Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* mart. (araticum) fruits using response surface methodology. Food Anal Methods [Internet]. 2017 Jan 3;10(1):100–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-016-0554-y>
164. Pilkington JL, Preston C, Gomes RL. Comparison of response surface methodology (RSM)

- and artificial neural networks (ANN) towards efficient extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2014 Jul;58:15–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014001502>
165. Simić VM, Rajković KM, Stojičević SS, Veličković DT, Nikolić NČ, Lazić ML, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2016 Feb;160:89–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586616300193>
166. Youssefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM. Comparison of artificial neural network (ANN) and Response surface methodology (RSM) in the prediction of quality parameters of spray-dried pomegranate juice. *Dry Technol* [Internet]. 2009 Jul 29;27(7–8):910–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930902988247>
167. Milanovic A, Aleksic I, Ibric S, Parojcic J, Cvijic S. Tableting of hot-melt coated paracetamol granules: Material tableting properties and quality characteristics of the obtained tablets. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2020 Jan;142:105121. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092809871930394X>
168. <2040> Disintegration and dissolution of dietary supplements [Internet]. 2009. United States Pharmacopeia, USP. Available from: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/genChapter2040.pdf
169. Notario-Pérez F, Cazorla-Luna R, Martín-Illana A, Ruiz-Caro R, Peña J, Veiga MD. Tenofovir hot-melt granulation using Gelucire® to develop sustained-release vaginal systems for weekly protection against sexual transmission of HIV. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Mar 20;11(3):137. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/3/137>
170. Leister N, Karbstein HP. Evaluating the stability of double emulsions—A review of the measurement techniques for the systematic investigation of instability mechanisms. *Colloids and Interfaces* [Internet]. 2020 Jan 31;4(1):8. Available from: <https://www.mdpi.com/2504-5377/4/1/8>
171. Artiga-Artigas M, Molet-Rodríguez A, Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O. Formation of double (W1/O/W2) Emulsions as carriers of hydrophilic and lipophilic active compounds. *Food Bioprocess Technol* [Internet]. 2019 Mar 14;12(3):422–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-018-2221-3>
172. Irshad S, Khan IU, Khalid SH, Asghar S, Irfan M, Khalid I, et al. Probing the effect of various lipids and polymer blends on clopidogrel encapsulated floating microcarriers. *DARU J Pharm Sci* [Internet]. 2019 Dec 21;27(2):571–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40199-019-00285-0>
173. Chauhan B, Shimpi S, Mahadik KR, Paradkar A. Preparation and evaluation of floating risedronate sodium Gelucire® 39/01 matrices. *Acta Pharm*. 2004;54(3):205–14.
174. Dhawan V, Sutariya B, Lokras A, Thamm J, Saraf M, Warawdekar U, et al. Lipid nanoconstructs for superior hepatoprotection: *In vitro* assessments as predictive tool for *in vivo* translation. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 Apr;579:119176. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517320301605>
175. Matos M, Gutiérrez G, Coca J, Pazos C. Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2014 Feb;442:69–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777571300455X>

176. Neumann SM, Scherbej I, van der Schaaf US, Karbstein HP. Investigations on the influence of osmotic active substances on the structure of water in oil emulsions for the application as inner phase in double emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2018 Feb;538:56–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775717309731>
177. Liu F, Wang Y, Li X, Zhang Z, Dai X, Wang X, et al. The phase inversion mechanism of the pH-sensitive reversible invert emulsion from w/o to o/w. *Open Phys* [Internet]. 2020 Jul 28;18(1):380–90. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/phys-2020-0112/html>
178. Florence AT, Whitehill D. The formulation and stability of multiple emulsions. *Int J Pharm*. 1982;11(4):277–308.
179. Mazuco RA, Cardoso PMM, Bindaco ÉS, Scherer R, Castilho RO, Faraco AAG, et al. Maltodextrin and gum arabic-based microencapsulation methods for anthocyanin preservation in juçara palm (*Euterpe edulis martius*) fruit pulp. *Plant Foods Hum Nutr* [Internet]. 2018 Sep 28;73(3):209–15. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-018-0676-z>
180. Dolly P, Anishaparvin A, Joseph GS, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *J Microencapsul* [Internet]. 2011 Sep 10;28(6):568–74. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2011.599435>
181. Zhang K, Lv S, Li X, Feng Y, Li X, Liu L, et al. Preparation, characterization, and *in vivo* pharmacokinetics of nanostructured lipid carriers loaded with oleanolic acid and gentiopicrin. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013 Aug;3227. Available from: <http://www.dovepress.com/preparation-characterization-and-in-vivo-pharmacokinetics-of-nanostruc-peer-reviewed-article-IJN>
182. Almukainzi M, El-Masry TA, Negm WA, Elekhawwy E, Saleh A, Sayed AE, et al. Co-delivery of gentiopicrin and thymoquinone using electrospun m-PEG/PVP nanofibers: *In-vitro* and *in vivo* studies for antibacterial wound dressing in diabetic rats. *Int J Pharm* [Internet]. 2022 Sep;625:122106. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517322006603>
183. Almukainzi M, A El-Masry T, A Negm W, Elekhawwy E, Saleh A, E Sayed A, et al. Gentiopicrin PLGA nanospheres: Fabrication, *in vitro* characterization, antimicrobial action, and *in vivo* effect for enhancing wound healing in diabetic rats. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2022 Mar;Volume 17:1203–25. Available from: <https://www.dovepress.com/gentiopicrin-plga-nanospheres-fabrication-in-vitro-characterization-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
184. El Assasy AEHI, Younes NF, Makhoulf AIA. Enhanced oral absorption of amisulpride via a nanostructured lipid carrier-based capsules: development, optimization applying the desirability function approach and *in vivo* pharmacokinetic study. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2019 Feb 16;20(2):82. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-018-1283-x>
185. Bodmeier R, Wang J, Bhagwatwar H. Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs. *J Microencapsul*. 1992;9(1):99–107.
186. Ghosh Dastidar D, Saha S, Chowdhury M. Porous microspheres: Synthesis, characterisation

- and applications in pharmaceutical & medical fields. *Int J Pharm* [Internet]. 2018 Sep;548(1):34–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517318304137>
187. Graham D. Characterization of physical adsorption systems. III. The separate effects of pore size and surface acidity upon the adsorbent capacities of activated carbons. *J Phys Chem*. 1955;59(9):896–900.
188. Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O. Solid dispersions of carvedilol with porous silica. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 2011;59(4):427–33. Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/59/4/59_4_427/_article
189. Araújo RR, Teixeira CCC, Freitas LAP. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drug via spray drying of liquid feed. *Dry Technol*. 2010;28(3):412–21.
190. Panda T, Das D, Panigrahi L. Formulation development of solid dispersions of bosentan using Gelucire 50/13 and Poloxamer 188. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2016;027–33. Available from: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=1975
191. Amidon GE, Secreast PJ, Mudie D. Developing solid oral dosage forms. Qiu, Y, Zhang, G, Chen, Y, Liu, L, Porter, W, Eds. 2009;163–86.
192. Sadeghi F, Mosafa F, Afrasiabi GH. Effect of particle size, compaction force and presence of Aerosil 200 on the properties of matrices prepared from physical mixture of propranolol hydrochloride and eudragit RS or RL. 2007;
193. Pitt KG, Webber RJ, Hill KA, Dey D, Gamlen MJ. Compression prediction accuracy from small scale compaction studies to production presses. *Powder Technol* [Internet]. 2015 Jan;270:490–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591013006104>
194. Md S, Ahuja A, Khar RK, Baboota S, Chuttani K, Mishra AK, et al. Gastroretentive drug delivery system of acyclovir-loaded alginate mucoadhesive microspheres: Formulation and evaluation. *Drug Deliv* [Internet]. 2011 May 26;18(4):255–64. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2010.536270>
195. Sharma OP, Shah M V, Parikh DC, Mehta TA. Formulation optimization of gastroretentive drug delivery system for allopurinol using experimental design. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2015 Apr 3;12(4):513–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2014.944861>
196. Thakkar VT, Shah PA, Soni TG, Parmar MY, Gohel MC, Gandhi TR. Goodness of fit model dependent approach for release kinetics of levofloxacin hemihydrates floating tablet. *Dissolution Technol* [Internet]. 2009;16(1):35–9. Available from: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200902Articles/DT200902_A05.pdf
197. Petchsomrit A, Sermkaew N, Wiwattanapatapee R. Alginate-based composite sponges as gastroretentive carriers for curcumin-loaded self-microemulsifying drug delivery systems. *Sci Pharm* [Internet]. 2017 Mar 15;85(1):11. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-0532/85/1/11>
198. Jammula S, Patra CN, Swain S, Panigrahi KC, Nayak S, Dinda SC, et al. Design and characterization of cefuroxime axetil biphasic floating minitables. *Drug Deliv* [Internet]. 2015 Jan 2;22(1):125–35. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2013.871603>
199. Bolko Seljak K, Ilić IG, Gašperlin M, Zvonar Pobirk A. Self-microemulsifying tablets prepared by direct compression for improved resveratrol delivery. *Int J Pharm* [Internet].

- 2018 Sep;548(1):263–75. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517318304642>
200. Cortés H, Hernández-Parra H, Bernal-Chávez SA, Prado-Audelo ML Del, Caballero-Florán IH, Borbolla-Jiménez F V., et al. Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. *Materials (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 10;14(12):3197. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/12/3197>
201. Brodtkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* [Internet]. 2019 Apr 18;14(4):991–1014. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-018-0119-1>
202. Soni G, Yadav KS, Gupta MK. QbD based approach for formulation development of spray dried microparticles of erlotinib hydrochloride for sustained release. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020 Jun;57:101684. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224719315059>
203. Bansal S, Beg S, Asthana A, Garg B, Asthana GS, Kapil R, et al. QbD-enabled systematic development of gastroretentive multiple-unit microballoons of itopride hydrochloride. *Drug Deliv* [Internet]. 2016 Feb 12;23(2):437–51. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2014.916771>
204. Pedersen PB, Vilmann P, Bar-Shalom D, Müllertz A, Baldursdóttir SG. Polymer selection for simulation of rheological properties of human gastric fluid. *Annu Trans Nord Rheol Soc Copenhagen*. 2013;241–8.
205. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* [Internet]. 1996 Jul;239(1):70–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>
206. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 1995;28(1):25–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>
207. Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira ICFR. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012 May;50(5):1201–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512000968>
208. Thumann TA, Pferschy-Wenzig EM, Aziz-Kalbhenn H, Ammar RM, Rabini S, Moissl-Eichinger C, et al. Application of an *in vitro* digestion model to study the metabolic profile changes of an herbal extract combination by UHPLC–HRMS. *Phytomedicine* [Internet]. 2020 Jun;71:153221. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711320300532>
209. Ferreira LAM, Seiller M, Grossiord JL, Marty JP, Wepierre J. Vehicle influence on *in vitro* release of metronidazole: role of w/o/w multiple emulsion. *Int J Pharm*. 1994;109(3):251–9.
210. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* [Internet]. 2020 Mar 16;94(3):651–715. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-020-02689-3>
211. Ignjatović J, Đuriš J, Cvijić S, Dobričić V, Montepietra A, Lombardi C, et al. Development of solid lipid microparticles by melt-emulsification/spray-drying processes as carriers for pulmonary drug delivery. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2021 Jan;156:105588. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098720303766>
212. Thapa P, Jeong S. Effects of formulation and process variables on gastroretentive floating

- tablets with a high-dose soluble drug and experimental design approach. *Pharmaceutics* [Internet]. 2018 Sep 17;10(3):161. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4923/10/3/161>
213. Abila KK, Mehanna MM. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products. *Int J Pharm* [Internet]. 2022 Nov;628:122233. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517322007876>
214. Hedoux A, Paccou L, Achir S, Guinet Y. Mechanism of protein stabilization by trehalose during freeze-drying analyzed by in situ micro-Raman spectroscopy. *J Pharm Sci* [Internet]. 2013 Aug;102(8):2484–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915309916>
215. Zhao X, Zhang S, Yang G, Zhou Z, Gao Y. Exploring trehalose on the release of levonorgestrel from implantable PLGA Microneedles. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 Jan 1;12(1):59. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/1/59>
216. Saleh A, McGarry K, Chaw C, Elkordy A. Feasibility of using gluconolactone, trehalose and hydroxy-propyl gamma cyclodextrin to enhance bendroflumethiazide dissolution using lyophilisation and physical mixing techniques. *Pharmaceutics* [Internet]. 2018 Feb 1;10(1):22. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/1/22>
217. Dolinina ES, Vlasenkova MI, Parfenyuk EV. Effect of trehalose on structural state of bovine serum albumin adsorbed onto mesoporous silica and the protein release kinetics *in vitro*. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2017 Aug;527:101–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775717304363>
218. Schuch A, Wrenger J, Schuchmann HP. Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2014 Nov;461:344–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775713009096>
219. Li X, Wang L, Wang B. Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chem* [Internet]. 2017 Aug;229:479–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617302418>
220. Martinez RM, Magalhães WV, Sufi B da S, Padovani G, Nazato LIS, Velasco MVR, et al. Vitamin E-loaded bigels and emulsions: Physicochemical characterization and potential biological application. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2021 May;201:111651. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776521000953>
221. Kanouni M, Rosano H., Naouli N. Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2002 Dec;99(3):229–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868602000799>
222. Domian E, Brynda-Kopytowska A, Oleksa K. Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2015 Feb;44:49–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14002963>
223. Álvarez Cerimedo MS, Cerdeira M, Candal RJ, Herrera ML. Microencapsulation of a low-trans fat in trehalose as affected by emulsifier type. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2008 Sep 11;85(9):797–807. Available from: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/s11746-008-1267-1>

224. Drusch S, Berg S. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem* [Internet]. 2008 Jul;109(1):17–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607012551>
225. Olgenblum GI, Sapir L, Harries D. Properties of aqueous trehalose mixtures: Glass transition and hydrogen bonding. *J Chem Theory Comput* [Internet]. 2020 Feb 11;16(2):1249–62. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.9b01071>
226. Zeng P, Li X, Wu X, Diao Y, Liu Y, Liu P. Rapid Identification of wild gentiana genus in different geographical locations based on FT-IR and an improved neural network structure Double-Net. *Molecules* [Internet]. 2022 Sep 14;27(18):5979. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/18/5979>
227. Coelho C, Figueredo G, Lafarge C, Bou-Maroun E, Flahaut S. Mid-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis and machine-learning: A powerful tool to simultaneously assess geographical origin, growing conditions and bitter content in *Gentiana lutea* roots. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2022 Nov;187:115349. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669022008329>
228. Lalge R, Thipsay P, Shankar VK, Maurya A, Pimparade M, Bandari S, et al. Preparation and evaluation of cefuroxime axetil gastro-retentive floating drug delivery system via hot melt extrusion technology. *Int J Pharm* [Internet]. 2019 Jul;566:520–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319304648>
229. Windholz M, Budavari S, Blumetti RF, Otterbein ES. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 10th edn, Merck & Co. Inc, Rahway, NJ, USA. 1983;
230. Zhang L, Liu L, Qian Y, Chen Y. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2008 Jun;69(2):750–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107004080>
231. Bhandari BR, Dumoulin ED, Richard HMJ, Noleau I, Lebert AM. Flavor encapsulation by spray drying: application to citral and linalyl acetate. *J Food Sci*. 1992;57(1):217–21.
232. Rautenberg A, Lamprecht A. Spray-freeze-dried lyospheres: Solid content and the impact on flowability and mechanical stability. *Powder Technol* [Internet]. 2022 Oct;411:117905. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591022007860>
233. Sulistiawati, Saka Dwipayanti K, Azhar M, Rahman L, Pakki E, Himawan A, et al. Enhanced skin localization of metronidazole using solid lipid microparticles incorporated into polymeric hydrogels for potential improved of rosacea treatment: An *ex vivo* proof of concept investigation. *Int J Pharm* [Internet]. 2022 Nov;628:122327. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517322008821>
234. Butler J, Hens B, Vertzoni M, Brouwers J, Berben P, Dressman J, et al. *In vitro* models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms: Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2019 Mar;136:70–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641118311913>
235. Hansen T, Holm P, Schultz K. Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. *Int J Pharm* [Internet]. 2004 Dec;287(1–2):55–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517304005137>
236. Čerpnjak K, Pobirk AZ, Vrečer F, Gašperlin M. Tablets and minitables prepared from spray-dried SMEDDS containing naproxen. *Int J Pharm* [Internet]. 2015 Nov;495(1):336–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315301964>

237. Weathers PJ, Jordan NJ, Lasin P, Towler MJ. Simulated digestion of dried leaves of *Artemisia annua* consumed as a treatment (pACT) for malaria. J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 Feb;151(2):858–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113008477>
238. Marques MRC. Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2014 Dec 19;15(6):1410–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-014-0162-3>

Biografija

Jelena R. Mudrić je rođena 1993. godine u Vojniću. Osnovnu školu je završila kao đak generacije, a potom Prvu beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom. Integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer farmacija, upisala je školske 2012/2013. godine. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije. U septembru 2017. godine je stekla zvanje magistra farmacije. Doktorske akademske studije, modul farmaceutska tehnologija je započela 2017. godine na istom fakultetu. Položila je sve ispite predviđene programom navedenog modula sa prosečnom ocenom 9,80. Pripravnički staž obavila je u Apoteci „Beograd” u toku 2017/2018. godine, a stručni ispit za magistra farmacije položila je u januaru 2019. godine.

Bila je zaposlena na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, gde je bila uključena u izvođenje praktične nastave tokom školske 2017/2018. godine. Od jula 2018. godine zaposlena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” u Odseku za farmaceutska istraživanja i razvoj. Učestvovala je u projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, projektu Eureka i bilateralnom projektu sa Crnom Gorom. Takođe, bila je angažovana i na većem broju internih projekata Instituta, koji su rezultirali novim proizvodima na tržištu. U toku doktorskih studija bila je uključena u izradu dva diplomski rada realizovana na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. Autor je 16 članaka u međunarodnim i domaćim časopisima od kojih su pet objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a) i četiri u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jelena Mudrić

Broj indeksa 31/2017

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Razvoj čvrstih farmaceutskih oblika na bazi gastroretentivnih flotirajućih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*)

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora	<u>Jelena Mudrić</u>
Broj indeksa	<u>31/2017</u>
Studijski program	<u>Doktorske akademske studije – farmaceutska tehnologija</u>
Naslov rada	<u>Razvoj čvrstih farmaceutskih oblika na bazi gastroretentivnih flotirajućih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure (<i>Gentiana lutea</i> L., <i>Gentianaceae</i>)</u>
Mentor	<u>Dr sc. Jelena Đuriš, redovni profesor Dr sc. Katarina Šavikin, naučni savetnik</u>

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetožar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Razvoj čvrstih farmaceutskih oblika na bazi gastroretentivnih flotirajućih nosača sa inkapsuliranim ekstraktom korena lincure (*Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*)

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.