



**Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**

mgr farm. Joanna Potaś

*„Ocena możliwości wykorzystania kompleksów polielektrolitowych
wytworzonych z udziałem polimerów pochodzenia naturalnego
jako nośników leków do podania na błonę śluzową jamy ustnej”*

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Białystok 2023

Promotor

prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Winnicka

*Kierownik Zakładu Farmacji Stosowanej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku*

*Składam serdeczne podziękowania
Pani prof. dr hab. Katarzynie Winnickiej
za przekazaną wiedzę, opiekę naukową, pomoc oraz okazaną zyczliwość
podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję **Koleżankom z Zakładu Farmacji Stosowanej UMB**
za wszelką pomoc i wsparcie.*

Spis treści

<i>Wykaz skrótów i symboli</i>	5
<i>Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej</i>	6
<i>Prace oryginalne</i>	6
<i>Prace przeglądowe</i>	6
<i>Wykaz publikacji związanych tematycznie z rozprawą doktorską</i>	7
<i>Wprowadzenie</i>	8
<i>Błona śluzowa jamy ustnej jako miejsce aplikacji substancji leczniczych</i>	8
<i>Wymagania stawiane postaciom leku przeznaczonym na błonę śluzową jamy ustnej</i> ..	8
<i>Hydrożele i filmy na bazie kompleksów polielektrolitowych jako atrakcyjne formy podania leków na błonę śluzową jamy ustnej</i>	9
<i>Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej będący odniesieniem do publikacji stanowiących rozprawę doktorską</i>	14
<i>Opis zrealizowanych celów naukowych</i>	19
<i>Wnioski</i>	29
<i>Piśmiennictwo</i>	30
<i>Streszczenie w języku polskim</i>	36
<i>Streszczenie w języku angielskim</i>	38
<i>Publikacja nr 1</i>	40
<i>Publikacja nr 2</i>	41
<i>Publikacja nr 3</i>	42
<i>Publikacja nr 4</i>	43
<i>Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej</i>	44
<i>Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej</i>	45
<i>Dorobek naukowy</i>	46
<i>Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej</i>	46
<i>Prace oryginalne</i>	46
<i>Prace przeglądowe</i>	46
<i>Wykaz innych publikacji naukowych</i>	47
<i>Wykaz doniesień zjazdowych</i>	48
<i>Wykaz innych aktywności naukowych</i>	49

Wykaz skrótów i symboli

PECs – ang. *polyelectrolyte complexes* – kompleksy polielektrolitowe

PEMs – ang. *polyelectrolyte multilayers* – filmy wielowarstwowe na bazie kompleksów polielektrolitowych

Lbl – ang. *layer – by – layer technique* – technika naprzemiennego nanoszenia warstw polikationu i polianionu

DSC – ang. *differential scanning calorimetry* – technika różnicowej kalorymetrii skaningowej

ATR – FTIR – ang. *attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy* – spektroskopia fourierowska w podczerwieni wykonana metodą osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia

SEM – ang. *scanning electron microscopy* – skaningowa mikroskopia elektronowa

PC010, PC020 – pektyny o różnym stopniu wrażliwości na jony wapnia

HPLC – ang. *high performance liquid chromatography* – wysokosprawna chromatografia cieczowa

TS – ang. *tensile strength* – wytrzymałość na rozciąganie

% E – ang. *the percentage elongation at break* – procent wydłużenia przy zerwaniu

E – ang. *Young modulus* – moduł Younga

TR – ang. *tear resistance* – odporność na rozerwanie

MTT – test służący analizie aktywności metabolicznej komórki, oparty na zjawisku przekształcenia rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3 – (4, 5 – dimetylotiazol – 2 – yl) – 2, 5 – difenyloctetrazoliowy) w nierozpuszczalny formazan przez dehydrogenazę mitochondrialną

BCS – ang. *biopharmaceutics classification system* – system klasyfikacji biofarmaceutycznej

PEG 400 – glikol polietylenowy 400

TGA – ang. *thermogravimetric analysis* – analiza termogravimetryczna

Rozdział 1

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Publikacje związane bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej opublikowane w czasopismach z Listy Filadelfijskiej posiadających współczynnik oddziaływania.

Łączna punktacja za publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Impact factor (IF): 21,079 pkt., punktacja MEiN: 480 pkt.

Prace oryginalne

1. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Basa, A.; Hafner, A.; Winnicka, K. Tragacanth gum/chitosan polyelectrolyte complexes – based hydrogels enriched with xanthan gum as promising materials for buccal application. *Materials*, 2021, 14, 86, <https://doi.org/10.3390/ma14010086> (3,748 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).
2. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Wróblewska, M.; Kurowska, I.; Maciejczyk, M.; Basa, A.; Wolska, E.; Wilczewska, A.Z.; Winnicka, K. Multilayer films based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes as novel platforms for buccal administration of clotrimazole. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1588, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101588> (6,525 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).
3. **Potaś, J.**; Wilczewska, A.Z.; Misiak, P.; Basa, A.; Winnicka, K. Optimization of multilayer films composed of chitosan and low – methoxy amidated pectin as multifunctional biomaterials for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 8092, <https://doi.org/10.3390/ijms23158092> (6,208 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).

Prace przeglądowe

1. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Winnicka, K. Challenges in developing of chitosan – based polyelectrolyte complexes as a platform for mucosal and skin drug delivery. *European Polymer Journal*, 2020, 140, 110020, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110020> (4,598 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).

Wykaz publikacji związanych tematycznie z rozprawą doktorską

1. **Potaś, J.;** Winnicka, K. The potential of polyelectrolyte multilayer films as drug delivery materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 3496, <https://doi.org/10.3390/ijms23073496> (6,208 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).

Rozdział 2

Wprowadzenie

Błona śluzowa jamy ustnej jako miejsce aplikacji substancji leczniczych

Błona śluzowa jamy ustnej stanowi atrakcyjne miejsce podania leków o działaniu zarówno ogólnym, jak i miejscowym [1-3]. Dzięki cechom, takim jak wysoka przepuszczalność, łatwa dostępność umożliwiająca komfortową aplikację i szybkie usunięcie preparatu w przypadku wystąpienia działań niepożądanych, brak efektu pierwszego przejścia oraz ryzyka rozkładu substancji czynnej pod wpływem niskiego pH soku żołądkowego i enzymów przewodu pokarmowego, może być wykorzystywana jako alternatywna drogi podania leków o działaniu ogólnoustrojowym. Powierzchnia błony śluzowej jamy ustnej wynosi ok. 100 cm², z czego 50 cm² stanowi błona śluzowa policzka – najbardziej przydatna w aplikacji preparatów farmaceutycznych. Z uwagi na brak zrogowaciałego nabłonka, szybkość przenikania substancji leczniczych przez błonę śluzową policzka może być ok. 4 – 400 – krotnie wyższa w porównaniu z penetracją przez skórę czy podniebienie. Transport związków aktywnych odbywa się głównie na drodze dyfuzji biernej, rzadziej na drodze transportu czynnego czy pinocytozy [2].

Wymagania stawiane postaciom leku przeznaczonym na błonę śluzową jamy ustnej

Największym wyzwaniem w projektowaniu nośników na błonę śluzową jamy ustnej jest zapewnienie odpowiednio długiego czasu przebywania preparatów w miejscu aplikacji. Z uwagi na aktywność erozyjną, a więc zdolność szybkiego wymywania preparatów z miejsca podania, ślina obecna w jamie ustnej jest czynnikiem znacząco ograniczającym czas przebywania leków *in situ*. Aby temu zapobiec, konieczne jest projektowanie nośników z wykorzystaniem polimerów o właściwościach mukoadhezyjnych – tworzących wiązania chemiczne pierwszorzędowe typu kowalencyjnego lub drugorzędowe (np. wiązania *van der Waalsa* czy wodorowe) z glikoproteinami mucyny, będącej istotną składową warstwy śluzowej błony [4]. Właściwościami mukoadhezyjnymi cechują się szczególnie polimery o dużej masie cząsteczkowej i aktywności powierzchniowej. Wymagania dla dopoliczkowych postaci leku wskazują również na konieczność zapewnienia ukierunkowanego i kontrolowanego uwalniania substancji leczniczej z matrycy nośnika w stronę błony

śluzowej jamy ustnej, zmniejszenia działania drażniącego oraz ograniczenia wpływu preparatu na czynności, takie jak mówienie, picie czy jedzenie [5].

Hydrożele i filmy na bazie kompleksów polielektrolitowych jako atrakcyjne formy podania leków na błonę śluzową jamy ustnej

Spośród różnych form podania leków przeznaczonych na błonę śluzową jamy ustnej, dużym zainteresowaniem cieszą się formy hydrożelowe oraz filmy [6-7]. Szczególnie obiecujące wydają się nośniki powstałe przez zmieszanie przeciwnie naładowanych związków makrocząsteczkowych (polielektrolitów) [8-10]. Określa się je jako systemy oparte na kompleksach polielektrolitowych (polikompleksach, ang. *polyelectrolyte complexes*, PECs).

Polikompleksy to mniej lub bardziej złożone połączenia przeciwnie naładowanych związków wielkocząsteczkowych [11]. Ocena ich przydatności w technologii nowoczesnych postaci leku stanowi przedmiot badań od wielu lat, przy czym znaczna większość analizowanych kompleksów polimerowych oparta jest na połączeniach dodatnio naładowanego chitozanu z polianionami pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego. Chitozan to polisacharyd o strukturze liniowej, złożony z jednostek D – glukozaminy i N – acetylo – D – glukozaminy połączonych wiązaniem $\beta - 1, 4$ – glikozydowym. Za kationowy charakter polimeru odpowiadają grupy aminowe zdolne do tworzenia odwracalnych połączeń jonowych w ramach kompleksu polielektrolitowego [12-13]. Ponadto, grupy te są odpowiedzialne za właściwości mukoadhezyjne [14], przeciwdrobnoustrojowe [15-16], przeciwzapalne czy hemostatyczne chitozanu [17]. Wielofunkcyjność polimeru jest głównym powodem jego szerokiego wykorzystania w technologii produktów leczniczych i wyrobów medycznych. Potencjał aplikacyjny polikationu przewyższa trudności technologiczne związane z jego właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak ograniczona rozpuszczalność w wodzie, wysoka wrażliwość na obecność jonów, przejawiająca się tendencją do niekontrolowanego pęcznienia w środowisku wodnym czy słabe właściwości reologiczne półstałych nośników na bazie chitozanu [18]. Łączenie chitozanu z substancjami o charakterze polianionów ma na celu wytworzenie polielektrolitowych systemów o cechach będących wypadkową właściwości poszczególnych ich składowych. PECs uznaje się bowiem za złożone struktury o wyjątkowym charakterze, w których kompleksowanie polimerów (takich jak chitozan) ma na celu poprawę ich właściwości aplikacyjnych poprzez dodatek

polielektrolitów rekompensujących cechy niepożądane. Wytworzenie polikompleksów nie wymaga użycia dodatkowych czynników sieciujących [11]. Proces kompleksowania zachodzi zazwyczaj po zmieszaniu roztworów związków o przeciwnych ładunkach, a wytrącające się struktury wielkocząsteczkowe podlegają stopniowemu uporządkowaniu z wytworzeniem wiązań hydrofobowych czy *van der Waalsa* wspierających oddziaływania elektrostatyczne polimerów [14]. Z uwagi na charakter powstającego polikompleksu, PECs dzielą się na nierozpuszczalne struktury stechiometryczne, gdzie ilości ładunków dodatnich/ujemnych są jednakowe, dzięki czemu dochodzi do zneutralizowania ładunku powstającego kompleksu, oraz niestechiometryczne – rozpuszczalne w wodzie na skutek przewagi ilościowej jednego z zastosowanych polielektrolitów. Ze względu na zjawisko precypitacji cząstek polikompleksu, zachowanie homogenności układu stanowi wyzwanie technologiczne na etapie wytwarzania PECs. Optymalizacja procesu poprzez dobór odpowiednich warunków – pH, siły jonowej czy temperatury – stanowi zatem bardzo istotny element technologii polikompleksów, pozwalający na kontrolowane otrzymywanie złożonych systemów o pożądanym właściwościach aplikacyjnych [19-20].

Jak wspomniano wcześniej, szereg związków makrocząsteczkowych o charakterze polianionów może być wykorzystany w procesie wytwarzania polikompleksów [21]. W badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej wykonano i poddano analizie farmaceutycznej nośniki wytworzone z udziałem chitozanu o zróżnicowanej masie cząsteczkowej i różnym stopniu deacetylacji z polisacharydami pochodzenia naturalnego, takimi jak guma tragakanta, guma ksantanowa oraz pektyny. Krótką charakterystykę zastosowanych polianionów przedstawiono poniżej.

Guma tragakanta to polimer pochodzenia naturalnego, otrzymywany z roślin, z rodzaju *Astragalus* (traganek), będący mieszaniną monocukrów, szczególnie kwasu D – galakturonowego. Wodne dyspersje tragakanty składają się z rozpuszczonej frakcji tragakantyny oraz kwasu tragakantowego (20 – 30%), podczas gdy pozostałe 60 – 70% stanowi nierozpuszczalna, ale pęczniejąca w wodzie bazoryna, pozbawiona ujemnie naładowanych grup karboksylowych. Z uwagi na wysoką stabilność polimeru w szerokim zakresie pH i temperatury oraz wyjątkowe właściwości reologiczne, m.in. wysoką lepkość tworzonych układów, tragakantę z powodzeniem stosuje się w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym, przede wszystkim jako środek zwiększający lepkość [22-24].

Naturalnym źródłem gumy ksantanowej jest szczep bakteryjny *Xanthomonas campestris*. Polisacharyd składa się z jednostek D – glukozy, D – mannozy oraz kwasu D – glukuronowego, odpowiedzialnego za anionowy charakter gumy [25-26]. Ze względu na korzystne właściwości aplikacyjne, takie jak zdolność zwiększania lepkości i opóźniania dezintegracji matrycy polimerowej, działanie stabilizujące oraz właściwości mukoadhezyjne, guma ksantanowa jest często wykorzystywana jako substancja pomocnicza w technologii postaci leków zarówno do podania doustnego, jak i miejscowego. Ponadto, polimer ten charakteryzuje się wysoką odpornością na zróżnicowane warunki pH i temperatury. Hydrożele na bazie gumy ksantanowej należą do grupy tzw. „inteligentnych” hydrożeli, ze względu na zdolność wytwarzania struktur o zwiększonej lepkości *in situ*, w obecności lizozymu [27-28].

Pektyna to kolejny przykład polimeru pochodzenia naturalnego o charakterze polianionu [23,29]. Zaliczana jest do grupy polisacharydów złożonych z cząsteczek kwasu D – galakturonowego połączonych wiązaniami $\alpha - (1, 4) -$ glikozydowymi, dobrze rozpuszczalnych w wodzie, tworzących roztwory o niskiej lepkości. W zależności od stopnia estryfikacji grup karboksylowych resztami metylowymi, grupę „pektyn” można podzielić na odmiany nisko (< 50%) oraz wysoko metoksyłowane ($\geq 50\%$). Pektyna o wysokiej zawartości zestryfikowanych grup karboksylowych tworzy układy hydrożelowe w pH ok. 3, w obecności cząstek stałych, podczas gdy nisko metoksyłowana forma żeluje wyłącznie w obecności jonów dwuwartościowych, szczególnie wapniowych. Wraz ze wzrostem stężenia jonów, odporność mechaniczna tworzącego się żelu rośnie, osiągając wartość krytyczną, powyżej której następuje jej zauważalny spadek. Stopień wrażliwości pektyny na obecność jonów wapnia (ang. *calcium reactivity*) jest jednym z głównych czynników różnicujących dostępne na rynku surowce. W technologii farmaceutycznej pektyna znana jest przede wszystkim jako środek dyspergujący, zwiększający lepkość, a z uwagi na dużą zdolność do mukoadhezji, także jako nośnik substancji leczniczych w preparatach przeznaczonych na błony śluzowe [30-31].

Zgodnie z definicją farmakopealną, hydrożele to półstałe postacie leków, których podstawę stanowi faza wodna żelowana za pomocą substancji nieorganicznych lub organicznych [32]. Hydrożele wykorzystywane są przede wszystkim jako nośniki substancji czynnych do podania na skórę owłosioną, błonę śluzową czy do oka. Z uwagi na obecność fazy wodnej, postacie te wymagają dodatku substancji konserwujących. Ponadto, aby ograniczyć szybkie wysychanie hydrożeli, często stosuje się dodatek

glicerolu lub glikolu propylenowego. Projektowanie biodegradowalnych i biozgodnych hydrożeli z wykorzystaniem polimerów pochodzenia naturalnego o wysokiej mukoadhezyjności wydaje się perspektywicznym kierunkiem rozwoju tych form [33-34].

Filmy to elastyczne matryce polimerowe o dużej zdolności przylegania do błony śluzowej. Poza funkcją nośnika substancji czynnej, stanowią one jednocześnie barierę ochronną dla tkanki objętej procesem chorobowym, stwarzając dogodne warunki w procesie jej regeneracji [4]. Uwalnianie leku z matrycy polimerowej może odbywać się jedno – lub wielokierunkowo. W celu ograniczenia uwalniania leku do światła jamy ustnej, wytwarza się filmy z warstwą nierozpuszczalnego w wodzie polimeru, np. etylocelulozy [35-36]. Systemy wielokompartментowe wykorzystywane są natomiast do równoczesnego podawania kilku substancji czynnych, jak również w celu zapewnienia modyfikowanego uwalniania leków, na skutek doboru polimerów o różnej rozpuszczalności, a tym samym o różnym czasie rozpadu w warunkach jamy ustnej. Szczególnie interesującym przykładem tego rodzaju systemów są filmy na bazie PECs.

Filmy stworzone w oparciu o polimery oddziałujące ze sobą w sposób jonowy (ang. *polyelectrolyte multilayers*, PEMs) stanowią ważny obszar inżynierii biomedycznej, ze względu na ich szerokie zastosowanie w wytwarzaniu wielowarstwowych „błon” o właściwościach terapeutycznych [37-38]. Poprzez właściwy dobór polimerów, dąży się również do uzyskania biozgodnych systemów o właściwościach regenerujących, szczególnie istotnych w produkcji materiałów opatrunkowych czy do implantacji. Dzięki zastosowaniu wieloetapowej techniki wytwarzania, PEMs są przykładem mniej lub bardziej złożonych układów wielokompartментowych, umożliwiających kontrolowane uwalnianie jednej lub kilku substancji leczniczych w miejscu zmienionym chorobowo. Największą popularnością w technologii PEMs cieszy się technika wieloetapowego i naprzemiennego zanurzania materiału stałego w roztworach polimerów o charakterze polikationów i polianionów, w celu wytworzenia warstw polikompleksu (tzw. *layer – by – layer technique*, Lbl) [37,39]. Nadmiar polimerów niezwiązanych jonowo jest wmywany, dzięki czemu poszczególne warstwy polikompleksu stykają się ze sobą, a sam proces umożliwia tworzenie wielowarstwowych materiałów o ściśle określonym kształcie, wymiarach czy cechach strukturalnych. Prostsza, mniej kosztowna, ale bardziej czasochłonna technika wytwarzania filmów wielowarstwowych jest metoda ewaporacji rozpuszczalnika (ang. *solvent evaporation/casting technique*), polegająca na wieloetapowym wylewaniu

roztworów/dyspersji polimerów na szalki Petriego z późniejszym odparowaniem użytych rozpuszczalników, najczęściej w warunkach podwyższonej temperatury. Pomimo wymienionych zalet, użyteczność techniki ewaporacji ogranicza się do sporządzania maksymalnie kilkuwarstwowych filmów złożonych z warstw polikationu i polianionu oddzielonych warstwą polikompleksu, tworzącego się na granicy stykających się ze sobą polielektrolitów o przeciwnych ładunkach.

Rozdział 3

Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej będący odniesieniem do publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Głównym założeniem pracy doktorskiej była ocena możliwości wykorzystania PECs wytworzonych z udziałem polimerów pochodzenia naturalnego, jako nośników leków do podania na błonę śluzową jamy ustnej.

Analiza piśmiennictwa poświęconego zagadnieniom PECs jako nośników dla leków do podania miejscowego wskazała na konieczność dwuetapowej oceny tego rodzaju systemów (*Rozdział 9, Publikacja nr 1*). Zaobserwowano, iż właściwą ocenę farmaceutyczną preparatów powinna każdorazowo poprzedzać analiza właściwości fizykochemicznych uzyskanych połączeń jonowych. Polikompleksy, jako struktury wysoce wrażliwe na zmiany pH, siły jonowej czy obecność związków zdolnych do dysocjacji, wymagają wnikliwej analizy na etapie opracowywania składu i technologii wytwarzania nośników opartych na oddziaływaniach elektrostatycznych polimerów. Jednym z głównych wniosków przywołanej powyżej pracy poglądowej było wskazanie na niedostateczną ilość danych poświęconych technologicznym aspektom wytwarzania polikompleksów.

Część doświadczalną pracy podzielono w następujący sposób. Hydrożele jako relatywnie prosta w wykonaniu forma podania leku, a przy tym użyteczna w miejscowym leczeniu stanów chorobowych jamy ustnej [3,40], stały się punktem wyjściowym w pracy nad oceną przydatności polikompleksów w technologii farmaceutycznej (*Rozdział 10, Publikacja nr 2*). Układy złożone z chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej oraz tragakanty z dodatkiem lub bez dodatku gumy ksantanowej – środka stabilizującego oddziaływania jonowe i poprawiającego właściwości mechaniczne oraz mukoadhezyjne nośników – zostały poddane wielokierunkowej analizie, mającej na celu ocenę aplikacyjności wybranych połączeń w dostarczaniu leków na błonę śluzową policzka. Badania nad hydrożelami będącymi układami *placebo* miały za zadanie dostarczenie informacji odnośnie trwałości i użyteczności wspomnianych połączeń polielektrolitowych. Rezygnacja z dodatku substancji leczniczej na tym etapie wynikała z chęci ograniczenia liczby czynników mogących wpłynąć na charakter oddziaływań chitozan – gumy i uzyskania wyników badań mogących pomóc w lepszym zrozumieniu molekularnych mechanizmów tworzenia PECs, istotnych dla ich późniejszego wykorzystania nie tylko w celach

farmaceutycznych, ale również w technologii chemicznej czy innych dziedzinach nauk biomedycznych.

Spośród ocenionych połączeń hydrożelowych (*Tabela 1*), formuacja F5 o stosunku wagowym chitozanu do tragakanty i gumy ksantanowej, odpowiednio, 1:10:1 została uznana za optymalną. Na jej podstawie planuje się opracowanie biodegradowalnego i biozgodnego nośnika hydrożelowego służącego dodziąsłowej i/lub dopoliczkowej aplikacji seknidazolu. Ze względu na korzystny profil bezpieczeństwa i szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, substancja ta wykazuje wysoki potencjał terapeutyczny, który może mieć zastosowanie w leczeniu wspomagającym chorób przyzębia, a szczególnie parodontozy.

Tabela 1. Skład hydrożeli placebo.

Hydrożel	Stosunek polimerów (w/w)	
	TG:CS ¹	XG:CS ¹
F1	20:1	×
F2	10:1	×
F3	7:1	×
F4	20:1	2:1
F5	10:1	1:1
F6	7:1	0,7:1

¹ TG – tragakanta, CS – chitozan, XG – guma ksantanowa.

Ze względu na atrakcyjność filmów mukoadhezyjnych jako form podania leków na błonę śluzową, a przy tym niewielką ilość danych literaturowych poświęconych ocenie farmaceutycznej wielowarstwowych struktur na bazie PECs, podjęto próbę opracowania składu i technologii struktur o charakterze PEMs jako dopoliczkowych nośników dla klotrimazolu (*Rozdział 11, Publikacja nr 3*). Do sporządzenia filmów wykorzystano chitozan o wysokiej masie cząsteczkowej oraz wysoce metoksylowaną pektynę – połączenie szczególnie rekomendowane w technologii filmów przeznaczonych do podania dopoliczkowego czy dodziąsłowego [41-43]. Wybór chitozanu wielkocząsteczkowego jako komponenty polikationowej (*Tabela 2*) wynikał z udowodnionego synergistycznego wpływu polimeru na aktywność przeciwgrzybiczą klotrimazolu [44]. Sporządzone filmy zostały ocenione pod kątem ich zdolności mukoadhezyjnych, odporności mechanicznej, kinetyki uwalniania leku czy pęcznienia w różnych warunkach pH, imitujących stan jamy ustnej przed i po spożyciu posiłku. W ramach oceny właściwości biologicznych przeanalizowano natomiast ich aktywność przeciwgrzybiczą oraz cytotoksyczną. Wyniki otrzymanych badań poddano dyskusji

w oparciu o wykonaną charakterystykę oddziaływań tworzących się pomiędzy przeciwnie naładowanymi polimerami. Do oceny interakcji chitozanu i pektyny wykorzystano technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. *differential scanning calorimetry*, DSC) oraz spektroskopię fourierowską w podczerwieni (ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) wykonaną metodą osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *attenuated total reflectance FTIR*, ATR – FTIR).

Tabela 2. Skład filmów z klotrimazolem.

Formulacja	Zawartość klotrimazolu (%)	
	Warstwa pektynowa	Warstwa chitozanowa
F1	50,0	50,0
F2	33,3	66,7
F3	0,0	100,0

Przydatność filmów wielowarstwowych jako nośników dla klotrimazolu zaowocowała przeprowadzeniem szczegółowej analizy literatury poświęconej wykorzystaniu PEMs w technologii farmaceutycznej, chemicznej czy w szeroko pojętej inżynierii biomedycznej [45]. W pracy przeglądowej zwrócono szczególną uwagę na istotność wpływu czynników zewnętrznych i wewnętrznych na charakterystykę fizykochemiczną i właściwości farmaceutyczne filmów, wskazując tym samym na potrzebę optymalizacji zarówno procesu technologicznego, jak i składu tych wielowarstwowych struktur. Na podstawie powyższych obserwacji, przy użyciu techniki ewaporacji rozpuszczalnika sporządzono filmy *placebo* złożone z chitozanu o średniej masie cząsteczkowej oraz pektyny nisko metoksylowanej, a następnie poddano je szczegółowej analizie właściwości mechanicznych, zdolności pęcznienia, a także ocenie struktury wewnętrznej za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) (Rozdział 12, **Publikacja nr 4**). W celu scharakteryzowania kompleksu chitozanowo – pektynowego, wykonano analizę termiczną, FTIR, pomiary mętności oraz potencjału zeta mieszanin polielektrolitów odpowiadających składowi filmów. Wśród czynników zewnętrznych podlegających optymalizacji uwzględniono stosunek wagowy polimerów, kolejność wylewania roztworów na szalkę Petriego oraz stopień wrażliwości pektyny na obecność jonów wapnia. Celem optymalizacji technologii otrzymywania filmów na bazie chitozanu i nisko metoksylowanej pektyny o różnej wrażliwości na jony wapnia (PC010, PC020) było opracowanie biogodnych i biodegradowalnych systemów o wydłużonym czasie przebywania w miejscu podania i wysokiej odporności mechanicznej jako

potencjalnych nośników dla substancji leczniczych stosowanych w miejscowym leczeniu zmian chorobowych w jamie ustnej (Tabela 3).

Tabela 3. Skład optymalizowanych filmów placebo.

Film	CS:PC	Warstwa I	Warstwa II
F1 ¹	1:1	2% CS	2% PC010
F2 ¹		2% CS	2% PC020
F3 ¹		2% PC010	2% CS
F4 ¹		2% PC020	2% CS
F5	1:10	0,2% CS	2% PC010
F6		0,2% CS	2% PC020
F7		2% PC010	0,2% CS
F8		2% PC020	0,2% CS
F9	10:1	2% CS	0,2% PC010
F10		2% CS	0,2% PC020
F11		0,2% PC010	2% CS
F12		0,2% PC020	2% CS
F13 ¹	1:1	1,1% CS	1,1% PC010
F14 ¹		1,1% CS	1,1% PC020
F15 ¹		1,1% PC010	1,1% CS
F16 ¹		1,1% PC020	1,1% CS

¹ Filmy z jednakowym stosunkiem polimerów, ale różną sumaryczną zawartością chitozanu (CS) i pektyny (PC010, PC020).

Cele szczegółowe pracy obejmowały:

- opracowanie składu i technologii otrzymywania hydrożeli na bazie chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej oraz gumy tragakanty i gumy ksantanowej – komponenty polianionowej – jako nośnika *placebo* dla leków aplikowanych na błonę śluzową jamy ustnej; wytypowanie formułacji o największej mukoadhezyjności i optymalnych właściwościach reologicznych dla podania dopoliczkowego/dodziąsłowego; charakterystykę fizykochemiczną tworzącego się polikompleksu (*Rozdział 10, Publikacja nr 2*),
- opracowanie składu i technologii otrzymywania wielowarstwowych filmów na bazie chitozanu o wysokiej masie cząsteczkowej oraz wysoce metoksyloowanej pektyny jako wielokompartmentowych systemów z klotrimazolem; ocenę ich przydatności do kontrolowanego dostarczania leków na błonę śluzową jamy ustnej z jednoczesną charakterystyką fizykochemiczną kompleksu chitozanowo – pektynowego tworzącego się na granicy warstw polielektrolitów (*Rozdział 11, Publikacja nr 3*),

- optymalizację technologii otrzymywania filmów wielowarstwowych złożonych z chitozanu o średniej masie cząsteczkowej oraz nisko metoksyloowanej pektyny przy użyciu metody ewaporacji rozpuszczalnika; ocenę wpływu stopnia wrażliwości pektyny na obecność jonów wapnia, zastosowanego stosunku polielektrolitów oraz kolejności łączenia składników na właściwości fizykochemiczne tworzącego się polikompleksu; wytypowanie systemu o optymalnych dla podania dopoliczkowego właściwościach aplikacyjnych (*Rozdział 12, Publikacja nr 4*).

Rozdział 4

Opis zrealizowanych celów naukowych

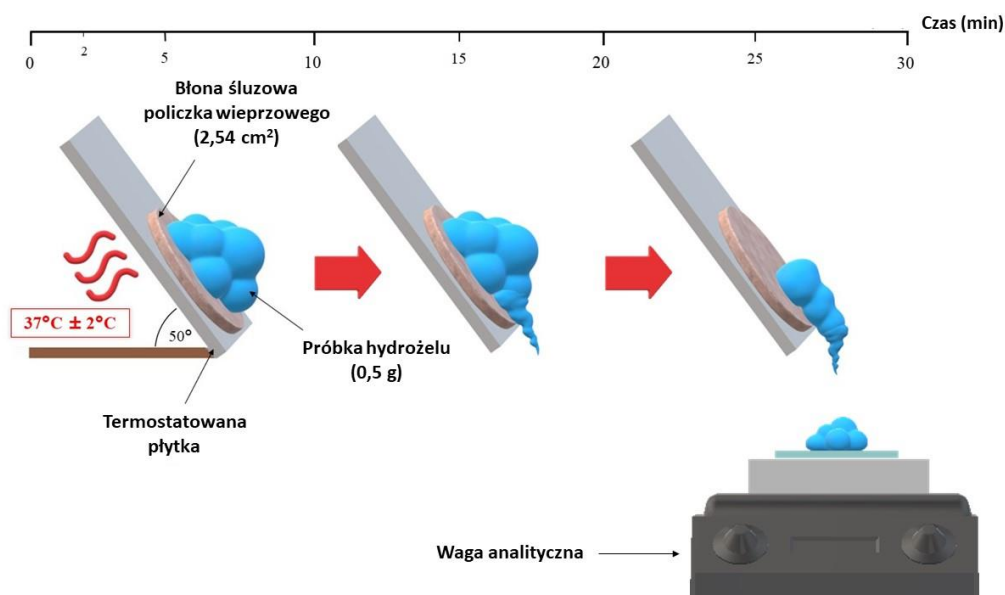
Najistotniejszym celem rozprawy doktorskiej była ocena przydatności hydrożeli i filmów powstałych przez zmieszanie przeciwnie naładowanych polielektrolitów jako form podania substancji przeciwdrobnoustrojowych służących miejscowemu leczeniu infekcji grzybiczych i bakteryjnych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Z uwagi na wysoką wrażliwość PECs na zmieniające się pH, aktywność jonową czy obecność substancji będących nośnikiem ładunku, zauważa się liczne trudności w technologii systemów na bazie polikompleksów. Zasadne zatem wydało się dokonanie oceny możliwości projektowania i sporządzania nośników będących połączeniem polianionów i polikationów, analiza ich użyteczności w oparciu o wybrane parametry farmaceutyczne, a także ocena możliwości optymalizacji materiałów na bazie PECs, na podstawie uzyskanych wyników analiz fizykochemicznych tworzących się polikompleksów.

W pierwszym etapie badań opracowano technologię hydrożeli *placebo* na bazie chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej (stopień deacetylacji: 79,9%, lepkość: 31 – 70 mPa·s dla 1% roztworu chitozanu w 1% kwasie octowym, masa cząsteczkowa: 232 kDa) i gumy tragakanty z dodatkiem lub bez dodatku gumy ksantanowej (*Rozdział 10, Publikacja nr 2*). Rezygnacja z inkorporacji substancji leczniczej pozwoliła wyeliminować jeden z potencjalnych czynników modyfikujących charakter i/lub intensywność oddziaływań pomiędzy przeciwnie naładowanymi polielektrolitami. Spośród sześciu formułacji o różnym stosunku polimerów, hydrożel F6 cechował się znacznym rozdziałem faz, przez co został wykluczony z dalszej analizy. Formułacje zostały wykonane metodą ręczną z użyciem moździerza i pistla, przez stopniowe wprowadzanie 4% (w/w) roztworu chitozanu w 1% (w/w) kwasie octowym do mieszaniny 5% (w/w) tragakanty i 0,5% (w/w) gumy ksantanowej – komponenty polianionowej o większej lepkości. Wykonane postaci leku oceniono pod kątem:

- odporności mechanicznej z zastosowaniem analizatora tekstury (*TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Godalming, Wielka Brytania*), z uwzględnieniem takich parametrów, jak twardość (g), konsystencja (g·s) oraz adhezyjność (g·s),
- zdolności utrzymywania się na błonie śluzowej z zastosowaniem samodzielnie wykonanego aparatu do badania mukoadhezyjności (*Rycina 1*),

- lepkości z użyciem lepkościomierza *IKA[®] ROTAVISC me – vi* (*IKA[®] - Werke GmbH and Co. KG*, Staufen, Niemcy) oraz właściwości reologicznych (reometr *Brookfield RVDV – III Ultra*, *Brookfield Engineering Laboratories*, Middleboro, MA, USA) wyposażonego w stożek CPA52Z,
- zdolności pęcznienia hydrożeli w sztucznej ślinie (pH 6,8) przy użyciu koszyczków do aparatu do badania uwalniania,
- struktury wewnętrznej z użyciem mikroskopu SEM (*InspectTMS50*, *FEI Company*, Hillsboro, OR, USA) po uprzedniej 12 – godzinnej liofilizacji hydrożeli w temperaturze – 20 °C (liofilizator *Christ Alpha 1 – 2 LDplus*, *Donserv*, Warszawa, Polska),
- wartości pH przy użyciu pH – metru *Orion 3 Star* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA).

W ramach oceny fizykochemicznej PECs, zliofilizowane hydrożele poddano analizie FTIR (ATR – FTIR, *NicoletTM 6700*, *Thermo Scientific*, Madison, WI, USA). Wskazała ona na obecność wiązań wodorowych oraz grup funkcyjnych zdolnych do tworzenia połączeń jonowych. Ponadto, wykonano pomiary turbidymetryczne, w trakcie których oceniono stopień zmętnienia dyspersji powstałych przez zmieszanie polielektrolitów w stosunkach uwzględniających skład polimerowy hydrożeli. Analizę zmętnieniową przeprowadzono z użyciem turbidymetru *Hach Model 2100 N IS[®] Lab* (*Hach Lange Sp. z o.o.*, Wrocław, Polska). Jej celem było zobrazowanie procesu tworzenia PECs w warunkach wzrastającego stężenia chitozanu, jako potwierdzenie zjawiska kompleksowania zachodzącego w układach hydrożelowych. Opis zależności intensywności zmętnienia od ilości dodanego polikationu pozwolił na wyznaczenie stosunku polimerów koniecznego dla wytworzenia stechiometrycznego polikompleksu. Pomiary turbidymetryczne okazały się cennym źródłem informacji na temat mechanizmu i warunków tworzenia oddziaływań pomiędzy chitozaniem a gumami. Uzyskane mieszaniny polimerów poddano również analizie potencjału zeta oraz przewodnictwa elektrycznego (*Zetasizer NanoZS90*, *Malvern Instruments*, Malvern, Wielka Brytania) w celu określenia ładunku powierzchniowego wytrącających się cząstek polikompleksu.



Rycina 1. Schemat obrazujący metodologię badania mukoadhezyjności wykonanego dla hydrożeli placebo z użyciem samodzielnie skonstruowanego aparatu.

Ze względu na potencjał aplikacyjny filmów jako form podania substancji leczniczych w terapii stanów chorobowych błony śluzowej jamy ustnej, kolejną część rozprawy doktorskiej poświęcono ocenie farmaceutycznej filmów na bazie chitozanu o wysokiej masie cząsteczkowej (stopień deacetylacji: 79,1%, lepkość: 756 mPa·s dla 1% roztworu chitozanu w 1% kwasie octowym, masa cząsteczkowa: 200 – 500 kDa) oraz wysoce metoksylowanej pektyny (stopień estryfikacji: 65 – 75%, zawartość grup metoksylowych: 6,7 – 12%, lepkość 2% roztworu: 200 – 450 mPa·s, zawartość grup galakturonowych: ≥ 74%) (*Rozdział 11, Publikacja nr 3*). Trudności technologiczne w otrzymaniu jednorodnych materiałów, na skutek wytrącania się cząstek PECs na etapie mieszania polimerów skłoniły do podjęcia prób naprzemiennego nanoszenia warstw, odpowiednio, polikationu i polianionu na szalkę Petriego. W kolejnym etapie badań oceniono wpływ polikompleksu tworzącego się na styku sąsiadujących warstw na właściwości filmów. W ramach analizy fizykochemicznej i farmaceutycznej otrzymanych filmów, dokonano oceny:

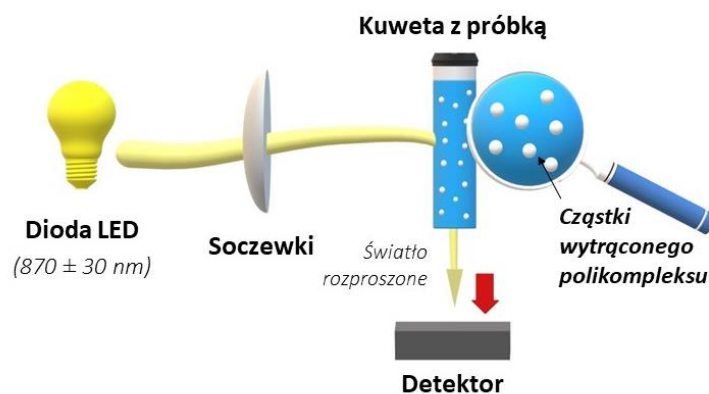
- grubości przy użyciu suwmiarki elektronicznej (*Beta 1651DGT*, Mediolan, Włochy),
- jednolitości masy za pomocą wagi analitycznej (*Radwag X2*, Radom, Polska),
- zawartości wilgoci za pomocą wagosuszarki (*Radwag WSP 50SX*, Radom, Polska),
- wpływu filmów na pH sztucznej śliny przy użyciu pH – metru *Orion 3 Star*,

- zawartości klotrimazolu jako modelowej substancji czynnej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC, *Agilent Technologies 1200*, Santa Clara, CA, USA),
- właściwości mechanicznych z uwzględnieniem parametrów, takich jak wytrzymałość na rozciąganie (ang. *tensile strength*, TS), % wydłużenie przy zerwaniu (ang. *elongation at break*, % E), moduł Younga (ang. *Young modulus*, E) czy odporność na rozerwanie (ang. *tear resistance*, TR) wyznaczanych przy użyciu analizatora tekstury,
- przekroju poprzecznego filmów z użyciem SEM,
- właściwości termicznych przy wykorzystaniu DSC (*DSC TEQ2000*, *TA Instruments*, New Castle, DE, USA),
- charakteru oddziaływań polimerów za pomocą FTIR,
- szybkości uwalniania klotrimazolu z matrycy filmów przy pomocy aparatu II do badania uwalniania (*Erweka Paddle Dissolution Tester type DT 600HH*, Heusenstamm, Niemcy),
- szybkości pęcznienia i erozji matrycy polimerowej,
- właściwości mukoadhezyjnych z użyciem analizatora tekstury,
- aktywności przeciwgrzybiczej metodą dyfuzyjno – krążkową,
- cytotoksyczności wobec fibroblastów skóry ludzkiej przy użyciu czterech niezależnych technik badawczych: testu MTT, badania intensywności syntezy DNA z wykorzystaniem znakowanej trytem tymidyny, badania szybkości wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz testu *Real – Time – GloTM*, służącego detekcji apoptozy i nekrozy komórek z wykorzystaniem aneksyny V.

Wyniki badań pilotażowych nad filmami chitozanowo – pektynowymi bez zainkorporowanej substancji leczniczej wskazały na użyteczność opracowanej technologii w otrzymywaniu wizualnie jednorodnych systemów o wielowarstwowej strukturze. W kolejnym etapie, podjęto próbę stworzenia wielokompartimentowego nośnika dla klotrimazolu – substancji przeciwgrzybiczej z grupy imidazoli o szerokim spektrum aktywności wobec dermatofitów, a także drożdżaków z rodzaju *Candida*, odpowiedzialnych za nawracające i trudne w leczeniu zakażenia w obrębie błony śluzowej jamy ustnej [46-47]. Za główny czynnik etiologiczny kandydozy jamy ustnej uznaje się gatunek *C. albicans* zdolny do indukowania zakażeń oportunistycznych, szczególnie u pacjentów onkologicznych oraz nosicieli wirusa HIV [48-49]. Rosnąca

lekooporność drobnoustrojów oraz problem szybkiego wymywania preparatów aplikowanych na błonę śluzową jamy ustnej skłaniają do poszukiwania mukoadhezyjnych, biodegradowalnych i biozgodnych nośników nasilających aktywność przeciwgrzybiczą substancji aktywnej. Klotrimazol należy do II grupy BCS (ang. *biopharmaceutics classification system*), a zatem jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie (0,49 mg/ml) i charakteryzuje się niską biodostępnością, przez co jest szczególnie przydatny w miejscowym leczeniu infekcji grzybiczych na skórze, błonie śluzowej pochwy oraz jamy ustnej [46-47]. Ponadto, na uwagę zasługuje przeciwbakteryjna aktywność klotrimazolu wobec szczepów *Streptococcus mutans* – głównego czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za próchnicę zębów [50].

Opracowana technologia wytwarzania wielowarstwowych filmów z chitozaniem i pektyną pozwoliła na stworzenie trójkompartimentowego nośnika o różnej dystrybucji substancji czynnej w poszczególnych jego warstwach. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność chitozanu w środowisku wodnym, warstwa polikationu posłużyła jako rezerwuar leku odpowiedzialny za jego stopniowe uwalnianie, podczas gdy szybko rozpadająca się warstwa pektyny – jako źródło dawki inicjującej, niezbędnej dla natychmiastowego efektu terapeutycznego. Do sporządzenia filmów wykorzystano dodatek 0,25% (w/w) glicerolu oraz glikolu polietylenowego 400 (PEG 400) – substancji pełniącej funkcję plastyfikatora oraz solubilizatora zwiększającego rozpuszczalność klotrimazolu, a przy tym poprawiającego zdolności kompleksujące oraz aktywność przeciwbakteryjną i antyoksydacyjną chitozanu [51-52]. Kwas mlekowy jako substancja naturalnie występująca w organizmie został wykorzystany do wykonania 1% (w/w) roztworu chitozanu. 2% (w/w) roztwór pektyny sporządzono z użyciem wody. Analiza turbidymetryczna mieszanin polimerów pozwoliła na wytypowanie stosunku wagowego chitozanu do pektyny 1:2 o największej intensywności oddziaływań, niezbędnej do wytworzenia kompleksu stechiometrycznego (*Rycina 2*).



Rycina 2. Schemat przedstawiający zasadę pomiaru turbidymetrycznego wykonanego dla mieszanin polielektrolitów.

Sporządzone filmy cechowały się wysoką jednorodnością pod względem grubości oraz masy, akceptowalną zawartością wilgoci w granicach $4,9 \pm 1,1\%$ – $7,9 \pm 2,0\%$ [53] oraz zawartością klotrimazolu na poziomie ok. 85 – 105%. Pomiar pH płynu imitującego ślinę, sporządzonego na podstawie pracy Marques'a i wsp. [54], wykonane po 4 godzinach od momentu zanurzenia w nim filmów wskazały na znikomy wpływ rozpadającej się, potencjalnie kwaśnej matrycy polimerowej na odczyn śliny.

Badanie szybkości uwalniania klotrimazolu z wielowarstwowej matrycy filmu wykonano w aparacie łopatkowym rekomendowanym przez Farmakopeę Amerykańską [55], z wykorzystaniem zlewki o pojemności 100 ml, wystarczającej dla zapewnienia warunków *sink*. Filmów nie przytwierdzano do łopatki mieszadła, gdyż prędkość 150 obr./min. pozwoliła na ich całkowite zanurzenie i swobodne mieszanie w środowisku płynu akceptorowego. Badanie dostępności farmaceutycznej przeprowadzono z użyciem sztucznej śliny o pH 4,8 i 6,8 (symulacja warunków panujących w jamie ustnej, odpowiednio, po i przed posiłkiem [54]), z dodatkiem Tweenu 80 (0,5%, w/v) dla poprawy rozpuszczalności klotrimazolu. Filmy F1 i F3 wykazały zależny od pH profil uwalniania leku – zakwaszenie płynu akceptorowego wpłynęło na bardziej nasilony rozpad warstwy chitozanowej, a tym samym szybsze uwalnianie substancji czynnej. W przypadku filmów F2, w trakcie 24 – godzinowego badania nie odnotowano uwolnienia 80% dawki leku, niezależnie od zastosowanych warunków pomiarowych. Znacznie wydłużony proces uwalniania klotrimazolu z matrycy F2 mógł wynikać z wysokiego udziału grup aminowych chitozanu w kompleksowaniu grup karboksylowych pektyny, niewrażliwych na obecność jonów

wodorowych. Ponadto zauważono, iż poza charakterem fizykochemicznym polimerów, na ocenę farmaceutyczną nośników mógł wpłynąć charakter substancji aktywnej. Na podstawie analizy potencjału zeta dyspersji klotrimazolu w wodzie i w sztucznej ślinie, zaobserwowano istotną korelację pomiędzy stopniem uprotonowania leku w różnych warunkach pH a intensywnością oddziaływań jonowych polikation – polianion [56-57]. Badanie *ex vivo* właściwości mukoadhezyjnych filmów z użyciem zwierzęcego modelu błony śluzowej policzka wskazało na efekt osłabionej mukoadhezji filmów *placebo* oraz F3, na skutek silnego pęcznienia matrycy polimerowej.

Ze względu na istotność analizy właściwości mechanicznych w charakterystyce farmaceutycznej filmów, wyznaczono parametry pozwalające ocenić ich stopień elastyczności oraz odporność na przyłożoną siłę. Pomimo zróżnicowanej dystrybucji klotrimazolu w strukturze filmów, nie wykazały one istotnych różnic w wartościach analizowanych parametrów mechanicznych. Zaobserwowano jednak znaczne zmniejszenie wartości stopnia wydłużenia przy zerwaniu dla formułacji F2, co uzasadniono znacznym udziałem polikompleksu chitozanowo – pektynowego w strukturze filmu, odpowiedzialnego za jego zwiększoną sztywność i kruchość [58-59].

Ocena właściwości termicznych systemów z klotrimazolem wykonana z udziałem DSC wskazała na prawdopodobny efekt protekcyjny wytwarzającego się polikompleksu na substancję czynną [8,60-61]. Ponadto, zwrócono uwagę na zwiększoną stabilność pektyny w obecności czynnika kompleksującego – chitozanu. Podobnie jak w przypadku hydrożeli, analiza FTIR umożliwiła potwierdzenie jonowego charakteru oddziaływań zastosowanych polielektrolitów. Co więcej, wskazała na zróżnicowane rozmieszczenie klotrimazolu w matrycy polimerowej, na które mogły mieć wpływ nie tylko pierwotna dystrybucja leku w nanoszonych warstwach filmów, ale również zjawisko opadania cząstek klotrimazolu w niecałkowicie zestalonej warstwie bądź ich wtórne przemieszczenie, na skutek wzajemnego przenikania się łańcuchów polimerowych w procesie tworzenia polikompleksu.

W ramach oceny aktywności przeciwgrzybiczej sporządzonych nośników, wykorzystano trzy rodzaje szczepów z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei* oraz *C. parapsilosis*. Pomiary wielkości stref zahamowania wzrostu nie wskazały istotnych różnic w aktywności przeciwgrzybiczej poszczególnych formułacji, niemniej jednak potwierdzono synergistyczny wpływ chitozanu na aktywność przeciwdrobnoustrojową klotrimazolu. Ponadto, filmy *placebo* wykazały podobną intensywność działania wobec

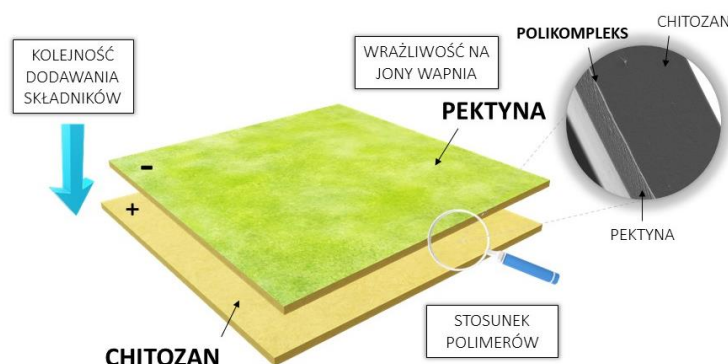
Candida sp. jak dostępny na rynku aptecznym preparat z 1% (w/w) klotrimazolem, wskazując na zachowane, mimo tworzenia polikompleksu, właściwości przeciwgrzybicze chitozanu. Na podstawie czterech niezależnych testów służących ocenie cytotoksyczności filmów, nie stwierdzono istotnego efektu obniżającego przeżywalność fibroblastów skóry ludzkiej.

Zainteresowanie tematyką wielowarstwowych filmów, przede wszystkim w odniesieniu do najczęściej spotykanych trudności w technologii ich sporządzenia, zaowocowało podjęciem próby optymalizacji składu i metody wykonania systemów, z uwzględnieniem takich zmiennych, jak rodzaj pektyny, kolejność dodawania składników czy stosunek wagowy przeciwnie naładowanych polimerów (*Rozdział 12, Publikacja nr 4*). Wybór pektyny na komponentę polianionową wynikał z udowodnionej użyteczności jej połączenia z chitozaniem na etapie tworzenia filmów z klotrimazolem. Podobnie jak w przypadku hydrożeli *placebo*, w celu ograniczenia liczby czynników modulujących oddziaływanie jonowe pomiędzy przeciwnie naładowanymi polimerami, w projektowaniu filmów nie uwzględniono dodatku substancji leczniczej. W ramach oceny możliwości tworzenia polikompleksów przez chitozan o różnych parametrach fizykochemicznych, na tym etapie badań wykorzystano chitozan o średniej masie cząsteczkowej (stopień deacetylacji: 77,6 – 82,5%, lepkość: 31 – 70 mPa·s dla 1% roztworu w 1% kwasie octowym, masa cząsteczkowa: 80 – 200 kDa). Spośród dostępnych na rynku rodzajów pektyny nisko metoksylowanej, zdecydowano o wyborze dwóch typów polimeru o zróżnicowanej wrażliwości na obecność jonów wapniowych: słabo wrażliwej pektyny CF010 (stopień metoksylicacji: 34%, stopień amidacji: 17%, pH 4,2 dla 2,5% roztworu w wodzie destylowanej o temperaturze 20 °C) oraz wysoce wrażliwej pektyny CF020 (stopień metoksylicacji: 31%, stopień amidacji: 19%, pH 4,1 dla 2,5% roztworu w wodzie destylowanej o temperaturze 20 °C). Technologia otrzymywania filmów nie odbiegała od metody opracowanej dla filmów z klotrimazolem (*Rycina 3*). W celu zróżnicowania stosunku chitozanu do pektyny (10:1, 1:1 i 1:10), wykorzystano głównie 0,2% oraz 2% (w/w) roztwory polielektrolitów z dodatkiem 0,5% (w/w) glicerolu jako plastyfikatora, ułatwiającego penetrację łańcuchów polimerowych. Do wykonania dyspersji chitozanowych użyto 1% (w/w) kwas mlekowy. W nawiązaniu do danych literaturowych, w ocenie filmów uwzględniono także wpływ kolejności nanoszenia składników na właściwości produktu. Aby wyeliminować potencjalne rozbieżności wynikające z różnej sumarycznej zawartości polimerów, sporządzono także cztery

dotatkowe formułacje o stosunku wagowym polielektrolitów 1:1, z wykorzystaniem 1,1% (w/w) roztworów (Rozdział 3, Tabela 3).

Optymalizacji filmów dokonano na podstawie oceny następujących parametrów:

- właściwości mechanicznych,
- struktury wewnętrznej zobrazowanej dzięki technice SEM,
- zdolności pęcznienia,
- właściwości termicznych z użyciem techniki DSC oraz analizy termogravimetrycznej (ang. *thermogravimetric analysis*, TGA) (Mettler Toledo Star TGA/DSC unit, Columbus, OH, USA),
- stopnia zmętnienia mieszanin polimerów odpowiadających składowi i technice sporządzania filmów z jednoczesną analizą pH oraz potencjału zeta (Zetasizer NanoZS90, Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania),
- charakteru oddziaływań pomiędzy chitozaniem a pektyną za pomocą FTIR.



Rycina 3. Technologia filmów wielowarstwowych bazująca na technice ewaporacji rozpuszczalnika, z uwzględnieniem parametrów podlegających optymalizacji.

Ocena wizualna oraz analiza właściwości mechanicznych okazały się kluczowe we wstępnej weryfikacji przydatności sporządzonych filmów jako nośników dla leków do podania na błonę śluzową jamy ustnej. Zarówno technika sporządzania, jak i skład jakościowy wpłynęły na jednorodność uzyskanych filmów. Formułacje o stechiometrycznym stosunku wagowym polimerów cechowały się sztywniejszą, bardziej odporną na zniekształcenie strukturą w porównaniu do elastycznych filmów z większą zawartością chitozanu. Podczas, gdy filmy F9 – F12 o stosunku chitozanu do pektyny 10:1 były homogenne w ocenie wizualnej niezależnie od zastosowanej techniki sporządzania, ocena właściwości mechanicznych wskazała na istotne różnice

w ich odporności mechanicznej. Naniesienie warstwy chitozanu w pierwszej kolejności zaowocowało otrzymaniem twardszych i bardziej kruchych filmów. Formułacje F5 – F8, złożone głównie z pektyny, charakteryzowały się natomiast niską jednorodnością – na ich powierzchni obecne były liczne zgrubienia, bruzdy oraz pęcherze powietrza.

Dzięki analizie SEM potwierdzono wielowarstwową strukturę filmów, złożonych z ciasno upakowanej warstwy chitozanu oraz widocznie luźniejszej, rozwarstwiającej się warstwy pektyny. Obszar oddziałujących jonowo łańcuchów polimerowych na granicy stykających się polielektrolitów uwidocznił się w postaci cienkiej, jaśniejszej warstwy, jednakże powyższe obserwacje dotyczyły tylko wybranych formułacji. Kolejność dodawania składników wyraźnie wpłynęła na strukturę wewnętrzną otrzymanych nośników. W przypadku filmów F9 – F10, naniesienie roztworu pektyny na wstępnie zestaloną warstwę chitozanu zaowocowało intensywnym przenikaniem się łańcuchów polimerowych i uzyskaniem jednolitego przekroju poprzecznego w obrazie SEM.

Zjawisko kompleksowania pektyny przez chitozan wyraźnie ograniczyło jej zdolność pęcznienia w sztucznej ślinie. Analiza pęcznienia filmów przeprowadzona w środowisku wodnym nie potwierdziła powyższych obserwacji, wskazując tym samym na istotny wpływ oddziaływań jonowych pomiędzy pektyną a jonami wapnia (obecnymi w ślinie) w procesie tworzenia polikompleksu. Wykorzystanie pektyny CF020, cechującej się wyższą wrażliwością na obecność kationów dwuwartościowych umożliwiło otrzymanie systemów silnie żelujących w środowisku śliny, a przez to ograniczających napływ medium po etapie ich wstępnego spęcznienia.

W odniesieniu do charakterystyki prostych mieszanin fizycznych chitozanu i pektyny, wytwarzające się wiązania jonowe doprowadziły do powstania produktu o nowych właściwościach termicznych. Ponadto, po raz kolejny potwierdzono korzystny efekt powstającego polikompleksu na stabilność tworzących go polielektrolitów.

Rozdział 5

Wnioski

- Hydrożel sporządzony z wykorzystaniem chitozanu, gumy tragakanty oraz gumy ksantanowej w proporcji, odpowiednio, 1:10:1 charakteryzował się najkorzystniejszymi właściwościami farmaceutycznymi. Dodatek gumy ksantanowej zwiększył odporność mechaniczną oraz poprawił właściwości mukoadhezyjne hydrożeli.
- Technika stopniowej ewaporacji rozpuszczalnika może być wykorzystywana jako prosta i tania metoda otrzymywania filmów o strukturze wielowarstwowej.
- Wielowarstwowa struktura filmów wynikająca z udziału polielektrolitów o różnych właściwościach fizykochemicznych oraz obecności warstwy wolno rozpadającego się polikompleksu zapewniła dwufazowy, zależny od pH proces dostarczania klotrimazolu – szybkie uwolnienie dawki „inicjującej” niezbędnej do wysycenia miejsca podania, z następczym przedłużonym uwalnianiem leku w celu podtrzymania działania przeciwrzybiczego. Chitozan nasilił aktywność przeciwdrożdżakową klotrimazolu.
- Kolejność nanoszenia warstw, stosunek wagowy polimerów oraz rodzaj użytej pektyny wpłynęły na jakość optymalizowanych filmów *placebo*. Filmy o stechiometrycznym stosunku chitozanu i pektyny charakteryzowały się najwyższą odpornością mechaniczną. Wyniki analizy pęcznienia wskazały na szczególną użyteczność pektyny nisko metoksylowanej CF020 w otrzymywaniu stabilnych, stopniowo rozpadających się w kontakcie ze śliną nośników. Stosunek wagowy polimerów okazał się czynnikiem warunkującym warstwową strukturę filmów. Filmy o największej zawartości chitozanu charakteryzowały się jednolitym przekrojem poprzecznym w obrazie SEM, pomimo zastosowanej techniki naprzemiennego nanoszenia warstw polimerów. Odpowiednia kolejność dodawania składników była istotna dla zapewnienia właściwej elastyczności filmów.

Rozdział 6

Piśmiennictwo

1. Montenegro – Nicolini, M.; Morales, J.O. Overview and future potential of buccal mucoadhesive films as drug delivery systems for biologics. *AAPS PharmSciTech*. 2017, 18 (1), 3–14.
2. Sudhakar, Y.; Kuotsu, K.; Bandyopadhyay, A.K. Buccal bioadhesive drug delivery – a promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Release* 2006, 114 (1), 15–40.
3. Fonseca – Santos, B.; Chorilli, M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: state of art, design of formulations and their *in vivo* performance evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018, 86, 129–143.
4. Rajaram, D.M.; Laxman, S.D. Buccal mucoadhesive films: a review. *Sys. Rev. Pharm.* 2017, 8, 31–38.
5. Barua, S.; Kim, H.; Jo, K.; Seo, C.W.; Park, T.J.; Lee, K.B.; Yun, G.; Oh, K.; Lee, J. Drug delivery techniques for buccal route: formulation strategies and recent advances in dosage form design. *J.Pharm. Investig.* 2016, 46, 593–613.
6. Baus, R.A.; Zahir – Jouzdani, F.; Dünnhaupt, S.; Atyabi, F.; Bernkop – Schnürch, A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: *in vitro* – *in vivo* correlation study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019, 142, 498–505.
7. Shipp, L.; Liu, F.; Kerai – Varsani, L.; Okwuosa, T.C. Buccal films: a review of therapeutic opportunities, formulations and relevant evaluation approaches. *J. Control. Release* 2022, 352, 1071–1092.
8. Tejada, G.; Lamas, M.C.; Svetaz, L.; Salomón, C.J.; Alvarez, V.A.; Leonardi, D. Effect of drug incorporation technique and polymer combination on the performance of biopolymeric antifungal buccal films. *Int. J. Pharm.* 2018, 548 (1), 431–442.
9. Pilicheva, B.; Uzunova, Y.; Marudova, M. Polyelectrolyte multilayer films as a potential buccal platform for drug delivery. *Polymers* 2022, 14, 734.
10. Patel, A.; Shah, D.; Desai, T.R.; Noolvi, M.N. Mucoadhesive buccal films based on chitosan and carboxymethylated *Feronia limonia* fruit pulp mucilage interpolymer complex for delivery of opioid analgesics. *Asian J. Pharm.* 2016, 10 (2), 137–143.

11. Meka, V.S.; Sing, M.K.G.; Pichika, M.R.; Nali, S.R.; Kolapall, V.R.M.; Kesharwani, P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov. Today* 2017, 22, 1697–1706.
12. Knidri, H.E.; Belaabed, R.; Addaou, A.; Laajeb, A.; Lahsini, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 120 (Part A), 1181–1189.
13. Qin, Y.; Li, P.; Guo, Z. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: a review of structural optimization and applications. *Carbohydr Polym.* 2020, 236, 116002.
14. Dhawan, S.; Singla, A.K.; Sinha, V.R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech.* 2004, 5, 122–128.
15. Hosseinejad, M.; Jafari, S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 85, 467–475.
16. Palmeira – de – Oliveira, A.; Ribeiro, M.P.; Palmeira – de – Oliveira, R.; Gaspar C.; Costa – de – Oliveira, S.; Correia, I.J.; Pina, V.; Martinez – de – Oliveira, J.; Queiroz, J.A.; Rodrigues, A.G. Anti – *Candida* activity of a chitosan hydrogel: mechanism of action and cytotoxicity profile. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010, 70, 322–327.
17. Kim, I.Y.; Seo, S.J.; Moon, H.S.; Yoo, M.K.; Park, I.Y.; Kim, B.C.; Cho, C.S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* 2008, 26 (1), 1–21.
18. Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of chitosan – a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar. Drugs* 2015, 13 (4), 1819–1846.
19. Lalwani, M.S.; Eneh, C.I.; Lutkenhaus, J.L. Emerging trends in the dynamics of polyelectrolyte complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020, 22 (42), 24157 – 24177.
20. Chen, S.; Wang, Z.G. Driving force and pathway in polyelectrolyte complex coacervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2022, 119 (36), e2209975119.
21. Wu, D.; Zhu, L.; Li, Y.; Zhang, X.; Xu, S.; Yang, G.; Delair, T. Chitosan – based colloidal polyelectrolyte complexes for drug delivery: a review. *Carbohydr. Polym.* 2020, 238, 116126.

22. Zare, E.N.; Makvandi, P.; Tay, F.R. Recent progress in the industrial and biomedical applications of tragacanth gum: a review. *Carbohydr. Polym.* 2019, 212, 450–467.
23. Kibbe, A.H. *Handbook of Pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, Washington, USA, 2000.
24. Nazemi, Z.; Sahraro, M.; Janmohammadi, M.; Nourbakhsh, M.S.; Savoji, H. A review on tragacanth gum: a promising natural polysaccharide in drug delivery and cell therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023, 124343.
25. Jansson, P.E.; Kenne, L.; Lindberg, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* 1975, 45, 275–282.
26. Le, X.T.; Turgeon, S.L. Rheological and structural study of electrostatic cross – linked xanthan gum hydrogels induced by lactoglobulin. *Soft Matter* 2013, 9, 3063–3073.
27. Jadav, M.; Pooja, D.; Adams, D.J.; Kulhari, H. Advances in xanthan gum – based systems for the delivery of therapeutic agents. *Pharmaceutics* 2023, 15, 402.
28. Malik, N.S.; Ahmad, M.; Minhas, M.U.; Tulain, R.; Barkat, K.; Khalid, I.; Khalid, Q. Chitosan/xanthan gum based hydrogels as potential carrier for an antiviral drug: fabrication, characterization, and safety evaluation. *Front. Chem.* 2020, 8, 50.
29. Sharma, B.R.; Naresh, L.; Dhuldhoya, N.C.; Merchant, S.U. An overview on pectins. *Times Food Process. J.* 2006, 44 – 51.
30. Özkahraman, B.; Özbaş, Z.; Yaşayan, G.; Akgüner, Z.P.; Yarımcan, F.; Alarçin, E.; Bal – Öztürk, A. Development of mucoadhesive modified kappa – carrageenan/pectin patches for controlled delivery of drug in the buccal cavity. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2022, 110 (4), 787–798.
31. Abruzzo, A.; Crispini, A.; Prata, C.; Adduci, R.; Nicoletta, F.P.; Dalena, F.; Cerchiara, T.; Luppi, B.; Bigucci, F. Freeze – dried matrices for buccal administration of propranolol in children: physico – chemical and functional characterization. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110 (4), 1676–1686.
32. *Farmakopea Polska XII*. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2022.
33. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan – based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62 (1), 83–99.
34. Ye, S.; Wei, B.; Zeng, L. Advances on hydrogels for oral science research. *Gels* 2022, 8, 302.

35. Alves, T.F.R.; Rios, A.C.; da Silva Pontes, K.; Portella, D.L.; Aranha, N.; Severino, P.; Souto, E.B.; Gonsalves, J.K.M.; de Souza Nunes, R.; Chaud, M.V. Bilayer mucoadhesive buccal film for mucosal ulcers treatment: development, characterization, and single study case. *Pharmaceutics* 2020, 12, 657.
36. Gajdošová, M.; Vetchý, D.; Muselík, J.; Gajdziok, J.; Juřica, J.; Vetchá, M.; Hauptman, K.; Jekl, V. Bilayer mucoadhesive buccal films with prolonged release of ciclopirox olamine for the treatment of oral candidiasis: *in vitro* development, *ex vivo* permeation testing, pharmacokinetic and efficacy study in rabbits. *Int. J. Pharm.* 2021, 592, 120086.
37. Das, B.P.; Tsianou, M. From polyelectrolyte complexes to polyelectrolyte multilayers: electrostatic assembly, nanostructure, dynamics, and functional properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017, 244, 71–89.
38. Nolte, A.; Hossfeld, S.; Schroepel, B.; Mueller, A.; Stoll, D.; Walker, T.; Wendel, H.P.; Krastev, R. Impact of polyelectrolytes and their corresponding multilayers to human primary endothelial cells. *J. Biomater. Appl.* 2013, 28 (1), 84–99.
39. Zhao, S.; Caruso, F.; Dähne, L.; Decher, G.; De Geest, B.G.; Fan, J.; Feliu, N.; Gogotsi, Y.; Hammond, P.T.; Hersam, M.C.; et al. The future of layer – by – layer assembly: a tribute to ACS nano associate editor Helmuth Möhwald. *ACS Nano* 2019, 13, 6151–6169.
40. Li, M.; Lv, J.; Yang, Y.; Cheng, G.; Guo, S.; Liu, C.; Ding, Y. Advances of hydrogel therapy in periodontal regeneration – a materials perspective review. *Gels* 2022, 8, 624.
41. Tejada, G.; Barrera, M.G.; Piccirilli, G.N.; Sortino, M.; Frattini, A.; Salomon, C.J.; Lamas, M.C.; Leonardi, D. Development and evaluation of buccal films based on chitosan for the potential treatment of oral candidiasis. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2017, 18 (4), 936–946.
42. Kassem, A.A.; Ismail, F.A.; Naggar, V.F.; Aboumagd, E. Preparation and evaluation of periodontal films based on polyelectrolyte complex formation. *Pharm. Dev. Technol.* 2014, 20 (3), 1–9.
43. Patel, A.; Shah, D.; Desai, T.R.; Noolvi, M.N. Mucoadhesive buccal films based on chitosan and carboxymethylated *Feronia limonia* fruit pulp mucilage interpolymer complex for delivery of opioid analgesics. *Asian J. Pharm.* 2016, 10 (2), 137–143.

44. Grimling, B.; Karolewicz, B.; Nawrot, U.; Włodarczyk, K.; Górniak, A. Physicochemical and antifungal properties of clotrimazole in combination with high molecular weight chitosan as a multifunctional excipient. *Mar. Drugs* 2020, 18, 591.
45. Potaś, J.; Winnicka, K. The potential of polyelectrolyte multilayer films as drug delivery materials. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3496.
46. Balata, G.; Mahdi, M.; Bakera, R.A. Improvement of solubility and dissolution properties of clotrimazole by solid dispersions and inclusion complexes. *Indian J. Pharm. Sci.* 2011, 73 (5), 517–526.
47. *Drugbank.ca*. Dostępne online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00257> (19.04.2023 r.).
48. Millsop, J.W.; Fazel, N. Oral candidiasis. *Clin. Dermatol.* 2016, 34 (4), 487–494.
49. Quindós, G.; Gil – Alonso, S.; Marcos – Arias, C.; Sevillano, E.; Mateo, E.; Jauregizar, N.; Eraso, E. Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Buccal* 2019, 24 (2), e172–e180.
50. Qiu, W.; Ren, B.; Dai, H.; Zhang, L.; Zhang, Q.; Zhou, X.; Li, Y. Clotrimazole and econazole inhibit *Streptococcus mutans* biofilm and virulence *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 2017, 73, 113–120.
51. Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Reis, R.L.; Mano, J.F. Graft copolymerized chitosan – present status and application. *Carbohydr. Polym.* 2005, 62, 142–158.
52. Domján, A.; Bajdik, J.; Pintye – Hódi, K. Understanding of the plasticizing effects of glycerol and PEG 400 on chitosan films using solid – state NMR spectroscopy. *Macromolecules* 2009, 42 (13), 4667–4673.
53. Norcino, L.B.; de Oliveira, J.E.; Moreira, F.K.V.; Marconcini, J.M.; Mattoso, L.H.C. Rheological and thermos – mechanical evaluation of bio – based chitosan/pectin blends with tunable ionic cross – linking. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 118 Part B, 1817–1823.
54. Marques, M.R.C.; Löbenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Tech.* 2011, 18 (3), 15–28.
55. *United States Pharmacopoeia and National Formulary* (USP 41 – NF 36). United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2016.
56. Peschka, M.; Roberts, P.H.; Knepper, T.P. Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 959–968.

57. Abruzzo, A.; Bigucci, F.; Cerchiara, T.; Cruciani, F.; Vitali, B.; Luppi, B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* 2012, 87, 581–588.
58. Pires, A.L.R.; de Azevedo Motta, L.; Dias, A.M.A.; de Sousa, H.C.; Moraes, A.M.; Braga, M.E.M. Towards wound dressings with improved properties: effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan – alginate films loaded with thymol and beta – carotene. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 93, 595–605.
59. Tejada, G.; Piccirilli, G.N.; Sortino, M.; Salomón, C.J.; Lamas, M.C.; Leonardi, D. Formulation and *in vitro* efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 79, 140–150.
60. Darwesh, B.; Aldawsari, H.M.; Badr – Eldin, S.M. Optimized chitosan/anion polyelectrolyte complex based inserts for vaginal delivery of fluconazole: *in vitro/in vivo* evaluation. *Pharmaceutics* 2018, 10, 227.
61. Sonje, A.G.; Mahajan, H.S. Nasal inserts containing ondansetron hydrochloride based on chitosan – gellan gum polyelectrolyte complex: *in vitro – in vivo* studies. *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 64, 329–335.

Rozdział 7

Streszczenie w języku polskim

Kompleksy polielektrolitowe (ang. *polyelectrolyte complexes*, PECs) stanowią jonowe połączenia przeciwnie naładowanych związków wielkocząsteczkowych, najczęściej polimerów, o wyjątkowej charakterystyce fizykochemicznej wynikającej z połączenia substancji o zróżnicowanych właściwościach. W ciągu ostatnich lat powstało wiele prac poświęconych badaniom nad nośnikami leków na bazie PECs, z czego największy udział stanowią doniesienia o wykorzystaniu chitozanu w technologii tych form. PECs są strukturami wrażliwymi na zmiany czynników zewnętrznych – pH, temperatury, siły jonowej – szczególnie na etapie ich otrzymywania. Istotny wpływ na właściwości PECs mają również parametry fizykochemiczne tworzących je polimerów, takie jak masa cząsteczkowa, gęstość ładunku, rozpuszczalność czy rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika. Optymalizacja wymienionych parametrów stanowi zatem kluczowy element procesu wytwarzania materiałów na bazie PECs.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była wielokierunkowa ocena hydrożeli oraz filmów farmaceutycznych otrzymanych z wykorzystaniem chitozanu o zróżnicowanej masie cząsteczkowej i polisacharydów pochodzenia naturalnego – tragakanty, gumy ksantanowej oraz pektyny – jako potencjalnych nośników dla leków przeznaczonych na błonę śluzową jamy ustnej. Największym wyzwaniem w projektowaniu form dopoliczkowych czy dodziąsłowych jest zapewnienie odpowiednio długiego czasu przebywania substancji czynnej w miejscu aplikacji, ze względu na właściwości erozyjne stale produkowanej w jamie ustnej śliny.

Badania nad hydrożelami złożonymi z chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej oraz gumy tragakanty wskazały na użyteczność gumy ksantanowej w poprawie właściwości mukoadhezyjnych oraz odporności mechanicznej preparatów. Spośród sporządzonych kombinacji, hydrożel o stosunku wagowym chitozanu do tragakanty i gumy ksantanowej 1:10:1 charakteryzował się najwyższym potencjałem aplikacyjnym. Formulacja o najwyższej zawartości polikationu została natomiast wyeliminowana z dalszej oceny farmaceutycznej, ze względu na znaczny spadek lepkości układu po dodaniu mało lepkiego roztworu chitozanu i widoczny rozdział faz.

Technika stopniowej ewaporacji rozpuszczalnika umożliwiła uzyskanie wielowarstwowych filmów złożonych z chitozanu oraz pektyny jako nośników dla

klotrimazolu – pochodnej imidazolowej o szerokim spektrum aktywności przeciwgrzybiczej, stosowanej w terapii nawracających i trudnych w leczeniu zakażeń błony śluzowej jamy ustnej. Złożona struktura filmów zapewniła dwufazowy proces dostarczania leku – szybkie uwolnienie dawki „inicjującej” niezbędnej do wysycenia zainfekowanego miejsca, z następczym przedłużonym uwalnianiem leku w celu podtrzymania działania przeciwgrzybiczego. Analogicznie jak w przypadku hydrożeli, na podstawie wyników analizy termicznej oraz FTIR potwierdzono obecność wiązań jonowych pomiędzy przeciwnie naładowanymi polimerami. Przydatne w zobrazowaniu procesu tworzenia polielektrolitowych połączeń okazały się również pomiary turbidymetryczne przeprowadzone z równoczesną analizą pH oraz potencjału zeta mieszanin polimerów.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę optymalizacji składu oraz techniki sporządzania wielowarstwowych filmów *placebo*, złożonych z chitozanu o średniej masie cząsteczkowej oraz nisko metoksyloowanej pektyny, z uwzględnieniem zmiennych takich, jak stosunek wagowy polimerów, wrażliwość pektyny na jony wapnia oraz kolejność dodawania składników. Filmy o stechiometrycznym stosunku chitozanu i pektyny charakteryzowały się najwyższą odpornością mechaniczną oraz stabilnością w kontakcie ze sztuczną śliną. Ponadto, stosunek wagowy polimerów okazał się czynnikiem warunkującym warstwową strukturę filmów. Formulacje o największej zawartości chitozanu charakteryzowały się jednolitym przekrojem poprzecznym w obrazie SEM, pomimo zastosowanej techniki naprzemiennego nanoszenia warstw polimerów.

Przeprowadzona ocena farmaceutyczna sporządzonych układów hydrożelowych i filmów wielowarstwowych wskazała na przydatność tych materiałów w projektowaniu nośników leków na błonę śluzową jamy ustnej. Uzyskane wyniki badań pozwoliły ponadto na lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie PECs, co może być podstawą ich szerszego wykorzystania nie tylko w technologii farmaceutycznej, ale i w innych dziedzinach nauki, np. technologii chemicznej czy inżynierii tkankowej.

Rozdział 8

Streszczenie w języku angielskim

Polyelectrolyte complexes (PECs) are structures consisted of ionically interacting macromolecules of opposite charges, especially polymers, with unique physicochemical characteristics resulting from combining substances characterized by various properties. Over the last few years, many scientific works devoted to studies on the drug carriers based on PECs were created, most of which are reports about the utility of chitosan in the technology of PECs. PECs are sensitive to changes of the external factors – pH, temperature, ionic strength – particularly at the stage of their preparation. Physicochemical parameters of the polycomplexes' compounds, such as molecular weight, charge density, solubility or type of the utilized solvent, have also significant impact on the PECs characteristics. Therefore, optimization of the mentioned parameters is a key part of the PECs – based materials manufacturing process.

The aim of this doctoral dissertation was the multidirectional evaluation of hydrogels and pharmaceutical films obtained with using chitosan with different molecular mass and polysaccharides of natural origin – tragacanth, xanthan gum and pectin – as potential drug carriers on the buccal mucosa. Due to the eroding capacity of the continuously producing saliva, the biggest challenge in designing buccal or intra – pocket drug dosage forms is to provide sufficiently long retention time of an active substance in the oral cavity.

The studies on the hydrogels composed of chitosan with low molecular weight and tragacanth gum pointed out the utility of xanthan gum in the mucoadhesive properties and mechanical strength improvement. Among the prepared compositions, the hydrogel with the weight ratio of chitosan to tragacanth and xanthan gum 1:10:1 was characterized by the highest application potential. The formulation with the highest content of the polycation was in turn eliminated from the further pharmaceutical assessment, because of the significant viscosity decrease after adding chitosan and the visible phase separation.

The solvent evaporation technique enabled to obtain the multilayer films composed of chitosan and pectin as drug carriers for clotrimazole – an imidazole derivative with a broad spectrum of an antifungal activity, being utilized in the therapy of recurrent and difficult to treat infections of the buccal mucosa. The complex structure of the films ensured the biphasic drug delivery process – fast release of an initial dose

being necessary for saturating the affected area with subsequent prolonged drug delivery for maintaining the antifungal effect. Analogically as for the hydrogels, the presence of the ionic interactions between the oppositely charged polymers was confirmed pursuant on the outcomes of the thermal and FTIR analyses. Turbidimetric measurements being performed with simultaneous pH and zeta potential analyses of the polymer mixtures were also helpful in illustrating the process of PECs formation.

In the next step of the research, an attempt was made to optimize composition and preparation technique of the multilayer *placebo* films, consisting of medium molecular weight chitosan and low methoxy amidated pectin with regard to variables, such as the polymer weight ratio, the sensitivity of pectin to calcium ions and the order of adding ingredients. Films with the stoichiometric ratio of chitosan to pectin were characterized with the highest mechanical resistance and stability upon contact with the simulated saliva. Furthermore, the polymer weight ratio turned out to be the factor determining the multilayer structure of the films. Formulations with the highest chitosan concentration were uniform in a cross – section according to the SEM imaging, despite the applied technique of alternately depositing polymer layers.

The pharmaceutical evaluation of the hydrogel systems and multilayer films indicated the applicability of the utilized polyelectrolyte combinations in administration of drugs on the buccal mucosa. The obtained results also enabled better recognition of the mechanisms underlying the PECs formation process, what can be helpful in their wider utilization not only in the pharmaceutical technology, but also in other scientific areas, e.g. chemical technology or tissue engineering.

Rozdział 9

Publikacja nr 1

Potaś, J.; Szymańska, E.; Winnicka, K. Challenges in developing of chitosan – based polyelectrolyte complexes as a platform for mucosal and skin drug delivery. *European Polymer Journal*, 2020, 140, 110020, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110020> (4,598 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).

Rozdział 10

Publikacja nr 2

Potaś, J.; Szymańska, E.; Basa, A.; Hafner, A.; Winnicka, K. Tragacanth gum/chitosan polyelectrolyte complexes – based hydrogels enriched with xanthan gum as promising materials for buccal application. *Materials*, 2021, 14, 86, <https://doi.org/10.3390/ma14010086> (3,748 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).

Rozdział 11

Publikacja nr 3

Potaś, J.; Szymańska, E.; Wróblewska, M.; Kurowska, I.; Maciejczyk, M.; Basa, A.; Wolska, E.; Wilczewska, A.Z.; Winnicka, K. Multilayer films based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes as novel platforms for buccal administration of clotrimazole. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1588, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101588> (6,525 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).

Rozdział 12

Publikacja nr 4

Potaś, J.; Wilczewska, A.Z.; Misiak, P.; Basa, A.; Winnicka, K. Optimization of multilayer films composed of chitosan and low – methoxy amidated pectin as multifunctional biomaterials for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 8092, <https://doi.org/10.3390/ijms23158092> (6,208 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).

Rozdział 13

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Rozdział 14

Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej

Rozdział 15

Dorobek naukowy

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Prace oryginalne

1. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Basa, A.; Hafner, A.; Winnicka, K. Tragacanth gum/chitosan polyelectrolyte complexes – based hydrogels enriched with xanthan gum as promising materials for buccal application. *Materials*, 2021, 14, 86, <https://doi.org/10.3390/ma14010086> (3,748 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).
2. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Wróblewska, M.; Kurowska, I.; Maciejczyk, M.; Basa, A.; Wolska, E.; Wilczewska, A.Z.; Winnicka, K. Multilayer films based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes as novel platforms for buccal administration of clotrimazole. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1588, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101588> (6,525 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).
3. **Potaś, J.**; Wilczewska, A.Z.; Misiak, P.; Basa, A.; Winnicka, K. Optimization of multilayer films composed of chitosan and low – methoxy amidated pectin as multifunctional biomaterials for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 8092, <https://doi.org/10.3390/ijms23158092> (6,208 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).

Prace przeglądowe

1. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Winnicka, K. Challenges in developing of chitosan – based polyelectrolyte complexes as a platform for mucosal and skin drug delivery. *European Polymer Journal*, 2020, 140, 110020, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110020> (4,598 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).

Łączna punktacja za publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Impact factor (IF): 21,079 pkt., punktacja MEiN: 480 pkt.

Wykaz innych publikacji naukowych

1. **Potaś, J.**; Winnicka, K. The potential of polyelectrolyte multilayer films as drug delivery materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 3496, <https://doi.org/10.3390/ijms23073496> (6,208 pkt. IF, 140 pkt. MEiN).
2. Niżić, L.; **Potaś, J.**; Winnicka, K.; Szekalska, M.; Erak, I.; Gretić, M.; Jug, M.; Hafner, A. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin – loaded pectin/hypromellose microspheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 141, 105115, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105115> (4,384 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).
3. Szymańska, E.; Woś – Latosi, K.; Jacyna, J.; Dąbrowska, M.; **Potaś, J.**; Markuszewski, M.J.; Winnicka, K. The correlation between physical crosslinking and water – soluble drug release from chitosan – based microparticles. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 455, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050455> (6,525 pkt. IF, 100 pkt. MEiN).

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

Impact factor (IF): 37,992 pkt., punktacja MEiN: 820 pkt.

Streszczenia konferencyjne: 6

Wykaz doniesień zjazdowych

1. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Winnicka, K. Ocena trwałości maści emulsyjnych z mocznikiem w stężeniu 30% i 40%. *XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja w Polsce perspektywy nauki i zawodu”*. Kraków, 19 – 22 IX 2017.
2. **Potaś, J.**; Dąbrowska, M., Szymańska, E.; Winnicka, K. The relation between physical crosslinking and water – soluble drug release from chitosan – based microparticles. *14th Białystok International Medical Congress for Young Scientists*. Białystok, Polska, 17 – 18 V 2019.
3. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Kurowska, I.; Wilczewska, A.Z.; Basa, A.; Winnicka, K. Preliminary assessment of chitosan/pectin buccal films with clotrimazole. *XXVI Conference of Polish Chitin Society „New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives”*, online, 23 – 24 IX 2021.
4. **Potaś, J.**; Szymańska, E.; Wróblewska, M.; Winnicka, K. Preparation and pharmaceutical evaluation of multilayer films with chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for buccal administration of clotrimazole. *13th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology „Contemporary pharmaceutical technology – addressing challenges of innovative and generic medicinal products”*. Gdańsk, Polska, 16 – 18 IX 2021.
5. **Potaś, J.**; Wilczewska, A.Z.; Misiak, P.; Basa, A.; Winnicka, K. Optimization of multilayer films composed of chitosan and low methoxy amidated pectin as materials for buccal drug delivery. *XXVII Conference of Polish Chitin Society „New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives”*. Poznań, 21 – 23 IX 2022.
6. **Potaś, J.**; Winnicka, K. The effect of polyelectrolyte complexes formation on the swelling performance of chitosan/low methoxy amidated pectin – based multilayer films. *International conference „Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2022”*. Kowno, Litwa, 21 X 2022.

Wykaz innych aktywności naukowych

1. Nagrody naukowe:

- 1. miejsce w kategorii *Pharmacy* podczas 14th *Bialystok International Medical Congress for Young Scientists*. Białystok, Polska, 17 – 18 V 2019, za prezentację ustną pt. *“The relation between physical crosslinking and water – soluble drug release from chitosan – based microparticles”*,
- nagroda główna w konkursie *Technotalent 2019* w kategoriach *Technika* oraz *Technotalent Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku* za projekt pt. *„Inteligentny system dostarczania leku do terapii fotodynamicznej stanów przednowotworowych błony śluzowej jamy ustnej”*,
- nagrody naukowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku II stopnia za osiągnięcia naukowe w latach 2020 – 2021,
- wyróżnienie w konkursie na najlepszy plakat *XXVI Konferencji Polskiego Towarzystwa Chitynowego „New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives”*, online, 23 – 24 IX 2021 za pracę pt. *„Preliminary assessment of chitosan/pectin buccal films with clotrimazole”*,
- nagroda główna za najlepszą prezentację ustną wygłoszoną podczas *XXVII Konferencji Polskiego Towarzystwa Chitynowego „New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives”*. Poznań, 21 – 23 IX 2022, pt. *„Optimization of multilayer films composed of chitosan and low methoxy amidated pectin as materials for buccal drug delivery”*,
- nagroda główna za najlepszą prezentację posterową pt. *„The effect of polyelectrolyte complexes formation on the swelling performance of chitosan/low methoxy amidated pectin – based multilayer films”*, wygłoszoną podczas międzynarodowej konferencji *Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2022*. Kowno, Litwa, 21 X 2022.

2. 3 – miesięczny staż zagraniczny (9 IV – 9 VII 2018) w *Department of Pharmaceutical Technology, University of Zagreb* w ramach projektu

„Wysokiej jakości programy stażowe na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB”.

3. Kierownik projektów naukowych realizowanych z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku:
 - SUB/2/DN/22/002/2215 pt. *„Optymalizacja sporządzania wielowarstwowych filmów na bazie chitozanowych kompleksów polielektrolitowych jako nośników modelowych substancji przeciwdrobnoustrojowych na błonę śluzową jamy ustnej”* (2022 r.),
 - B.SUB.23.402 pt. *„Ocena farmaceutyczna hydrożeli na bazie kompleksów polielektrolitowych z seknidazolem do podania do kieszonki dziąsłowej”* (2023 r.).
4. Wykonawca zadań badawczych projektu finansowanego przez *Inkubator Innowacyjności 4.0* pt. *„Ocena profilu bezpieczeństwa oraz przenikania kwasu delta – aminolewulinowego z innowacyjnej kompozycji farmaceutycznej na błonę śluzową jamy ustnej”* realizowanego w ramach *Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014 – 2020* (2021 – 2022 r.).
5. Współautor zgłoszenia patentowego pt. *„Kompozycja o właściwościach mukoadhezyjnych oraz jej zastosowanie”* (nr: P.443813) (2023 r.).
6. Autor wniosku o finansowanie projektu badawczego w ramach konkursu Narodowego Centrum Nauki *Preludium – 20* pt. *„Wielowarstwowe filmy na bazie polielektrolitowych kompleksów z chitozanem jako innowacyjne nośniki dla modelowej substancji przeciwgrzybiczej”* (nr: 519703).
7. Udział w prowadzeniu zajęć dla licealistów w ramach akcji *Studiuj w UMB* (2023 r.).
8. Udział w prowadzeniu zajęć dla dzieci w trakcie *Podlaskiego Festiwalu Nauki* (2022 r.).
9. Prowadzenie szkolenia pt. *„Cukrzyca – rola farmaceuty w opiece nad pacjentem”* organizowanego przez *Polskie Towarzystwo Studentów Farmacji* (2019 r.).
10. Udział w opracowaniu i przygotowaniu filmu edukacyjnego pt. *„Tabletka tabletkie nierówna, czyli o nowoczesnych postaciach leku”* w ramach projektu *„Teraz już wiem – cykl filmów edukacyjnych”* (2023 r.).