



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Ana D. Tačić

**RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA
NAPREDNIH FARMACEUTSKIH SISTEMA
SA SULFANILAMIDOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



Ana D. Tačić

**DEVELOPMENT AND
CHARACTERIZATION OF ADVANCED
PHARMACEUTICAL SYSTEMS WITH
SULFANILAMIDE**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2019.

MENTOR:

Prof. dr Vesna Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Ljubiša Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Stevo Najman, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet u Nišu

Dr Ivana Nešić, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet u Nišu

Dr Sanja Petrović, docent
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Datum odbrane: _____

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	prof. dr Vesna Nikolić, redovni profesor Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu
Naslov:	Razvoj i karakterizacija naprednih farmaceutskih sistema sa sulfanilamidom
Rezime:	<p>Napredni farmaceutski sistemi mogu da omoguće bolju bioraspoloživost i sigurniju i efikasniju primenu lekova povećanjem njihove rastvorljivosti i stabilnosti, čime poboljšavaju farmakološku aktivnost, a smanjuju neželjene efekte leka. Sulfanilamid je sintetski antimikrobni lek širokog spektra delovanja čija je primena u terapiji ograničena slabom rastvorljivošću u vodi i fotoosetljivošću.</p> <p>Cilj ove doktorske disertacije bio je da se pripreme i okarakterišu različiti farmaceutski sistemi (inkluzioni kompleksi, hidrogelovi i liposomi) sa sulfanilamidom, u kojima bi se povećala rastvorljivost i fotostabilnost sulfanilamida, a zadržala antimikrobna aktivnost i omogućila modifikovana isporuka leka. U tu svrhu, konvencionalnim postupkom sintetisan je i prečišćen sulfanilamid i okarakterisan primenom FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM metode.</p> <p>Inkluzioni kompleksi sa β-ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom pripremljeni su metodom koprecipitacije i okarakterisani primenom FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM metoda, čime je dokazano inkorporiranje sulfanilamida u ciklodekstrinske šupljine. Ispitivanjima fazne rastvorljivosti i fotostabilnosti pokazano je da se rastvorljivost i stabilnost sulfanilamida povećavaju nakon inkorporiranja u molekule ciklodekstrina, naročito u slučaju 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina. Formiranjem inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima povećava se i jačina antimikrobnog delovanja sulfanilamida, kao posledica povećanja njegove rastvorljivosti u vodi.</p> <p>Homopolimerni hidrogelovi p(NIPAM)-a sintetisani su slobodno-radikalskom polimerizacijom, uz variranje sadržaja umreživača, i okarakterisani primenom FTIR, XRD i SEM metoda. Sadržaj zaostalih reaktanata je određen HPLC metodom, a stepen bubrenja sintetisanih hidrogelova gravimetrijski. U sintetisane i okarakterisane hidrogelove</p>

inkorporiran je sulfanilamid, što je pokazano FTIR, XRD i SEM metodama. Ispitan je uticaj temperature, pH vrednosti i sadržaja umreživača na brzinu oslobađanja sulfanilamida iz hidrogelova. Pokazano je da hidrogelovi na bazi p(NIPAM)-a mogu biti pogodni nosači za sulfanilamid.

MLV liposomi sa sulfanilamidom pripremljeni su metodom tankog filma, a ekstrudiranjem su dobijeni unilamelarni liposomi odgovarajuće veličine i zadovoljavajuće stabilnosti, sa vrlo uskom raspodelom veličina čestica. Oslobađanje sulfanilamida iz liposoma je praćeno tehnikom sa dijaliznim vrećicama u odnosu na puferski rastvor, čime je pokazano da se inkorporiranjem u liposome dvostruko usporava brzina oslobađanja sulfanilamida. Oslobađanje sulfanilamida iz liposoma najbolje opisuje Korsmeyer-Peppas-ov model, pri čemu je dominantan mehanizam oslobađanja Fick-ova difuzija. Fotostabilnost sulfanilamida raste nakon inkorporiranja u liposome, pri čemu najveći zaštitni efekat imaju MLV liposomi. Metodom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS su identifikovani fotodegradacioni proizvodi sulfanilamida: sulfanilna kiselina, anilin i benzidin. Fotodegradacija sulfanilamida je slobodno-radikalna reakcija i prati kinetiku prvog reda, a dešava se pod uticajem •OH radikala.

Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast:	Hemija i hemijske tehnologije
Ključne reči:	Sulfanilamid, inkluzioni kompleksi, hidrogelovi, liposomi, fotostabilnost, degradacioni proizvodi
UDK:	547.551.52 : 615.281 : 678.744 : 543.42 (043.3)
CERIF klasifikacija:	T 410 Farmaceutska i srodne tehnologije
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dr Vesna Nikolić, Full Professor Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš
Title:	Development and characterization of advanced pharmaceutical systems with sulfanilamide
Abstract:	<p>Advanced pharmaceutical systems for drug delivery can provide better bioavailability, safer and more effective application of active substances, by increasing their solubility and stability while improving pharmacological activity and reducing side effects. Sulfanilamide is a broad-spectrum, synthetic antimicrobial drug whose application in therapy is limited by its poor water solubility and photosensitivity.</p> <p>The aim of the present doctoral dissertation was preparation and characterization of various pharmaceutical systems (inclusion complexes, hydrogels and liposomes) with sulfanilamide, in order to increase solubility and photostability while maintaining antimicrobial activity of sulfanilamide and enabling its modified delivery. For that purpose, sulfanilamide was synthesized using the conventional method, purified and characterized by using FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM methods.</p> <p>Inclusion complexes of sulfanilamide with β-cyclodextrin and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin were prepared using the coprecipitation method and characterized by using FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC and SEM methods, which proved the incorporation of sulfanilamide into the cyclodextrin cavities. Phase-solubility and photostability studies have shown that solubility and stability of sulfanilamide increase after incorporation into cyclodextrin molecules, especially in the case of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. The formation of inclusion complexes with cyclodextrins also increases the potency of the sulfanilamide antimicrobial action due to the increase of its solubility in water.</p> <p>Homopolymeric p(NIPAM) hydrogels were synthesized using free radical polymerization process, with varying crosslinker content, and characterized using FTIR, XRD and SEM methods. The residual reactant content was determined by using HPLC method and the swelling degree of the synthesized hydrogels was determined gravimetrically.</p>

Sulfanilamide was incorporated into the synthesized and characterized hydrogels, which is proved by using FTIR, XRD and SEM methods. The effect of temperature, pH and the crosslinker content on the rate of sulfanilamide release from the hydrogels was examined. It has been shown that p(NIPAM) hydrogels can be suitable carriers for sulfanilamide.

MLV liposomes with sulfanilamide were prepared by the thin film method, and unilamellar liposomes of adequate size and satisfactory stability, with a very narrow particle size distribution, were prepared by extrusion. The release of sulfanilamide from the liposomes was examined using dialysis sac method, relative to the buffer solution, indicating that sulfanilamide incorporation into liposomes halves its rate of release. The release of sulfanilamide from liposomes is best described by the Korsmeyer-Peppas model, with Fickian diffusion as predominant release mechanism. The photostability of sulfanilamide increases after incorporation into liposomes, while MLV liposomes have the greatest protective effect. The photodegradation products of sulfanilamide: sulfanilic acid, aniline and benzidine, were identified by using UHPLC-DAD-HESI-MS/MS method. The photodegradation of sulfanilamide is a free radical reaction influenced by •OH radicals and follows first order kinetics.

Scientific Field: Technological engineering

Scientific Discipline: Chemistry and chemical technology

Key Words: Sulfanilamide, inclusion complexes, hydrogels, liposomes, photostability, degradation products

UDC: 547.551.52 : 615.281 : 678.744 : 543.42 (043.3)

CERIF Classification: T 410 Pharmaceuticals and related technologies

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Disertacija je rezultat istraživanja u okviru projekta TR-34012 „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Iskrenu i najtopliju zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Vesni Nikolić, koja me je prihvatila kao doktoranta i aktivno rukovodila izradom ove doktorske disertacije. Podjednako se zahvaljujem i komentoru prof. dr Ljubiši Nikoliću koji je bio tu kada je bilo potrebno pristupiti izazovu na drugačiji način. Mentori, hvala Vam što savesno i sa puno entuzijazma obavljate svoj posao, što svoje znanje velikodušno delite sa drugima i što činite da se svaki Vaš doktorant oseća kao deo velike, istraživačke porodice. Hvala na ukazanom poverenju i prilici da se bavim poslom koji volim.

Posebno sam zahvalna profesorima sa Medicinskog fakulteta u Nišu, prof. dr Stevi Najmanu i dr Ivani Nešić, vanrednom profesoru, na pažljivom čitanju disertacije i dobronamernim sugestijama koji su je obogatili. Veliko hvala dr Sanji Petrović, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, koja je nesebično delila svoje domensko znanje i iskustvo sa mnom, i što je svojim savetima pomogla da disertacija dobije oblik koji ima danas.

Najveći deo eksperimenata u okviru ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. Od srca se zahvaljujem kolegama, prvenstveno dr Snežani Ilić-Stojanović, dr Ivanu Saviću i dr Saši Saviću, docentima, na prijatnoj radnoj atmosferi, nesebičnoj pomoći i uspešnoj saradnji tokom proteklih godina. Hvala dr Bojani Danilović, vanrednom profesoru, na trudu i vremenu uloženom u ispitivanja antimikrobne aktivnosti. XRD i NMR ispitivanja su urađena na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, za šta veliku zahvalnost dugujem prof. dr Agneš Kapor i prof. dr Mirjani Popsavin. Iskreno se zahvaljujem stručnim saradnicima u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju na Medicinskom fakultetu u Nišu, kao i dr Ani Ćirić sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu i dr Saneli Savić iz kompanije DCP HEMIGAL, na ukazanoj pomoći u eksperimentalnim istraživanjima.

Želim da se zahvalim profesorima i koleginicama iz kancelarija 307, 308 i 312 koji su učinili prijatnim svaki zajednički trenutak.

Hvala mojim roditeljima i sestrama što su uvek bili tu za mene.

I na kraju hvala mom budućem suprugu Marku na ljubavi, strpljenju i nepokolebljivoj podršci tokom svih zajedničkih godina.

LISTA VAŽNIJIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

AIBN	2,2'-azobis(2-metilpropionitril)
BP	benzoi-peroksid
DDS	sistemi za isporuku lekova
DMSO	dimetilsulfoksid
DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
EGDM	etilenglikoldimetakrilat
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom
HP- β -CD	2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin
LCST	donja kritična temperatura rastvora
LUV	velike unilamelarne vezikule
MBA	<i>N,N'</i> -metilen-bis(akrilamid)
MLV	multilamelarne vezikule
NIPAM	<i>N</i> -izopropilakrilamid
PABA	<i>para</i> -aminobenzoeva kiselina
PdI	indeks polidisperznosti
p(NIPAM)	poli(<i>N</i> -izopropilakrilamid)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SMX/TMP	sulfametoksazol/trimetoprim
SUV	male unilamelarne vezikule
UV	ultraljubičasto zračenje
UV-Vis	ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija
VPTT	temperatura zapreminskog faznog prelaza
XRD	difrakcija X-zraka
$^1\text{H-NMR}$	protonska nuklearna magnetna rezonanca
α	stepen bubrenja
β -CD	β -ciklodekstrin

SADRŽAJ

1 UVOD	1
2 TEORIJSKI DEO	4
2.1 Početak razvoja antimikrobne terapije – sulfonamidi.....	4
2.1.1 Sulfanilamid.....	5
2.1.2 Sinteza sulfanilamida.....	6
2.1.3 Antimikrobna aktivnost sulfonamida.....	7
2.1.4 Mehanizam delovanja sulfonamida	8
2.1.5 Primena sulfonamidnih antimikrobnih lekova.....	10
2.1.6 Farmakokinetika sulfonamidnih antimikrobnih lekova.....	11
2.1.7 Neželjeni efekti i rezistencija na sulfonamide	12
2.1.8 Fotodegradacija sulfonamida	13
2.2 Ciklodekstrini i inkluzioni kompleksi.....	16
2.2.1 Struktura i fizičko-hemijske osobine ciklodekstrina.....	16
2.2.2 Stabilnost ciklodekstrina.....	17
2.2.3 Primena ciklodekstrina.....	17
2.2.4 Inkluzioni kompleksi	19
2.2.5 Tehnike izrade inkluzionih kompleksa	20
2.2.5.1 Koprecipitacija.....	21
2.2.6 Stabilnost inkluzionih kompleksa – dijagrami fazne rastvorljivosti.....	21
2.2.7 Oslobađanje aktivne supstance iz inkluzionog kompleksa.....	23
2.3 Hidrogelovi	24
2.3.1 Hidrogelovi – pojam i osobine.....	24
2.3.2 Klasifikacije hidrogelova.....	24
2.3.3 Hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse.....	25
2.3.3.1 Temperaturno-osetljivi hidrogelovi	25

2.3.4 Dobijanje hidrogelova.....	27
2.3.4.1 Sinteza hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a.....	27
2.3.5 Bubrenje hidrogelova.....	28
2.3.5.1 Mehanizam transporta fluida	29
2.3.6 Primena hidrogelova	30
2.3.6.1 Primena hidrogelova u dijagnostici i isporuci lekova.....	31
2.3.6.2 Struktura hidrogelova.....	31
2.3.6.3 Inkorporiranje leka u hidrogel	32
2.3.6.4 Oslobođanje leka iz hidrogela.....	33
2.3.6.5 Primena hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a.....	33
2.4 Liposomi	35
2.4.1 Pojam i klasifikacija liposoma	35
2.4.2 Osobine liposoma: prednosti i nedostaci	36
2.4.3 Izrada liposoma.....	37
2.4.3.1 Metoda hidratacije tankog lipidnog filma.....	38
2.4.4 Karakterizacija liposoma	38
2.4.5 Stabilnost liposoma.....	39
2.4.6 Inkorporiranje aktivnih supstanci u liposome.....	40
2.4.7 Oslobođanje aktivnih supstanci iz liposoma <i>in vitro</i>	40
2.4.8 Primena liposoma.....	41
3 EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1 Materijali i reagensi	43
3.2 Metode sinteze i pripreme farmaceutskih sistema sa sulfanilamidom.....	43
3.2.1 Sinteza i prečišćavanje sulfanilamida	43
3.2.2 Priprema inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša sa sulfanilamidom.....	44
3.2.2.1 Priprema inkluzionih kompleksa	44
3.2.2.2 Priprema fizičkih smeša.....	44

3.2.3	Sinteza i priprema hidrogelova sa sulfanilamidom.....	45
3.2.3.1	Sinteza homopolimernih hidrogelova.....	45
3.2.3.2	Bubrenje hidrogelova.....	45
3.2.3.3	Liofilizacija hidrogelova.....	46
3.2.3.4	Inkorporiranje sulfanilamida u sintetisane hidrogelove.....	46
3.2.3.5	Oslobađanje sulfanilamida iz hidrogelova.....	46
3.2.4	Priprema liposomskih disperzija sa sulfanilamidom	47
3.2.4.1	Određivanje veličine kapi, zeta potencijala i indeksa polidisperznosti liposomske disperzije.....	47
3.2.4.2	In vitro ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida iz liposomskih disperzija	48
3.3	Metode ispitivanja izrađenih farmaceutskih sistema	48
3.3.1	Fizičko-hemijske metode ispitivanja	48
3.3.1.1	Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)	48
3.3.1.2	Difrakcija X-zraka (XRD)	49
3.3.1.3	Nuklearna magnetna rezonanca (¹ H-NMR).....	49
3.3.1.4	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	49
3.3.1.5	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	50
3.3.1.6	Spektrofotometrija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti (UV-Vis).....	50
3.3.1.7	Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC).....	50
3.3.1.8	Tečna hromatografija – masena spektrometrija (UHPLC-DAD-HESI-MS/MS analiza).....	50
3.3.2	Ostale metode ispitivanja izrađenih farmaceutskih sistema	51
3.3.2.1	Ispitivanje fazne rastvorljivosti.....	51
3.3.2.2	Ispitivanje fotostabilnosti sulfanilamida u liposomima i inkluzionim kompleksima	52
3.3.2.3	Ispitivanja antimikrobne aktivnosti sulfanilamida i inkluzionih kompleksa ...	52
4	REZULTATI I DISKUSIJA	54

4.1 Inkluzioni kompleksi	54
4.1.1 FTIR analiza.....	54
4.1.2 ¹ H-NMR analiza.....	58
4.1.3 XRD analiza.....	61
4.1.4 DSC analiza	63
4.1.5 SEM analiza	65
4.1.6 Fazna rastvorljivost.....	67
4.1.7 Fotostabilnost sulfanilamida u inkluzionim kompleksima	69
4.1.8 Antimikrobna aktivnost sulfanilamida i inkluzionih kompleksa	71
4.2 Hidrogelovi	74
4.2.1 Sinteza hidrogelova.....	74
4.2.2 FTIR analiza.....	75
4.2.3 XRD analiza.....	80
4.2.4 SEM analiza	81
4.2.5 HPLC analiza rezidualnih reaktanata.....	83
4.2.6 Bubrenje hidrogelova.....	86
4.2.6.1 Ispitivanje uticaja pH i sadržaja umreživača na bubrenje hidrogelova.....	86
4.2.6.2 Uticaj temperature na bubrenje hidrogelova.....	88
4.2.7. Hidrogelovi kao sistemi za modifikovano oslobađanje sulfanilamida	90
4.2.7.1 Inkorporiranje sulfanilamida u hidrogelove.....	90
4.2.7.2 Oslobađanje sulfanilamida iz hidrogelova.....	91
4.3 Liposomi	94
4.3.1 Karakterizacija liposoma sa sulfanilamidom	94
4.3.2 <i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida iz liposoma.....	96
4.3.3 Fotostabilnost sulfanilamida u puferском rastvoru i liposomima.....	99
4.3.4 Identifikacija fotodegradacionih proizvoda sulfanilamida	102
5 ZAKLJUČAK	109

6 LITERATURA	112
PRILOZI	132
Prilog 1: Antimikrobna aktivnost čistog sulfanilamida i sulfanilamida u inkluzionim kompleksima.....	132
Prilog 2: UV-Vis spektri sulfanilamida u puferu i liposomima.....	135
BIOGRAFIJA	138
BIBLIOGRAFIJA	139

1 UVOD

Lek se u ljudski organizam može uneti na više načina. Da bi se postigao terapijski efekat, neophodno je odabrati adekvatan put primene leka. Bilo da se lek primenjuje oralno ili parenteralno, održavanje terapijske doze leka u organizmu postiže se ponovljenom primenom leka. Kod konvencionalne primene leka, koncentracija leka u organizmu se drastično menja između dve doze, odnosno menja se od maksimalnih vrednosti, koje mogu biti toksične, do minimalnih vrednosti, koje ne moraju biti efikasne. Stoga, uprkos efektivnosti neke terapije, u pojedinim momentima se u organizmu mogu naći kako toksične, tako i subterapeutske doze leka. Upravo nemogućnost kontrolisanja nivoa leka u organizmu tokom dužeg vremenskog perioda predstavlja značajan nedostatak terapije konvencionalnim farmaceutskim oblicima (Coelho i sar., 2010). Zbog toga, u poslednjih nekoliko decenija intenzivno se razvijaju novi pristupi i strategije za povećanje efikasnosti terapije, što predstavlja početak razvoja sistema za kontrolisanu isporuku lekova.

Sistemi za isporuku lekova (*Drug Delivery Systems*, DDS) se definišu kao formulacije ili nosači aktivnih supstanci koji omogućavaju unošenje leka u organizam ujedno povećavajući njegovu efikasnost i bezbednost kontrolisanjem brzine, vremena i/ili mesta oslobađanja leka u organizmu (Jain, 2008). Pored toga što kontrolišu oslobađanje i lokalizuju efekat leka, DDS imaju sposobnost da promenom fizičko-hemijskih osobina i/ili stabilnosti (Tibbitt i sar., 2016), farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina lekovite supstance, njene nespecifične toksičnosti, imunogenosti i sposobnosti bioprepoznavanja (Shaik i sar., 2012), poboljšaju efikasnost leka. Dakle, uloga sistema za kontrolisano oslobađanje lekova nije samo isporuka biološki aktivnih komponenti na kontrolisan način, već i omogućavanje održavanja potrebne koncentracije leka u krvi tokom dužeg vremenskog perioda (Coelho i sar., 2010), pri čemu su DDS za kontrolisanu isporuku leka dizajnirani tako da omoguće oslobađanje leka tokom dužeg vremenskog perioda na tačno određen, prethodno definisan način (Tibbitt i sar., 2016).

Primena sistema za kontrolisanu isporuku lekova ima brojne prednosti koje se ogledaju u postojanju izvesnih zahteva koje DDS i materijali korišćeni za njihovu izradu moraju da ispune (Coelho i sar., 2010; Tibbitt i sar., 2016). Naime, idealni sistemi za kontrolisanu isporuku lekova treba da:

- omoguće održavanje koncentracije leka u terapijskim okvirima,
- lokalizuju lek na mestu delovanja i tako povećaju njegov efekat, uz istovremeno smanjenje doze leka potrebne za postizanje terapijskog dejstva,

- poboljšaju adherencu pacijenata smanjenjem broja potrebnih pojedinačnih doza i ukupne dnevne doze leka, čime se ujedno smanjuju i neželjeni efekti leka.

Materijali koji se koriste za izradu sistema za kontrolisanu isporuku lekova treba da:

- prime i zadrže dovoljnu količinu leka,
- zaštite lek od delovanja nepovoljnih faktora sredine i spreče njegovu degradaciju, i
- oslobađaju lek na tačno definisan način tokom dužeg vremenskog perioda.

Prilikom izrade sistema za kontrolisanu isporuku leka, u obzir treba uzeti i potencijalnu toksičnost korišćenog materijala, kao i osobine i toksičnost njegovih degradacionih proizvoda. Pored toga, DDS za kontrolisanu isporuku leka treba da bude dizajniran tako da ograniči bilo kakvu nelagodnost u toku ili nakon primene, kao i da bude isplativ (Coelho i sar., 2010; Tibbitt i sar., 2016).

Dosadašnje iskustvo sa izradom i primenom DDS pokazalo je da efikasnost DDS u mnogome zavisi od hemijske strukture materijala korišćenog za njegovu izradu, pri čemu čak i male strukturne promene mogu da dovedu do drastičnih promena degradacionog profila i bezbednosti materijala (Tibbitt i sar., 2016). Fizički oblik i veličina čestica DDS su od velikog značaja, jer utiču na svojstva DDS i interakcije sa imunim sistemom. Pored toga, DDS aktivno interaguju sa drugim ćelijama i tkivima ljudskog organizma, često na nepredvidljiv način, zbog čega razvoj svakog pojedinačnog sistema zahteva vreme i ima svoje specifičnosti.

Izrada formulacija sa aktivnim supstancama koje su slabo rastvorljive u vodi predstavlja izazov za farmaceutsku industriju, naročito kada je potrebno ostvariti kontrolisano oslobađanje aktivne supstance. Apsorpcija i bioraspoloživost lekova u velikoj meri zavise od rastvorljivosti aktivne supstance u digestivnim sokovima, a kada je rastvorljivost aktivne supstance u vodi niska, njena apsorpcija i bioraspoloživost nakon oralne primene mogu biti veoma varijabilne. Iako se poslednjih godina ulažu značajni napor u dizajniranje aktivnih supstanci sa zadovoljavajućom rastvorljivošću u vodi, približno 40% komercijalno dostupnih supstanci i čak 75% supstanci u fazi razvoja su slabo rastvorljive u vodi (Williams i sar., 2013). Zbog toga se i dalje intenzivno radi na razvoju strategija za povećanje rastvorljivosti aktivnih supstanci kako bi se omogućila njihova efikasna i bezbedna primena. Formiranje soli, podešavanje pH vrednosti mikrookoline, odabir adekvatnog polimorfnog oblika i formiranje kokristala, solubilizacija supstanci primenom korastvarača i surfaktanata, kompleksacija sa ciklodekstrinima, smanjenje veličine čestica aktivne supstance, građenje čvrstih disperzija, izrada formulacija na bazi lipida i čvrstih lipidnih nanočestica samo su

neke od strategija koje se koriste za povećanje rastvorljivosti aktivnih supstanci u vodi (Salustio i sar., 2011; Williams i sar., 2013).

Sulfonamidi su prvi sintetisani, selektivno toksični antimikrobni lekovi, širokog spektra delovanja, čija je primena u terapiji delom ograničena neadekvatnim fizičko-hemijskim osobinama, poput slabe rastvorljivosti u vodi i fotoosetljivosti. Kako bi se prevazišli ovi nedostaci i omogućila efikasnija i bezbednija primena sulfonamidnih lekova, mogu biti iskorišćeni različiti napredni farmaceutski sistemi, koji ujedno omogućavaju i ciljnu isporuku i modifikovano oslobađanje aktivnih supstanci. U tu svrhu ispitani su inkluzioni kompleksi sa ciklodekstrinima, hidrogelovi na bazi p(NIPAM)-a i liposomi, kao nosači za modifikovano oslobađanje sulfanilamida.

Stoga, osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- sinteza i karakterizacija sulfanilamida, osnovnog predstavnika grupe sintetskih antimikrobnih lekova;
- izrada i karakterizacija inkluzionih kompleksa sintetisanog sulfanilamida sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, u cilju povećanja rastvorljivosti sulfanilamida;
- ispitivanje fotostabilnosti sulfanilamida u inkluzionim kompleksima;
- ispitivanje mikrobiološke aktivnosti sintetisanog sulfanilamida i sulfanilamida u inkluzionim kompleksima;
- sinteza i karakterizacija temperaturno-osetljivih p(NIPAM) hidrogelova, sa različitim sadržajem umreživača etilenglikoldimetakrilata, kao nosača za modifikovano oslobađanje sulfanilamida;
- ispitivanje kinetike bubrenja sintetisanih hidrogelova na različitim temperaturama i pH vrednostima;
- inkorporiranje sintetisanog sulfanilamida u hidrogelove i ispitivanje kinetike oslobađanja sulfanilamida na povišenoj temperaturi, pri pH vrednostima koji odgovaraju pH vrednostima fizioloških tečnosti;
- izrada i karakterizacija liposoma različite veličine i lamelarnosti sa sulfanilamidom;
- ispitivanje kinetike oslobađanja sulfanilamida iz liposoma;
- ispitivanje fotostabilnosti sulfanilamida u liposomima i identifikacija fotodegradacionih proizvoda sulfanilamida.

2 TEORIJSKI DEO

2.1 Početak razvoja antimikrobne terapije – sulfonamidi

Otkriće antimikrobnog delovanja prontosila (*Prontosil rubrum*) početkom tridesetih godina 20. veka predstavlja početak razvoja hemioterapije (Anand, 1975). Za ovo otkriće, Gerhard Domagk je dobio Nobelovu nagradu za medicinu 1939. godine. Prontosil je azo-boja sulfonamidne strukture, koja se u ljudskom organizmu metaboliše do sulfanilamida usled delovanja ćelijskih enzima (Fouts i sar., 1957).

Sulfonamidi su prvi uspešno sintetisani, selektivno toksični antimikrobni lekovi (Neu i Gootz, 1996; Van Meter i Hubert, 2015). Sulfonamidi koji pokazuju antimikrobnu aktivnost predstavljaju veliku grupu lekova, a njihova klasifikacija može biti izvršena na različite načine. Svakako najobuhvatnija jeste podela na oralne i topikalne sulfonamide, pri čemu se oralni dalje dele prema mogućnosti apsorpcije u digestivnom traktu (Varagić i Milošević, 2009). Podela oralnih sulfonamida koji se mogu apsorbovati dalje se vrši prema dužini trajanja delovanja (Struller, 1968; Varagić i Milošević, 2009) na kratkododelujuće, srednjedodelujuće i dugododelujuće sulfonamide. Oralni sulfonamidi koji se ne apsorbuju ostvaruju svoj efekat na nivou digestivnog trakta, dok se topikalni sulfonamidi koriste u terapiji infekcija kože, sluzokože i opekotina.

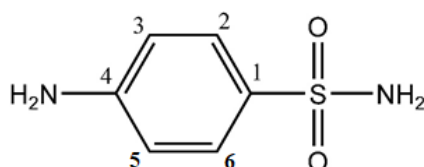
Osnovna struktura sulfonamida sadrži sulfonamidnu grupu i amino grupu u *para* položaju benzenovog prstena. Veliki broj derivata je dobijen supstitucijom vodonikovog atoma na azotu sulfonamidne grupe (N^1), dok je značajno manji broj aktivnih derivata dobijen supstitucijom vodonikovog atoma na azotu aromatične amino grupe (N^4). Uvođenje različitih supstituenata u molekul sulfonamida rezultira nastajanjem produkata različitih fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina.

Još na samom početku opsežnih istraživanja i sinteze derivata sulfanilamida primećeno je da postoje određeni strukturni uslovi koji moraju biti ispunjeni da bi novosintetisani derivati sulfanilamida ispoljili antimikrobnu aktivnost. Pre svega, slobodna aromatična NH_2 grupa u *para* položaju u odnosu na sulfonamidnu grupu je esencijalna za aktivnost sulfonamida. Prisustvo dodatnog supstituenta u *orto* i *meta* položaju benzenovog prstena smanjuje aktivnost sulfonamida kao antibakterijskih agenasa. Monosupstituisani N^1 derivati sulfanilamida su aktivna jedinjenja, čiji stepen aktivnosti raste sa uvođenjem heteroaromatičnih supstituenata. Dvostruka supstitucija u N^1 položaju vodi nastanku

neaktivnih jedinjenja. Pored toga, sulfonamidna grupa mora biti direktno vezana za benzenov prsten. Zamena benzenovog prstena drugim cikličnim sistemom, kao i uvođenje dodatnih supstituenata u benzenov prsten, dovodi do smanjenja ili potpunog gubitka aktivnosti.

2.1.1 Sulfanilamid

Sulfanilamid (4-aminobenzensulfonamid) je osnovni predstavnik grupe sulfonamidnih antimikrobnih lekova. Klinički značaj sulfanilamida nije veliki, jer se zbog sinteze efikasnijih derivata, danas ređe primenjuje u terapiji. Međutim, sulfanilamid predstavlja osnovnu strukturnu i funkcionalnu jedinicu čitave klase antimikrobnih sulfonamida. Strukturna formula sulfanilamida je prikazana na slici 1, a njegove fizičko-hemijske osobine u tabeli 1.



Slika 1. Strukturna formula sulfanilamida

Tabela 1. Opšte karakteristike sulfanilamida

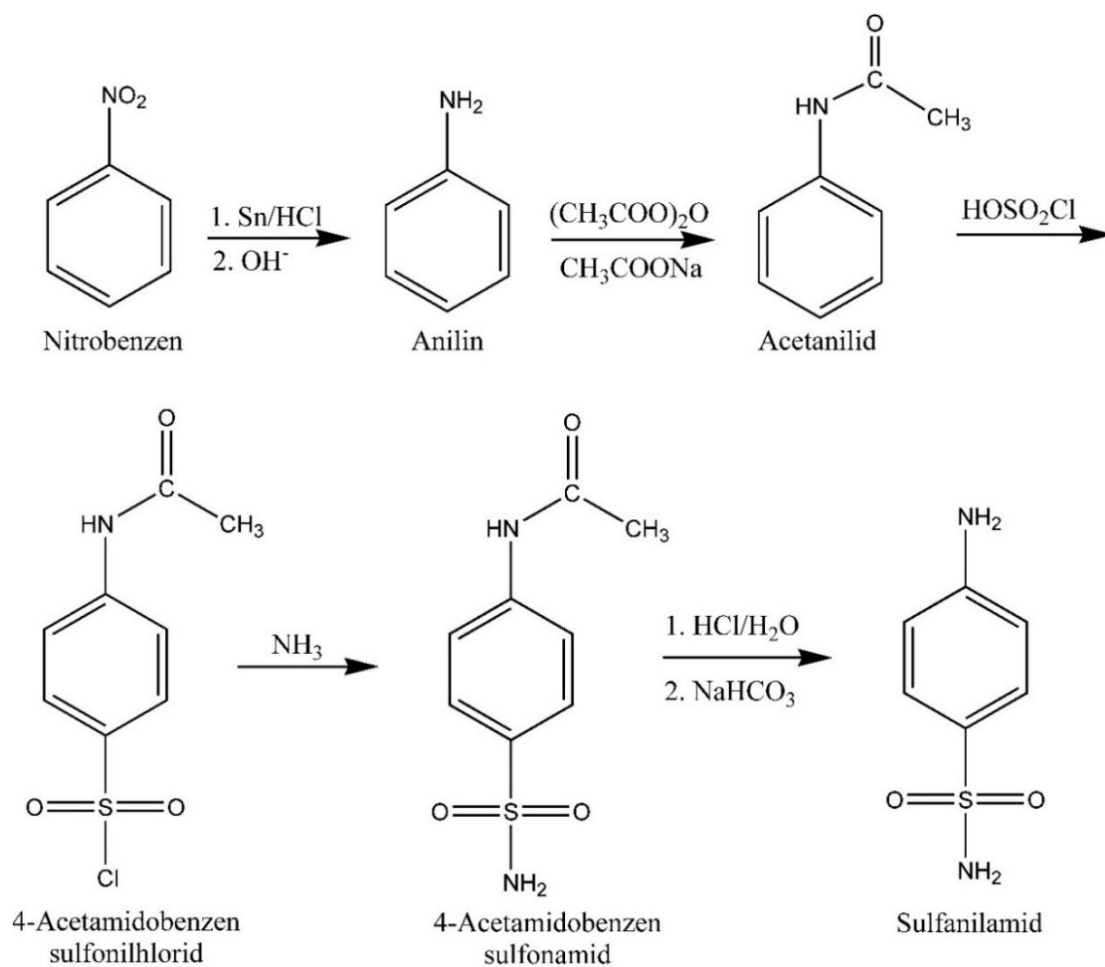
CAS broj	63-74-1
Molekulska masa	172,2
Molekulska formula	$C_6H_8N_2O_2S$
Rastvorljivost	Etanol, aceton, DMSO
Osobine	Bela do prljavobela kristalna supstanca
λ_{max}	255 nm, 312 nm
Tačka topljenja	164-165 °C
Gustina	1,08 g/cm ³
Rastvorljivost u vodi	7,5 mg/cm ³ na 25 °C; 477 mg/cm ³ na 100 °C
pH	5,8-6,1 (0,5% vodeni rastvor)
pK _a	10,4
Stabilnost	Osetljiv na svetlost
Čuvanje	0-6 °C; zaštićeno od svetlosti
Klasifikacija	Sintetska antimikrobna supstanca

Sulfanilamid je stabilna supstanca pod normalnim uslovima temperature i pritiska. Osetljiv je na svetlost i inkompatibilan sa jakim oksidacionim sredstvima (Budavari, 1989). Rastvorljivost sulfanilamida u etanolu ($\sim 27 \text{ mg/cm}^3$) i acetonu ($\sim 200 \text{ mg/cm}^3$) (Budavari, 1989) je veća od njegove rastvorljivosti u hladnoj vodi (tabela 1). Sulfanilamid je slaba kiselina ($\text{pK}_a=10,4$), zbog snažnog elektron-privlačnog efekta $-\text{SO}_2$ supstituenta i stabilizacije nastalog anjona rezonancijom (Cairns, 2008).

2.1.2 Sinteza sulfanilamida

Najčešći način sinteze sulfonamida uključuje reakciju odgovarajućeg sulfonil-hlorida, bilo alifatičnog ili aromatičnog, sa amonijakom ili aminima. Ovaj način sinteze predstavlja najjednostavniji i direktni put dobijanja sulfonamida, pri čemu je prinos sulfonamida visok (Bahrami i sar., 2009; Kolaczek i sar., 2014).

Inicijalno jedinjenje za sintezu sulfanilamida je nitrobenzen (Williamson i Masters, 2012). Nitrobenzen se može redukovati do anilinium-jona primenom kalaja, kao redukcionog sredstva, i hlorovodonične kiseline, a nastali anilinium-jon se može konvertovati u anilin u baznoj sredini. Iz anilina reakcijom acetilacije u vodenoj sredini nastaje acetanilid, jedinjenje nerastvorno u vodi. Naredni korak u sintezi je reakcija elektrofilne aromatične supstitucije u kojoj acetanilid reaguje sa hlorsulfonskom kiselinom, pri čemu nastaje intermedijer 4-acetamidobenzen-sulfonilhlorid, iz koga se, u prisustvu amonijaka, formira 4-acetamidobenzen-sulfonamid. Acetamidna grupa diriguje supstituciju gotovo potpuno u *para* položaju (Pavia i sar., 2005). U završnom koraku sinteze, zaštitna acetamidna grupa podleže hidrolizi u kiseloj sredini formirajući 4-aminobenzensulfonamid, sulfanilamid. Sintaza sulfanilamida je šematski prikazana na slici 2.



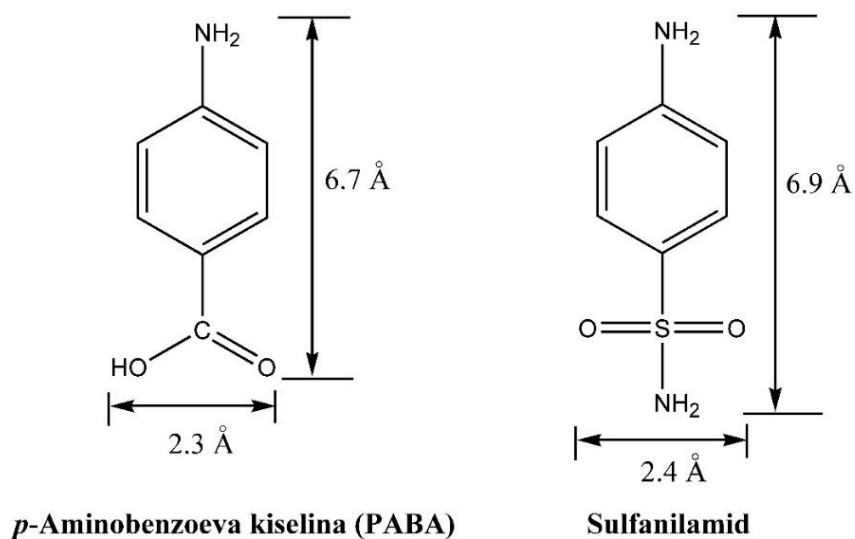
Slika 2. Šematski prikaz sinteze sulfanilamida

2.1.3 Antimikrobna aktivnost sulfonamida

Sulfonamidi su antimikrobni lekovi širokog spektra dejstva, efikasni protiv Gram-pozitivnih i određenih Gram-negativnih bakterija, kao što su crevne bakterije *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* i *Enterobacter* (Varagić i Milošević, 2009). Pokazuju dobru aktivnost protiv *Escherichia coli*, umerenu aktivnost protiv *Proteus mirabilis* i *Enterobacter* vrsta, slabu aktivnost protiv *Klebsiella* vrsta, a gotovo da ne pokazuju inhibitornu aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia* vrsta. Efikasni su protiv vrsta iz roda *Chlamydia*. Takođe, sulfonamidi su efikasni protiv gljivica, kao što je *Pneumocystis carinii* i protozoa, poput *Toxoplasma gondii*. Sulfonamidi se međusobno razlikuju po jačini dejstva, ali ne i po spektru antimikrobne aktivnosti (Miller-Hjelle i sar., 2004; Zessel i sar., 2014).

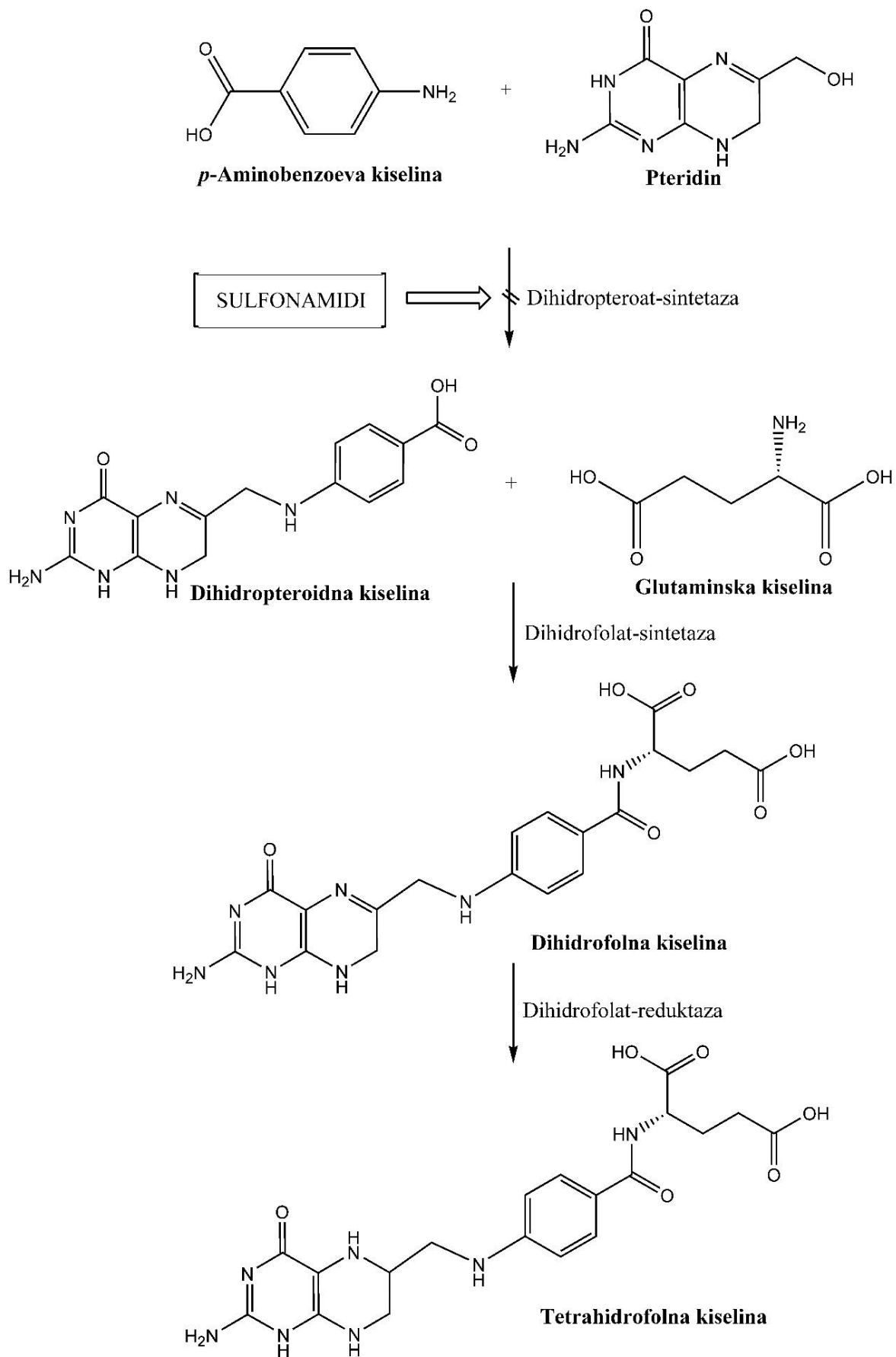
2.1.4 Mehanizam delovanja sulfonamida

Sulfonamidi su kompetitivni antagonisti *para*-aminobenzojeve kiseline (PABA), jedinjenja neophodnog za sintezu folne kiseline i, samim tim, za rast i razmnožavanje bakterija. Sulfonamidi reverzibilno blokiraju sintezu folne kiseline, zbog čega ostvaruju bakteriostatski efekat (Henry, 1943; Varagić i Milošević, 2009). Osnova inhibitornog delovanja je sličnost strukture sulfonamida i PABA-e, što je prikazano na primeru sulfanilamida (slika 3).



Slika 3. Sličnost strukture PABA-e i sulfanilamida

Normalno, prvi korak u sintezi folne kiseline je reakcija PABA-e i pteridina (Brown, 1962), u prisustvu enzima dihidropteroat-sintetaze. Pri tome nastaje dihidropteroidna kiselina, koja se dejstvom dihidrofolat-sintetaze u prisustvu glutaminske kiseline prevodi u dihidrofolnu kiselinu. Na nastali intermedijer deluje enzim dihidrofolat-reduktaza dajući tetrahidrofolnu kiselinu, koju bakterije koriste za sintezu metionina, purinskih i pirimidinskih baza (Miller-Hjelle i sar., 2004; Varagić i Milošević, 2009). Međutim, u prisustvu sulfonamida, enzim dihidropteroat-sintetaza se vezuje za ove strukturne analoge PABA-e, čime se sprečava sinteza folne kiseline, i u krajnjoj liniji, sinteza nukleinskih kiselina u bakterijama. Sintaza folne kiseline i mesto inhibitornog delovanja sulfonamida su šematski prikazani na slici 4.



Slika 4. Sinteza folne kiseline i mesto delovanja sulfonamida

2.1.5 Primena sulfonamidnih antimikrobnih lekova

Sulfonamidi se danas najčešće primenjuju u terapiji infekcija mokraćnih puteva izazvanih osetljivim sojem bakterija, dok se sam sulfanilamid najviše koristi u tretmanu vaginalnih infekcija. Akutna, nekomplikovana urinarna infekcija izazvana bakterijom *Escherichia coli* i drugim patogenim bakterijama se može adekvatno tretirati kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima, SMX/TMP (Ronald, 2003). Iako oba leka, kada se primene odvojeno, pokazuju bakteriostatsko delovanje, njihova kombinacija ispoljava baktericidni efekat. Sulfametoksazol je antimikrobni lek koji se koristi u tretmanu urinarnih infekcija (McCarthy i sar., 1999), ali i bronhitisa (Franks i Gleiner, 1984) i prostatitisa (Kurzer i Kaplan, 2002). Kombinacija SMX/TMP se primenjuje u tretmanu encefalomijelitisa (Sakiyama i sar. 2015), a zajedno sa visokim dozama daptomicina u tretmanu meningitisa uzrokovanog multirezistentnom bakterijom *Staphylococcus epidermidis* (Vena i sar., 2013). Sulfadiazin se koristi u profilaksi i tretmanu infekcija izazvanih sa *Pneumocystis carinii*, pre svega kod pacijenata sa HIV-om i drugih imunokompromitovanih pacijenata, kao i toksoplazmoza izazvanih sa *Toxoplasma gondii* (Vree i sar., 1995). Sulfadiazin i sulfizoksazol imaju važnu ulogu u profilaksi streptokoknih infekcija kod pacijenata sa reumatskom groznicom preosetljivih na penicilin (Gerber i sar., 2009). Sulfonamidi koji se ne resorbuju (ftalilsulfatiazol, sukcinilsulfatiazol i salicilazosulfapiridin) se mogu koristiti u terapiji crevnih infekcija, ulcerativnog kolitisa ili enteritisa (Varagić i Milošević, 2009).

Sulfonamidi za lokalnu primenu se u obliku rastvora ili masti primenjuju u terapiji konjuktivitisa i kao dodatna terapija trahoma (Fouts i sar., 1957). Sulfacetamid se može koristiti topikalno u tretmanu infekcija oka, poput bakterijskog konjuktivitisa (Snyder i Glasser, 1994). Kombinacija SMX/TMP sa azitromicinom se koristi u tretmanu okularne toksoplazmoze (Berkani i sar., 2015; Soheilian i sar., 2005; Yazici i sar., 2009). Sensoy i saradnici su razvili bioadhezivne, polimerne mikrosfere sa sulfacetamid-natrijumom sa ciljem povećanja vremena zadržavanja leka na površini oka i, samim tim, povećanja efikasnosti terapije okularnog keratitisa izazvanog sa *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* kod zečeva (Sensoy i sar., 2009). Emolijentna pena koja sadrži 10% sulfacetamid-natrijuma i 5% sumpora se koristi u tretmanu akni (Del Rosso, 2009) i papulopustularne rosacee (Trumbore i sar., 2009). Sulfonamidi za lokalnu primenu se koriste i u prevenciji infekcija kod pacijenata sa opekotinama. Sulfadiazin-srebro u obliku hidrofilnog 1% krema se može koristiti u tretmanu opekotina (Klasen, 2000), a pokazuje dobru aktivnost protiv Gram-

negativnih bakterija, naročito protiv *Pseudomonas aeruginosa*, koji često kolonizuje opekotinama oštećeno tkivo.

Šira primena sulfonamida u terapiji je ograničena, pre svega, rezistencijom bakterija i neželjenim efektima sulfonamida. Pored toga, od uvođenja sulfonamida u terapiju pre više od 70 godina, izolovan je i sintetisan veliki broj novih antimikrobnih supstanci, koje su potisnule sulfonamide. Međutim, i dalje postoje stanja i bolesti za čiju terapiju su sulfonamidi lekovi izbora (Sköld, 2009).

2.1.6 Farmakokinetika sulfonamidnih antimikrobnih lekova

Sa izuzetkom nekih topikalnih i parenteralnih (Finch i sar., 2010) sulfonamidnih preparata, većina sulfonamidnih lekova se primenjuje oralno, zbog čega je njihova apsorpcija u sistemsku cirkulaciju esencijalna za ispoljavanje njihovog farmakološkog dejstva u ciljnim tkivima i organima. Nakon oralne primene, sulfonamidi se uglavnom dobro resorbuju iz digestivnog trakta. Izuzetak predstavljaju sulfagvanidin (Rantz i Kirby, 1942) i salazosulfapiridin (sulfasalazin) (Seishima i sar., 2016), koji se praktično ne resorbuju iz digestivnog trakta, zbog čega se koriste u terapiji crevnih infekcija. Maksimalna koncentracija u krvi se postiže, u zavisnosti od strukture sulfonamida, u rasponu od 0,5-3 h od oralne primene (Strauss i sar., 1941; Varagić i Milošević, 2009). Posle apsorpcije, sulfonamidi se raspodeljuju u svim tkivima i telesnim tečnostima, uključujući cerebrospinalnu tečnost i krvotok ploda. Raspodela sulfonamida u organizmu zavisi od njihovih fizičko-hemijskih osobina, afiniteta za vezivanje za proteine plazme i stanja organizma (Davis, 1943). Stepem vezivanja za proteine plazme značajno varira među sulfonamidima. Tako, stepen vezivanja sulfanilamida i sulfadiazina iznosi 20-30% (Varagić i Milošević, 2009), sulfalena, sulfamerazina i sulfatiazola 70-75%, a sulfadimetoksina čak 98% (Finch i sar., 2010).

Metabolička transformacija sulfonamida kod ljudi se uglavnom odvija u jetri acetilovanjem amino grupe. Nastali *N*-acetil metaboliti su neaktivni i izlučuju se u mokraći zajedno sa delom nepromenjenih sulfonamida (Davis, 1943). Međutim, kod ljudi je moguća i citohrom P450 katalizovana *N*-oksidacija, kojom nastaju reaktivni hidroksilamino-metaboliti (Kalgutkar i sar, 2010). Ova metabolička reakcija je naročito zastupljena kod sporih acetilatora sa deficijencijom polimorfnog enzima *N*-acetiltransferaze. Nakon što se jednom formiraju, hidroksilamino-metaboliti mogu podleći autooksidaciji do odgovarajućeg nitrozo-intermedijera. Nitrozo-metaboliti su nestabilni u telesnim tečnostima, mogu se redukovati

glutationom i izlučiti iz organizma. Međutim, kada se kapacitet za konjugaciju sa glutationom prekorači, reaktivni metaboliti ispoljavaju direktno citotoksično dejstvo ili se mogu vezati za proteine i učestvovati u imunološkim reakcijama organizma.

Većina sulfonamida se iz organizma brzo izlučuje preko bubrega. Izuzetak su depo-sulfonamidi koji se reapsorbuju na nivou bubrežnih kanalića, zbog čega se veoma sporo izlučuju iz organizma (Varagić i Milošević, 2009). Brzina i način izlučivanja sulfonamida zavisi od vrste sulfonamida, primenjene doze i načina primene (Sukul i Spitteller, 2006). Tako se, na primer, sulfadiazin eliminiše iz organizma nepromenjen u količini od 50%, kao i u obliku acetil- i glukuronid konjugata (50%) preko urina i fecesa.

2.1.7 Neželjeni efekti i rezistencija na sulfonamide

Sulfonamidi dovode do pojave neželjenih efekata kod 4-6% tretiranih pacijenata iz opšte populacije i kod čak 50-60% pacijenata sa HIV infekcijom (Brackett i sar., 2004; Gruchalla, 1999). Preosetljivost je jedna od najčešćih neželjenih reakcija na sulfonamide i često se označava kao „alergija na sulfonamide“. Prijavljeni neželjeni efekti uključuju povećanje telesne temperature (kod 1-2% pacijenata), anafilaktički šok, serumsku bolest, sistemski vaskulitis, pneumoniju, hepatitis, miokarditis, intersticijalni nefritis, krvne diskrazije (hemolitička anemija, neutropenija, trombocitopenija i pancitopenija) i različite reakcije na koži, uključujući ozbiljne reakcije poput Stiven-Džonsonovog sindroma i toksične epidermalne nekrolize (Choquet-Kastylevsky i sar., 2002; Gruchalla, 1999; Miller-Hjelle i sar., 2004). Kod pojedinih pacijenata dolazi do poremećaja na nivou urinarnog trakta, usled taloženja metabolita (acetilovanih sulfonamida), što je naročito izraženo ako je mokraća kisela. Ovo se može izbeći primenom dobro rastvorljivih sulfonamida i održavanjem alkalne reakcije mokraće (Miller-Hjelle i sar., 2004; Varagić i Milošević, 2009). Sulfonamidi kompetiraju sa bilirubinom za vezivanje za proteine plazme, zbog čega mogu da dovedu do pojave kernikterusa kod novorođenčadi. Zbog toga se sulfonamidi ne primenjuju kod novorođenčadi i trudnica tokom poslednja dva meseca trudnoće. Takođe, sulfonamidi mogu potencirati delovanje nekih lekova, kao što su antikoagulanti, hipoglikemijski derivati sulfonilureje i hidantoini antikonvulzivi, o čemu treba voditi računa prilikom istovremene primene ovih lekova sa sulfonamidima (Miller-Hjelle i sar., 2004).

Tretman bakterijskih infekcija se značajno komplikuje sposobnošću bakterija da razviju rezistenciju na antimikrobne lekove. Bakterije mogu biti same po sebi rezistentne na delovanje antimikrobnih lekova (urođena rezistencija) ili mogu steći rezistenciju *de novo*

mutacijom ili transferom gena iz rezistentne bakterije (stečena rezistencija). Stečena rezistencija se može manifestovati kao produkcija enzima koji degradiraju antibakterijski lek, ispoljavanje efluks sistema koji sprečava da lek dođe do ciljnog mesta delovanja unutar ćelije, modifikacija ciljnog mesta delovanja leka ili razvoj alternativnog metaboličkog puta na koji lek nema uticaja (Tenover, 2006).

Rezistencija bakterija na sulfonamide i druge antibakterijske lekove predstavlja veliki problem. Sve češća pojava multirezistentnih sojeva stafilokoka, enterokoka, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas* vrsta u zdravstvenim ustanovama dovodi do neuspešnih tretmana, što može usloviti brojne komplikacije, naročito kod starih ljudi, dece, teško bolesnih i imunokompromitovanih pacijenata. Da bi se prevazišao problem rezistencije mikroorganizama na sulfonamide, koriste se kombinacije određenih sulfonamidnih lekova, koje doprinose prevazilaženju rezistencije mikroorganizama i smanjenju neželjenih i sporednih efekata sulfonamida, čime se obezbeđuje njihova sigurna i efikasna primena u humanoj medicini.

2.1.8 Fotodegradacija sulfonamida

Sulfonamidi u svojoj strukturi imaju aromatični prsten, heteroatome, a mogu sadržati i druge funkcionalne hromoforne grupe, zbog čega su osetljivi na delovanje prirodnog i veštačkog UV zračenja. Fotodegradacija sulfonamida može nastati usled apsorpcije sunčevog zračenja (direktna fotodegradacija) ili, pak, usled delovanja reaktivnih slobodnih radikala, poput singleta kiseonika, hidroksil radikala i drugih reaktivnih vrsta (indirektna fotodegradacija) (Lam i Mabury, 2005). Efikasnost fotodegradacije sulfonamida u vodenom rastvoru zavisi od intenziteta i frekvencije primenjenog zračenja, pH (Trovo i sar., 2009) i tvrdoće vode, kao i od prisustva fotosenzibilizatora (Andreozzi i sar., 2003), poput humske kiseline i nitrata. Vrednost pH rastvora sulfonamida utiče na brzinu reakcija degradacije, ali ne utiče na vrstu nastalih proizvoda (Boreen i sar., 2004).

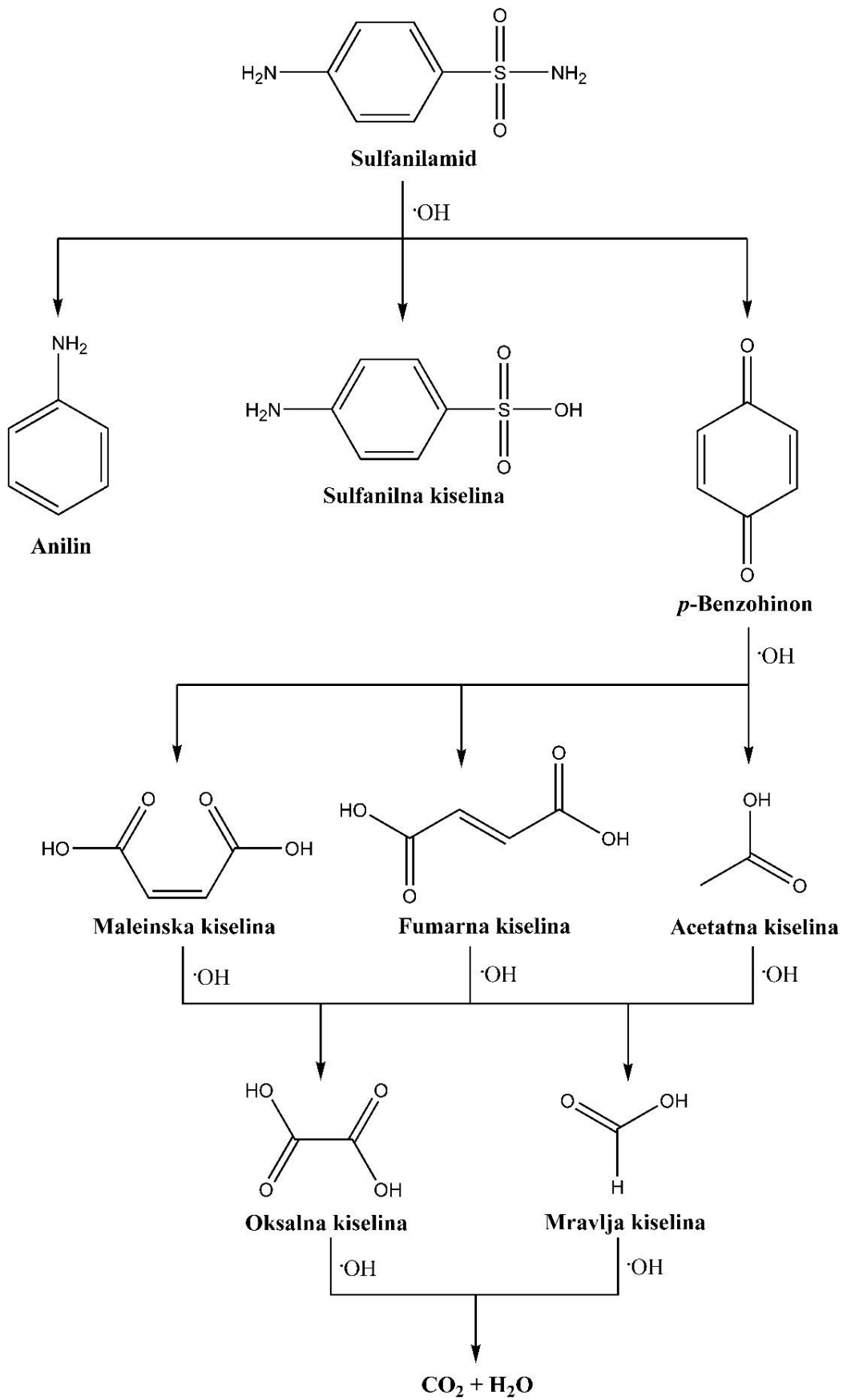
Ispitivanje sklonosti sulfonamida ka degradaciji usled izlaganja UV-A, kombinaciji UV-A i UV-B zračenja i sunčevoj svetlosti pokazalo je da svi ispitivani sulfonamidi podležu fotodegradaciji (Zessel i sar., 2014). Fotodegradacija je bila najizraženija nakon izlaganja sulfonamida kombinovanom delovanju UV-A/UV-B zračenja, zatim nakon delovanja UV-A zračenja, i na kraju nakon izlaganja sunčevoj svetlosti. Brzina degradacije različitih sulfonamida pod istim uslovima se razlikuje. Naime, sulfatiazol i sulfanilamid se gotovo potpuno razlažu nakon 4 sata delovanja UV-A/UV-B zračenja, dok se za 6 sati razloži svega

70% sulfametoksipiridazina i sulfahloropiridazina. Dakle, hemijska struktura sulfonamida uslovljava sklonost ka fotodegradaciji. Sulfametoksipiridazin, sulfahloropiridazin i sulfanilamid pokazuju najveći stepen degradacije (31-65%) kada se izlože delovanju samo UV-A zračenja.

Fotodegradacija različitih sulfonamida u vodenom rastvoru za posledicu ima nastanak različitih degradacionih proizvoda, među kojima je najčešće prisutna sulfanilna kiselina, zatim sulfanilamid, anilin, hidrohion, karboksilne i dikarboksilne kiseline (Garsia-Galan i sar., 2008). Predominantni putevi degradacije sulfonamida i njihovih metabolita uključuju raskidanje S-N veze i gubitak SO₂ molekula (Borba i sar., 2013; Periša i sar., 2013). Pored toga, moguće su i reakcije hidroksilacije benzenovog prstena (Trovo i sar., 2009) i R-ostatka vezanog za azot sulfonamidne grupe (Lam i Mabury, 2005).

Slobodni ·OH radikali potrebni za degradaciju sulfonamida mogu se formirati i delovanjem jonizujućeg zračenja u dozi od 0,6 kGy (Sagi i sar., 2015). Degradacija počinje adicijom ·OH radikala na benzenov prsten, pri čemu nastali cikloheksadienil radikal reaguje sa rastvorenim kiseonikom i transformiše se u peroksi-radikal. Nastanak fenola, otvaranje prstena i fragmentacija se dešavaju istovremeno. Hidroksilovani molekuli, koji predstavljaju primarne degradacione proizvode, zadržavaju aromatičnu strukturu, zbog čega reaguju sličnom brzinom sa ·OH radikalima, kao i osnovni sulfonamidi. Daljom oksidacijom se formiraju dihidroksi-derivati sulfonamida. Potpuna degradacija se naziva mineralizacija i podrazumeva formiranje neorganskih molekula i jona, poput H₂O, CO₂, SO₄²⁻, NH₄⁺ i NO₃⁻. Na slici 5 je šematski prikazana slobodno-radikalska degradacija sulfanilamida.

Kako antimikrobna aktivnost zavisi od hemijske strukture, fotodegradacija može dovesti do nastanka druge antimikrobne supstance ili do inaktivacije leka, što je verovatnije. Proizvodi fotodegradacije gotovo da ne poseduju citotoksični potencijal, osim sulfanilamida, i imaju mali uticaj na proliferaciju ćelija (Baran i sar., 2006; Zessel i sar., 2014).

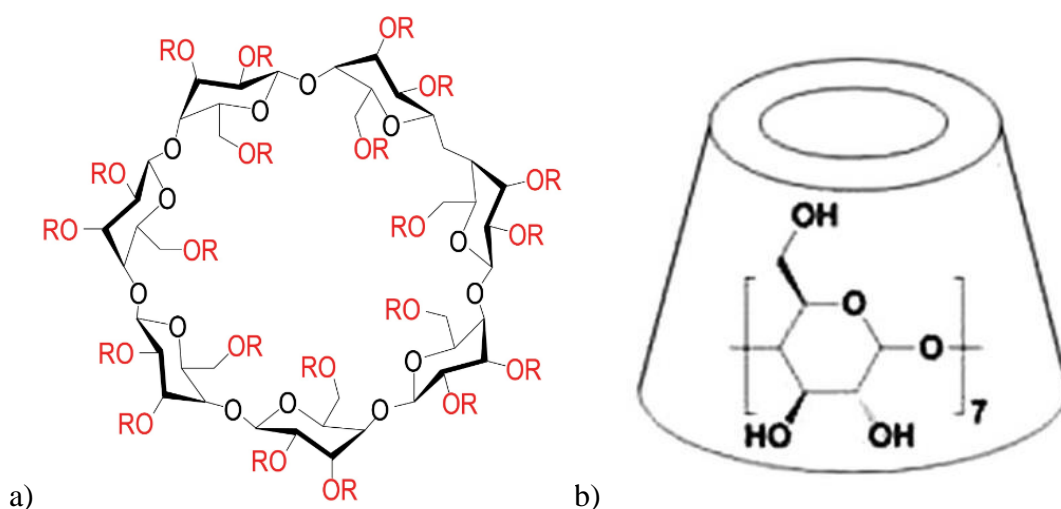


Slika 5. Šematski prikaz slobodno-radikalne degradacije sulfanilamida

2.2 Ciklodekstrini i inkluzioni kompleksi

2.2.1 Struktura i fizičko-hemijske osobine ciklodekstrina

Ciklodekstrini (CD) su ciklični oligosaharidi koji sadrže šest (α -CD), sedam (β -CD), osam (γ -CD) ili više glukopiranoznih jedinica povezanih α -1,4-glikozidnim vezama (Loftsson i Brewster, 2010). Ciklodekstrini sa većim prstenom su skuplji, a imaju manji stepen kompleksacije nego α , β i γ -ciklodekstrini, pa su, samim tim, manje relevantni za farmaceutsku primenu. Hidroksipropil-derivati ciklodekstrina se dobijaju tretiranjem prirodnih ciklodekstrina propilen-oksidom (Jansook i sar., 2018). U strukturi β -ciklodekstrina je prisutna 21 hidroksilna grupa koja može reagovati sa propilen-oksidom i dati derivate β -ciklodekstrina različitog stepena supstitucije (Yergey i sar., 2017), pri čemu prosečan broj supstituenata po molekulu iznosi 2-10 (Saokham i sar., 2018). Na slici 6a je prikazana struktura β -ciklodekstrina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina.



Slika 6. (a) Struktura β -ciklodekstrina (R=H) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (R=H ili -CH₂-CH(OH)-CH₃), (b) struktura skraćenog konusa molekula ciklodekstrina (preuzeto i prilagođeno iz Saha i sar., 2016; Yergey i sar., 2017)

Zbog stoličaste strukture glukopiranoznih jedinica, molekuli ciklodekstrina imaju oblik konusa (slika 6b) sa sekundarnim hidroksilnim grupama na širem kraju, i primarnim hidroksilnim grupama na užem kraju molekula. Ovo čini molekul ciklodekstrina hidrofilnim spolja, dok je njegova unutrašnja šupljina lipofilna. Iako su ciklodekstrini i njihovi kompleksi hidrofilni, njihova rastvorljivost u vodi može biti ograničena, naročito u slučaju β -

ciklodekstrina. Smatra se da je razlog ovome relativno jako povezivanje molekula ciklodekstrina u kristalnom stanju. Nasumična supstitucija hidroksilnih grupa, čak i hidrofobnim grupama, dovešće do značajnog povećanja njihove rastvorljivosti. Zato je rastvorljivost 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina ($>1200 \text{ mg/cm}^3$) višestruko veća od rastvorljivosti samog β -ciklodekstrina ($18,5 \text{ mg/cm}^3$) (Saokham i sar., 2018). Fizičko-hemijska svojstva derivata ciklodekstrina, uključujući njihovu rastvorljivost u vodi i sposobnost kompleksiranja, ne zavise samo od vrste supstituenata, već i od njihovog broja i položaja u molekulu ciklodekstrina (Loffsson i Brewster, 2010).

2.2.2 Stabilnost ciklodekstrina

Sa aspekta enzimске hidrolize, prirodni ciklodekstrini su otporni na dejstvo β -amilaze, dok sporo podležu hidrolizi pod delovanjem α -amilaze, enzima prisutnog u pankreasnom soku i pljuvački čoveka (Szejtli, 1987; Munro i sar., 2004). Kao ciklični oligosaharidi, ciklodekstrini su nekoliko puta otporniji prema neenzimskoj hidrolizi nego linearni oligosaharidi (Loffsson i Brewster, 2010; Swanson i Cori, 1948; Vaitkus i sar., 2008). U vodenim rastvorima, pri niskoj pH vrednosti, ciklodekstrini podležu kiseloj hidrolizi, pri čemu dolazi do kidanja α -1,4-glikozidnih veza, otvaranja prstena i nastanka necikličnih oligosaharida (Hirayama i sar., 1992; Loffsson i Brewster, 2010). U principu, slobodni ciklodekstrini podležu hidrolizi većom brzinom nego ciklodekstrini u kompleksu (Vaitkus i sar., 2008), pri čemu brzina degradacije zavisi i od veličine inkorporiranog molekula. Vaitkus i saradnici su pokazali da se hidroliza β -ciklodekstrina odvija 10 puta sporije u prisustvu 2-(4'-sulfo)-fenilnonana, nego u prisustvu nitrofenola, odnosno da jedinjenja sa dugolančanim alkil grupama u većoj meri usporavaju hidrolizu ciklodekstrina.

S druge strane, u neutralnim i baznim vodenim rastvorima, ciklodekstrini su hemijski stabilni i ne podležu degradaciji. Takođe, u čvrstom stanju, ciklodekstrini mogu biti čuvani nekoliko godina na sobnoj temperaturi, bez bilo kakve detektibilne degradacije (Szejtli, 1988).

2.2.3 Primena ciklodekstrina

Ciklodekstrini α , β i γ , kao i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin su oficinalni prema devetoj Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 9.4, 2018), dok se u Američkoj farmakopeji nalazi i monografija sulfobutiletar- β -ciklodekstrin-natrijuma (USP40-NF35, 2017) (tabela 2).

Tabela 2. Podaci o ciklodekstrinima kao neaktivnim sastojcima farmaceutskih formulacija odobrenih od strane Agencije za hranu i lekove

Ciklodekstrin	Put primene	Dozirani oblik	Maksimalna koncentracija/doza
α-ciklodekstrin	Intrakavitarni	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije	0,13%
β-ciklodekstrin	Oralno	Tableta	133,33 mg
	Oralno	Tableta, obložena	82,5 mg
	Topikalno	Gel	1% m/m
Hidroksipropil-β-ciklodekstrin	Intramuskularno	Injekcija	33,33% m/v
	Intravenski	Injekcija	94,1%
	Intravenski	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije	20%
	IV (infuzija)	Injekcija	33,33%
	IV (infuzija)	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije	15%
	Oralno	Rastvor	400 mg/cm ³
	Oralno	Tableta za primenu u ustima	15 mg
Sulfobutiletar-β-ciklodekstrin-natrijum	Intramuskularno	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije sa aditivima	44,15 m/v
	Intravenski	Injekcija	25%
	Intravenski	Prašak	27%
	Intravenski	Prašak za rastvor za injekcije	94,1%
	Intravenski	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije	96,23%
	Intravenski/subkutano	Rastvor za injekciju	400 mg/cm ³
	Intravenski (infuzija)	Liofilizirani prašak za rastvor za injekcije	16%

Agencija za hranu i lekove definiše α i β -ciklodekstrine, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin i sulfobutiletar- β -ciklodekstrin-natrijum kao neaktivne pomoćne materije koje ulaze u sastav različitih doziranih farmaceutskih oblika (tabela 2), poput gelova, tableta, rastvora, injekcija i praškova za rastvorenje za injekcije (FDA, 2019).

Većina ciklodekstrina od farmaceutskog interesa je hidrofилna, a zbog velike molekulske mase, velikog broja donora i akceptora vodonika i velike hidrofилnosti, njihova oralna bioraspoloživost je niska (<4%). Zbog veoma niske bioraspoloživosti, prirodni ciklodekstrini i njihovi hidrofилni derivati su praktično netoksični nakon oralne primene (Irie i Uekama, 1997; Loftsson i Duchene, 2007). Oralna primena β -ciklodekstrina se dobro podnosi, uglavnom bez pojave bilo kakvih neželjenih efekata, zbog čega je β -ciklodekstrin prihvaćen kao aditiv u hrani sa prihvatljivim dnevnim unosom od 5 mg/kg. Ukoliko se u organizam unese veća količina ciklodekstrina, može doći do pojave nadimanja i omekšavanja stolice (Loftsson i Brewster, 2010). Veći deo oralno primenjene doze ciklodekstrina (50-65%) se izluči nepromenjeno preko fecesa, a ostatak metaboliše delovanjem crevnih bakterija. Apсорbovani ciklodekstrini se brzo eliminišu preko urina. Kod većine osoba sa normalnom bubrežnom funkcijom, čak 90% primenjene doze ciklodekstrina se eliminiše tokom 6 sati, a čak 99% tokom 12 sati od primene (Loftsson i Brewster, 2010).

Parenteralna primena ciklodekstrina može biti donekle ograničena. Naime, β -ciklodekstrin se ne može primenjivati parenteralno zbog niske rastvorljivosti u vodi i sa tim povezanim neželjenim efektima, kao što je nefrotoksičnost (Loftsson i Brewster, 2010). Sa druge strane, hidroksipropil- β -ciklodekstrin i sulfobutiletar- β -ciklodekstrin-natrijum se smatraju bezbednim i odobreni su za parenteralnu primenu (tabela 2).

U današnjoj industriji, ciklodekstrini su inkorporirani u veliki broj proizvoda. Primenuju se u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u izradi proizvoda za ličnu higijenu i parfema, u poljoprivredi, prehrambenoj, hemijskoj i polimernoj industriji (Del Valle, 2004). Procenjuje se da se 20% proizvedenih ciklodekstrina godišnje iskoriste kao aditivi u industriji hrane, oko 30% kao pomoćne materije u farmaceutskoj industriji, dok se najveći deo ciklodekstrina iskoristi u različitim potrošačkim proizvodima (Jansook i sar., 2018).

2.2.4 Inkluzioni kompleksi

Farmaceutska primena ciklodekstrina podrazumeva njihovo kompleksiranje sa aktivnim supstancama, koje su, po svojoj strukturi, najčešće nepolarne, i zbog toga slabo rastvorljive u vodi (Salustio i sar., 2011). Pri tome nastaju specifični „domaćin-gost“

kompleksi, koji se nazivaju inkluzioni kompleksi. Inkluzioni kompleksi su specifična vrsta hemijskih kompleksa u kojima je jedan molekul uklopljen unutar drugog molekula (Marques, 2010), pri čemu ne dolazi do formiranja hemijskih veza. Osnovni kriterijum za formiranje inkluzionog kompleksa je da uklopljeni molekul – „gost“ bude adekvatne veličine i oblika da uđe u šupljinu molekula „domaćina“ (Marques, 2010).

Među mnogim molekulima koji mogu da budu domaćini u inkluzionim kompleksima, najviše se primenjuju ciklodekstrini, jer su stabilna jedinjenja, otporna na delovanje UV i IR zračenja, termostabilna do 270 °C, ne podležu razgradnji u baznoj sredini, dok u kiseloj sredini podležu hidrolizi, pri čemu kao proizvod nastaje glukoza (Mihajlović, 2006). Pored toga, prirodna su jedinjenja i lako su dostupni, a moguća je i njihova derivatizacija u cilju poboljšanja željenih karakteristika.

Ciklodekstrini se u farmaceutskim formulacijama koriste sa ciljem da povećaju rastvorljivost (Kapor i sar., 2010; Nikolić i sar., 2012; Savić i sar., 2015), brzinu rastvaranja, stabilnost (Nikolić i sar., 2004; Nikolić i sar., 2010), bioraspoloživost i oralnu apsorpciju leka ili da modifikuju biološku aktivnost leka. Generalno gledano, ciklodekstrini povećavaju bioraspoloživost leka nakon oralne primene, povećanjem njegove rastvorljivosti i/ili brzine rastvaranja, uz posledično povećanje prolaska leka kroz ćelijske membrane. Ciklodekstrini povećavaju rastvorljivost u vodi slabo rastvorljivih lekova, koji pripadaju klasi II (slaba rastvorljivost, dobra permeabilnost) prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije lekova (FDA, 2017). Sa druge strane, u slučaju lekova III (dobra rastvorljivost, slaba permeabilnost) i I klase (dobra rastvorljivost i permeabilnost), ciklodekstrini imaju neznatan uticaj ili čak ometaju apsorpciju leka u digestivnom traktu (Loftsson i Brewster, 2010; Loftsson i sar., 2016). Pored toga, oni mogu da smanje ili u potpunosti spreče iritaciju GIT-a ili oka, mogu maskirati neprijatan miris, ukus ili boju lekovite supstance, zaštititi je od delovanja mikroorganizama, sprečiti njene interakcije kako sa pomoćnim materijama, tako i sa drugim lekovitim supstancama, i prevesti tečne lekovite supstance u mikrokristalne ili amorfne praškove (Del Vale, 2004; Nikolić i sar., 2004; Salustio i sar., 2011).

2.2.5 Tehnike izrade inkluzionih kompleksa

Za dobijanje inkluzionih kompleksa mogu se koristiti različite metode (Del Valle, 2004), pri čemu je koprecipitacija najčešće primenjivani metod izrade ciklodekstrinskih kompleksa u laboratorijskim uslovima. Za dobijanje kompleksa leka i ciklodekstrina u industriji, može se koristiti i metod guste suspenzije, metod paste i metod ekstrudiranja (Del

Valle, 2004; Loftsson i Brewster, 2012). Razlika između ove tri metode je u količini prisutne vode u sistemu, koja se kasnije uklanja sušenjem. Pored ovih metoda, koriste se i tehnika vlažnog mešanja i zagrevanja, tokom koje se smeša ciklodekstrina i aktivne supstance u zapečaćenom kontejneru zagreva do temperature od oko 100 °C, kao i tehnika suvog mešanja, koja se uglavnom koristi za kompleksiranje uljastih i tečnih supstanci (Del Valle, 2004).

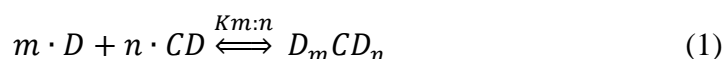
Zagrevanje suspenzije leka i ciklodekstrina tokom izrade kompleksa u laboratorijskim uslovima, ubrzava rastvaranje leka i rezultuje formiranjem superzasićenog rastvora leka tokom hlađenja do sobne temperature. Zagrevanje ne povećava samo rastvorljivost leka, već i rastvorljivost slabo rastvorljivih ciklodekstrina, što poboljšava kompleksaciju i skraćuje vreme potrebno za formiranje čvrstih kompleksa (Loftsson i Brewster, 2012).

2.2.5.1 Koprecipitacija

Koprecipitacija je metod izrade inkluzionih kompleksa koji se široko primenjuje u laboratorijskim uslovima. Ciklodekstrin se rastvara u vodi, a odgovarajući rastvor leka se dodaje rastvoru ciklodekstrina, koji se meša uz zagrevanje. Koncentracija ciklodekstrina u sistemu može biti visoka, čak i do 20 %. Hlađenjem sistema se formira talog, koji se sakuplja dekantovanjem, centrifugiranjem ili filtracijom. Glavni nedostatak ove tehnike je nemogućnost proizvodnje velikih količina kompleksa. Naime, zbog ograničene rastvorljivosti ciklodekstrina, potrebno je primeniti velike količine vode za njegovo rastvaranje, pa kapacitet suda za mešanje, vreme i potrebna energija za zagrevanje i hlađenje sistema značajno utiču na cenu postupka (Del Valle, 2004).

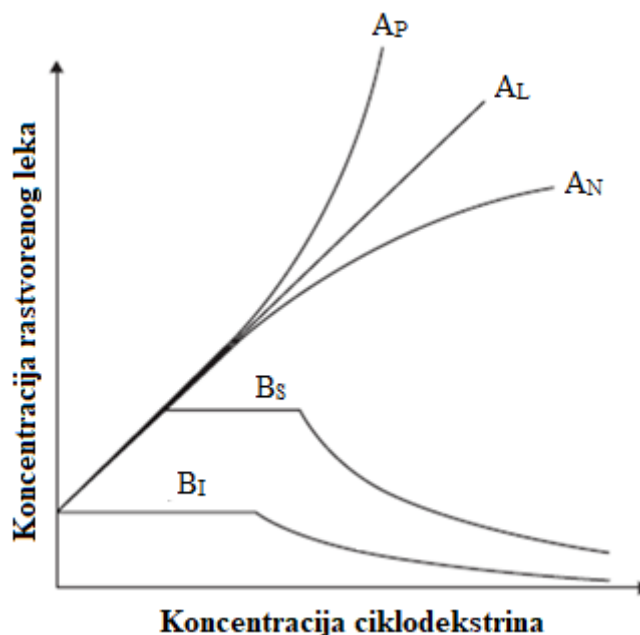
2.2.6 Stabilnost inkluzionih kompleksa – dijagrami fazne rastvorljivosti

Dve najvažnije karakteristike svakog kompleksa, koje određuju afinitet leka za ciklodekstrin, jesu njegova stehiometrija i numerička vrednost konstante stabilnosti kompleksa. Ako m molekula leka (D) reaguje sa n molekula ciklodekstrina (CD) i formira kompleks (D_mCD_n), to se može prikazati jednačinom reakcije:



pri čemu je $K_{m:n}$ konstanta stabilnosti kompleksa lek:ciklodekstrin. Stehiometrija i vrednost konstante stabilnosti kompleksa se mogu odrediti na osnovu dijagrama fazne rastvorljivosti, koji prati rastvorljivost leka u funkciji količine ciklodekstrina u kompleksacionom medijumu,

što je prikazano na slici 7 (Higuchi i Connors, 1965; Loftsson i Brewster, 2010; Loftsson i Brewster, 2012).



Slika 7. Dijagram fazne rastvorljivosti (preuzeto i prilagođeno iz Higuchi i Connors, 1965)

Linearni dijagram fazne rastvorljivosti (A_L tip) pokazuje da je kompleks prvog reda u odnosu na ciklodekstrin i prvog ili višeg reda u odnosu na lek. U ovom slučaju, prividna rastvorljivost leka, S_{tot} , data je izrazom:

$$S_{tot} = S_0 + m \frac{D_m}{CD} \quad (2)$$

pri čemu je S_0 rastvorljivost u vodenom medijumu za kompleksaciju. Ako jedan molekul leka formira u vodi rastvorljiv kompleks sa jednim molekulom ciklodekstrina (1:1 kompleks), onda se nagib linearnog dijagrama fazne rastvorljivosti može izračunati na osnovu izraza:

$$Nagib = \frac{S_0 K_{1:1}}{(S_0 K_{1:1} + 1)} \quad (3)$$

gde je $K_{1:1}$ konstanta stabilnosti kompleksa. Na osnovu ove jednačine može se izvesti izraz za izračunavanje vrednosti $K_{1:1}$:

$$K_{1:1} = \frac{nagib}{S_0 (1 - nagib)} \quad (4)$$

Pozitivno odstupanje od linearnosti (A_P tip) ukazuje na formiranje kompleksa višeg reda u odnosu na ciklodekstrin. A_N tip dijagrama se može objasniti promenama u kompleksacionom medijumu i samoasocijacijom molekula ciklodekstrina ili njihovih kompleksa pri većim koncentracijama ciklodekstrina. B_S tip dijagrama fazne rastvorljivosti ukazuje na formiranje kompleksa sa ograničenom rastvorljivošću u vodi, dok se B_I tip odnosi na formiranje

kompleksa koji se ne rastvara u kompleksacionom medijumu (Higuchi i Connors, 1965; Loftsson i Brewster, 2010).

Efikasnost kompleksacije (CE) je često bolja mera za poređenje solubilizacionih efekata različitih ciklodekstrina. Ukoliko je nagib dijagrama fazne rastvorljivosti manji od 1, efikasnost kompleksacije je moguće izračunati na osnovu sledeće jednačine:

$$CE = S_0 K_{1:1} = \frac{nagib}{1-nagib} \quad (5)$$

2.2.7 Oslobađanje aktivne supstance iz inkluzionog kompleksa

Nakon pripreme i sušenja dobijenog inkluzionog kompleksa, on je stabilan dugo ukoliko se čuva na sobnoj temperaturi i suvom mestu. Kada se kompleks nađe u vodenoj sredini, oslobađanje aktivne supstance se odvija u dva koraka. Prvo se kompleks rastvara, a zatim molekuli vode istiskuju aktivnu supstancu iz kompleksa (Del Valle, 2004). Dakle, glavna pokretačka sila za oslobađanje aktivne supstance iz kompleksa jeste razblaživanje, koje je brzo nakon intravenske primene leka, ali je donekle ograničeno u slučaju peroralno primenjenih kompleksa. Zbog toga, u formulacijama za oralnu primenu treba da bude dovoljno ciklodekstrina da se izvrši solubilizacija slabo rastvorljive aktivne supstance, a da prisutna količina ciklodekstrina ne dovede do smanjenja apsorpcije supstance na nivou digestivnog trakta (Loftsson i Brewster, 2010). Postoje i drugi mehanizmi oslobađanja aktivne supstance iz kompleksa, poput vezivanja supstance za proteine ili raspodele u tkivima i vezivanja za tkiva, i svi doprinose brzom oslobađanju supstance iz inkluzionog kompleksa (Loftsson i Brewster, 2010).

2.3 Hidrogelovi

2.3.1 Hidrogelovi – pojam i osobine

Hidrogelovi su slabo umreženi, hidrofilni polimerni materijali koji poseduju sposobnost vezivanja i zadržavanja velike količine vode ili bioloških tečnosti (Peppas, 2000), zahvaljujući tome što u svojoj strukturi sadrže hidrofilne grupe, poput hidroksilne, karboksilne, amidne ili sulfonatne grupe (Bajpai i sar., 2008). Predstavljaju homopolimere ili kopolimere i nerastvorljivi su u vodi zahvaljujući hemijskom ili fizičkom umrežavanju, koje obezbeđuje trodimenzionalnu, mrežastu strukturu i fizički integritet. Hidrogelovi liče na živa tkiva više od bilo koje druge klase sintetskih biomaterijala, pre svega zbog visokog sadržaja vode i mekane konzistencije, što doprinosi njihovoj biokompatibilnosti (Peppas i sar., 2000; Ratner i Hoffman, 1976). Pored toga, hidrogelovi mogu biti biodegradabilni, lako se sintetišu, imaju visoku efikasnost uklapanja različitih aktivnih supstanci i ćelija, i nisku toksičnost (Garg i sar., 2013), što ih čini pogodnim za primenu u različitim oblastima.

2.3.2 Klasifikacije hidrogelova

Postoji mnogo različitih parametara na osnovu kojih može biti izvršena klasifikacija hidrogelova, poput porekla, broja monomera koji učestvuju u sintezi, naelektrisanja bočnih grupa, fizičkih svojstava, načina umreženja (Mahinroosta i sar., 2018; Peppas i sar., 2000).

Prema poreklu, hidrogelovi se dele na prirodne, sintetičke i hibridne hidrogelove, koji predstavljaju kombinaciju prva dva tipa. Prirodni hidrogelovi se dobijaju umrežavanjem prirodnih polimera, poput polisaharida i proteina. Generalno gledano, hidrogelovi izrađeni od prirodnih polimera su netoksični, biodegradabilni i biokompatibilni (Chen i sar., 1995), ali obično nemaju dovoljnu mehaničku čvrstinu, dobra su podloga za razvoj mikroorganizama i mogu da pokrenu imuni odgovor organizma ili da izazovu zapaljenje (Bajpai i sar., 2008). S druge strane, sintetički hidrogelovi se jednostavno sintetišu u velikim količinama, tako da imaju određenu molekulsku masu i dobro definisanu strukturu, koja može biti modifikovana tako da se postignu biodegradabilnost i adekvatna mehanička svojstva (Bajpai i sar., 2008), ali mogu biti toksični i izazvati zapaljenske reakcije u organizmu (Li i Guan, 2011). Zbog toga se sintetišu hibridni hidrogelovi, koji objedinjuju prednosti prirodnih i sintetičkih hidrogelova, uz istovremeno prevazilaženje njihovih nedostataka.

Prema broju monomera, hidrogelovi mogu biti homopolimerni, kopolimerni i multipolimerni (Kalagasidis Krušić, 2007), dok prema prirodi i naelektrisanju bočnih grupa, hidrogelovi mogu biti neutralni i jonski (anjonski, katjonski i amfoliti).

Kako hidrogelovi predstavljaju polimerne mreže, jedna od značajnijih podela izvršena je na osnovu načina umreženja, pri čemu hidrogelovi mogu biti fizički ili hemijski umreženi. Fizički umreženi hidrogelovi nastaju usled fizičkih interakcija između različitih polimernih lanaca, poput hidrofobnih interakcija, agregacije, kristalizacije, kompleksacije polimernih lanaca i vodoničnih veza (Ullah i sar., 2015). Osnovne prednosti fizički umreženih hidrogelova su relativno jednostavna proizvodnja i nekorišćenje umreživača prilikom njihove sinteze (Varaprasad i sar., 2017). Fizički umreženi hidrogelovi se nazivaju i reverzibilnim, jer nastaju usled konformacionih promena (Ullah i sar., 2015). Hemijski umreženi hidrogelovi nastaju usled kovalentnog povezivanja monomera u polimerne lance i dalje različitih polimernih lanaca međusobno. Nazivaju se još i ireverzibilnim hidrogelovima, jer nastaju zbog konfiguracionih promena (Ullah i sar., 2015).

U poslednje vreme, posebno značajna jeste podela hidrogelova prema njihovoj reakciji na promenu uslova spoljašnje sredine, pri čemu postoje konvencionalni hidrogelovi, koji ne reaguju na spoljašnje stimulanse, i hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse, odnosno „inteligentni“ hidrogelovi.

2.3.3 Hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse

Hidrogelovi osetljivi na stimulanse imaju sposobnost da odgovore na malu promenu uslova spoljašnje sredine drastičnom promenom bubrenja, strukture mreže, permeabilnosti ili mehaničkih svojstava (Peppas, 1991; Peppas i sar., 2000). Različiti hidrogelovi mogu reagovati na različite stimulanse, poput temperature, polarnosti rastvarača, pH vrednosti, naelektrisanja, svetlosti, električnog polja, prisustva određenih biomolekula, kao što su enzimi i receptori, ili na njihovu kombinaciju (Koettong i sar., 2015; Shibayama i Tanaka, 1993).

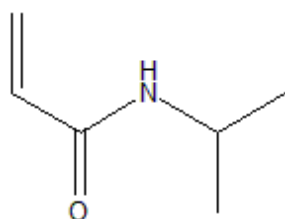
2.3.3.1 Temperaturno-osetljivi hidrogelovi

Temperaturno-osetljivi hidrogelovi privlače veliku pažnju zbog sposobnosti da bubre i kontrahuju se usled promene temperature okolnog fluida, pri čemu mogu biti negativno termoosetljivi, pozitivno termoosetljivi i termoreverzibilni. Zajednička karakteristika svih

termoosetljivih polimera je prisustvo hidrofobnih grupa u strukturi, poput metil, etil ili propil grupa (Qiu i Park, 2012). U sastav termoosetljivih hidrogelova obično ulaze p(NIPAM) i njegovi različiti kopolimeri, poli(*N,N*-dietilakrilamid), poli(dimetilaminoetil-metakrilat), poli(*N*-(*L*)-(1-hidroksimetil)propilmetakrilamid), a najpoznatiji termoreverzibilni hidrogelovi su PEO-PPO-PEO triblok kopolimeri, koji su izgrađeni od centralnog, hidrofobnog polipropilenoksidnog dela (PPO) i spoljašnjih, hidrofilnih polietilenoksidnih delova (PEO).

Temperaturno-osetljivi polimeri su možda najviše ispitivana klasa polimera osetljivih na spoljne stimulanse za primenu u sistemima za isporuku lekova. Primena temperature kao signala je opravdana činjenicom da se temperatura tela menja u prisustvu različitih patogena i pirogena, odnosno u stanjima poput infekcija i zapaljenja. Zbog toga, promena temperature može biti koristan stimulan za početak oslobađanja terapijskog agensa iz različitih temperaturno-osetljivih sistema za isporuku antimikrobnih i antiinflamatornih lekova.

Jedan od najrelevantnijih termoosetljivih polimera za primenu u biomedicini je p(NIPAM), zbog toga što nije citotoksičan, već stimuliše rast ćelija, biokompatibilan je sa tkivima, zadovoljavajućih je mehaničkih svojstava i ima sposobnost jednostavnog povezivanja sa drugim polimerima (Ashraf i sar., 2016). Sastoji se od monomera NIPAM-a, koji sadrži hidrofilne amidne grupe i hidrofobne izopropil grupe u strukturi (slika 8).



Slika 8. Struktura monomera NIPAM-a

Linearni p(NIPAM) poseduje oštru donju kritičnu temperaturu rastvora (LCST, *lower critical solution temperature*) na oko 32 °C (de Oliveira i sar., 2017). Oštar fazni prelaz linearnog p(NIPAM)-a nastaje usled konformacionih promena i posledica je otpuštanja strukturiranih molekula vode oko polimernog lanca (Schild, 1992). Ispod ove temperature, polimer je u hidratisanom stanju i dobro rastvorljiv, dok iznad LCST postaje hidrofobniji usled narušavanja vodoničnih veza, što vodi promeni rastvorljivosti i agregaciji polimera (Constantin i sar., 2011).

Kod umreženih hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a govorimo o takozvanoj temperaturi zapreminskog faznog prelaza (VPTT, *volume phase transition temperature*). Na

temperaturama ispod VPTT, favorizovano je formiranje vodoničnih veza između amidnih grupa i molekula vode, zbog čega hidrogel vezuje velike količine vode i bubre. Sa povećanjem temperature, vodonične veze slabe, a jačaju interakcije između hidrofobnih grupa, što vodi oslobađanju molekula vode iz strukture hidrogela. Istovremeno dolazi do naglog kolapsa polimernih lanaca i zapreminskog faznog prelaza (Bandyopadhyay i sar., 2017; Constantin i sar., 2011). Dakle, LCST se odnosi na linearne polimere, dok je VPTT karakteristika umreženih polimernih hidrogelova, koji u prisustvu vode bubre, ali se ne rastvaraju, odnosno sve vreme su dvofazni sistemi (Mah i Ghosh, 2013).

Na osnovu VPTT, hidrogelovi se mogu podeliti na hidrogelove sa pozitivnim i negativnim zapreminskim faznim prelazom. Hidrogelovi sa pozitivnim zapreminskim faznim prelazom se nazivaju i termofilni hidrogelovi, jer zagrevanjem bubre, pri čemu povećavaju svoju zapreminu, dok se hidrogelovi sa negativnim zapreminskim faznim prelazom ili termofobni hidrogelovi sa porastom temperature kontrahuju, smanjujući svoju zapreminu (Mah i Ghosh, 2013). p(NIPAM) spada u hidrogelove sa negativnim zapreminskim faznim prelazom (Mah i Ghosh, 2013), pri čemu VPTT p(NIPAM)-a iznosi 33-35°C (Means i sar., 2017), što je više od LCST, koja je karakteristična za linearni polimer u vodenom rastvoru (Haq i sar., 2017). VPTT p(NIPAM) hidrogela je veoma bliska fiziološkoj temperaturi ljudskog organizma (36-37°C), što je jedan od razloga za primenu hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a kao nosača različitih aktivnih supstanci.

2.3.4 Dobijanje hidrogelova

Primenjeni metod dobijanja hidrogelova zavisi, pre svega, od načina umreženja koji se želi postići. Naime, prilikom sinteze hemijski umreženih hidrogelova dolazi do formiranja kovalentnih veza između polimernih lanaca, dok se kod fizički umreženih hidrogelova između različitih polimernih lanaca uspostavljaju fizičke interakcije. Hemijski umreženi hidrogelovi se mogu dobiti reakcijama slobodno radikalske polimerizacije, polikondenzacije i reakcijama sa enzimima (Akhtar i sar., 2016), dok fizički umreženi hidrogelovi uglavnom nastaju spontano pod odgovarajućim uslovima.

2.3.4.1 Sinteza hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a

p(NIPAM) može biti sintetisan primenom različitih tehnika, pre svega, slobodno-radikalskom polimerizacijom u organskim rastvaračima, redoks polimerizacijom u vodenoj

sredini i polimerizacijom primenom jonskih inicijatora (Schild, 1992). Slobodno-radikalna polimerizacija uključuje primenu slobodno-radikalnog inicijatora, poput 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) ili benzoil-peroksida (BP) (Ilić-Stojanović i sar., 2011), koji podleže termalnoj ili UV degradaciji i reaguje sa monomerom koji sadrži dvostruku vezu (Najafi i sar., 2018), poput NIPAM-a. Prednosti slobodno-radikalne polimerizacije uključuju jednostavnu kontrolu reakcionih uslova, primenu netoksičnih rastvarača, a sama metoda je pogodna za sintezu najrazličitijih polimera. Ipak, ova metoda ima i izvesne nedostatke, poput nemogućnosti za adekvatnu kontrolu veličine čestica, stepena polimerizacije, polidisperzitetu i mikrostrukture polimera (Lanzalaco i Armelin, 2017).

Pored ovih metoda, za sintezu termoosetljivih hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a, koristi se i polimerizacija zračenjem, uz primenu kobalt-60 gama-zraka (Nagaoka i sar., 1993) ili snopa elektrona (Panda i sar., 2000), kao energetskih izvora. Novije metode sinteze p(NIPAM) hidrogelova različite molekulske mase uključuju primenu mikrotalasnog zračenja (Zhao i sar., 2008), ultrazvuka u vodenoj sredini, u odsustvu bilo kakvog hemijskog inicijatora (Teo i sar., 2010), kao i destilaciono-precipitacionu polimerizaciju u etanolu (Jadhav i sar., 2016). Primena mikrotalasa značajno skraćuje vreme potrebno za sintezu p(NIPAM) hidrogela, povećava prinos hidrogela, pri čemu se dobijaju poroznije strukture sa većim kapacitetom bubrenja (Zhao i sar., 2008).

2.3.5 Bubrenje hidrogelova

Hidrogelovi mogu apsorbovati veliku količinu vode ili bioloških tečnosti zahvaljujući prisustvu hidrofilnih grupa u njihovoj strukturi, pri čemu bubre i povećavaju svoju težinu i više stotina puta. Proces bubrenja hidrogelova podrazumeva difuziju molekula vode kroz matriks, opuštanje polimernih lanaca usled hidratacije, koje je dalje praćeno bubrenjem polimernih lanaca (Ganji i sar., 2010). Molekuli vode u kontaktu sa hidrogelom u suvom stanju prvo hidratišu polarne hidrofilne grupe, što predstavlja „primarno vezanu vodu“. Nakon hidratacije, gel bubri, što omogućava interakciju molekula vode sa nepolarnim hidrofobnim grupama („sekundarno vezana voda“). Sila osmotskog pritiska rastvarača omogućava dalji ulazak molekula vode u polimerni matriks („slobodna voda“), što dovodi do ekspanzije polimernih lanaca. Hidrogel dostiže ravnotežno bubrenje kada se osmotski pritisak izjednači sa elastičnim silama koje teže da rastegnute polimerne lance vrata u prvobitni položaj (Hoffman, 2012).

Na bubrenje hidrogelova utiče nekoliko faktora, poput osobina polimerne mreže, pre svega, stepena umreženja i hemijske strukture monomera, ali i naelektrisanja, koncentracije i pKa vrednosti jonizibilnih grupa i stepena jonizacije (Mahinroosta i sar., 2018), i karakteristika medijuma u kome se bubrenje odvija (pH vrednost, temperatura). Stepenn umreženja je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na bubrenje hidrogelova, a predstavlja odnos molova umreživača i molova monomera. Što je veći stepen umreženja, više je umreživača inkorporirano u strukturu hidrogela, što ukazuje na čvršću strukturu hidrogela, manju pokretljivost polimernih lanaca i, samim tim, manji stepen bubrenja (Peppas i sar., 2000). Hemijska struktura monomera takođe utiče na stepen bubrenja hidrogelova, pri čemu hidrogelovi sa više hidrofobnih grupa imaju manji stepen bubrenja, jer hidrofobne grupe kolabiraju u prisustvu vode usled težnje da na najmanju moguću meru svedu kontakt sa molekulima vode (Peppas i sar., 2000).

Stepen bubrenja (α) se definiše kao odnos mase apsorbovane vode i mase suvog gela, a računa se prema jednačini 6:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (6)$$

pri čemu je: m_0 – masa suvog gela, a m – masa nabubrelog gela u vremenu t .

2.3.5.1 Mehanizam transporta fluida

Za određivanje mehanizma transporta fluida, koristi se jednostavna empirijska jednačina 7, koja važi uz uslov $M_t/M_e < 0,6$:

$$\frac{M_t}{M_e} = k \cdot t^n \quad (7)$$

pri čemu je: M_t – masa apsorbovanog fluida u vremenu t , M_e – masa apsorbovanog fluida u ravnotežnom stanju, k – konstanta bubrenja, karakteristična za određeni tip polimerne mreže, a n – difuzioni eksponent.

Empirijska jednačina 7 se koristi da bi se opisalo kontrolisano oslobađanje rastvora iz polimernih nosača, pri čemu je pokazano da ova jednačina adekvatno opisuje oslobađanje leka i rastvora iz tankih ploča, sfera, cilindara i diskova, bez obzira na mehanizam oslobađanja (Li i Mooney, 2016). Jednačina 7 predstavlja eksponencijalnu funkciju količine oslobođenog leka od vremena oslobađanja, pri čemu vrednost difuzionog ekponenta n ukazuje na mehanizam oslobađanja. Tako, ukoliko je $n = 0,5$, dominantan mehanizam transporta je Fick-ova difuzija, pri čemu je brzina transporta tečnosti u gel manja od brzine relaksacije polimernih lanaca (Ganji i sar., 2010). Kada je $0,5 < n < 1$, transport je anomalan,

odnosno reč je o ne-Fick-ovoj difuziji. Za vrednosti $n = 1$, transport fluida (slučaj II) je kontrolisan relaksacijom polimernih lanaca. Postoji i četvrti slučaj (Super slučaj II), kada je $n > 1$, a transport je takođe kontrolisan relaksacijom (Ganji i sar., 2010; Ritger i Peppas, 1987).

Koeficijent difuzije fluida u hidrogel se najčešće određuje na osnovu jednačine 8, koja u obzir uzima samo početnu fazu bubrenja (prvih 60%) tokom koje debljina polimernog nosača ostaje praktično nepromenjena (Wang i sar., 2008):

$$\frac{M_t}{M_e} = 4 \left(\frac{D t}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (8)$$

pri čemu D predstavlja koeficijent difuzije (cm^2/min), a l debljinu suvog hidrogela (cm).

Logaritmovanjem jednačine 8, dobija se pravolinijska zavisnost $\ln(M_t/M_e)$ od $\ln t$ (jednačina 9), iz čijeg nagiba se izračunava D .

$$\ln \left(\frac{M_t}{M_e} \right) = \frac{4D^{1/2}}{\pi^{1/2}l} + \frac{1}{2} (\ln t) \quad (9)$$

2.3.6 Primena hidrogelova

Zbog biokompatibilnosti, dobre permeabilnosti za kiseonik, inertnosti i male težnje ka adsorpciji proteina i adheziji ćelija, pogodnih fizičkih osobina, mekoće i mikroporozne strukture, minimalne iritacije tkiva, mogućnosti inkorporiranja različitih aktivnih supstanci, visokog sadržaja vode koja štiti inkorporirane aktivne supstance i obezbeđuje pogodnu sredinu za biološke interakcije na molekularnom nivou, i mogućnosti jednostavne površinske modifikacije (Montoro i sar., 2014; Ulijn i sar., 2007), hidrogelovi predstavljaju važne biomaterijale za primenu u medicini i farmaciji. Stoga, hidrogelovi se koriste kao nosači u sistemima za isporuku lekova (Qiu i Park, 2012), dijagnostici (Vellekoop i Puchberger, 2018), inženjerstvu tkiva (Liu i sar., 2018) i zarastanju rana (Boateng i sar., 2008; Kamoun i sar., 2017), kao i u izradi kontaktnih sočiva i implantata (Kopeček, 2009), biosenzora (Guisseppi-Elie, 2010; Tavakoli i Tang, 2017) i veštačke kože (Young i sar., 1998). Pored toga, hidrogelovi se koriste u razvoju nove generacije pametnih materijala, poput nanokompozitnih hidrogelova, koji kombinuju biokompatibilnost hidrogelova sa mehaničkim, optičkim, magnetnim i električnim karakteristikama nanopunilaca, a imaju primenu u isporuci lekova i inženjerstvu tkiva (Song i sar., 2015).

2.3.6.1 Primena hidrogelova u dijagnostici i isporuci lekova

Odlične strukturne osobine hidrogelova, visok sadržaj vode, fluidne transportne osobine i biokompatibilnost čine ih pogodnim za primenu u dijagnostici, kao nosača kontrastnih sredstava. Uvođenje funkcionalnih grupa, bilo u unutrašnjosti ili na površini hidrogelova, čini mogućim inkorporiranje i/ili vezivanje različitih boja, signalnih molekula ili neorganskih nanočestica (Mahinroosta, 2018). Inkorporiranjem magnetnih čestica gvožđeoksida u umrežene nanogelove postiže se njihova bolja koloidna stabilnost i disperzibilnost u vodi (Choo i sar., 2011).

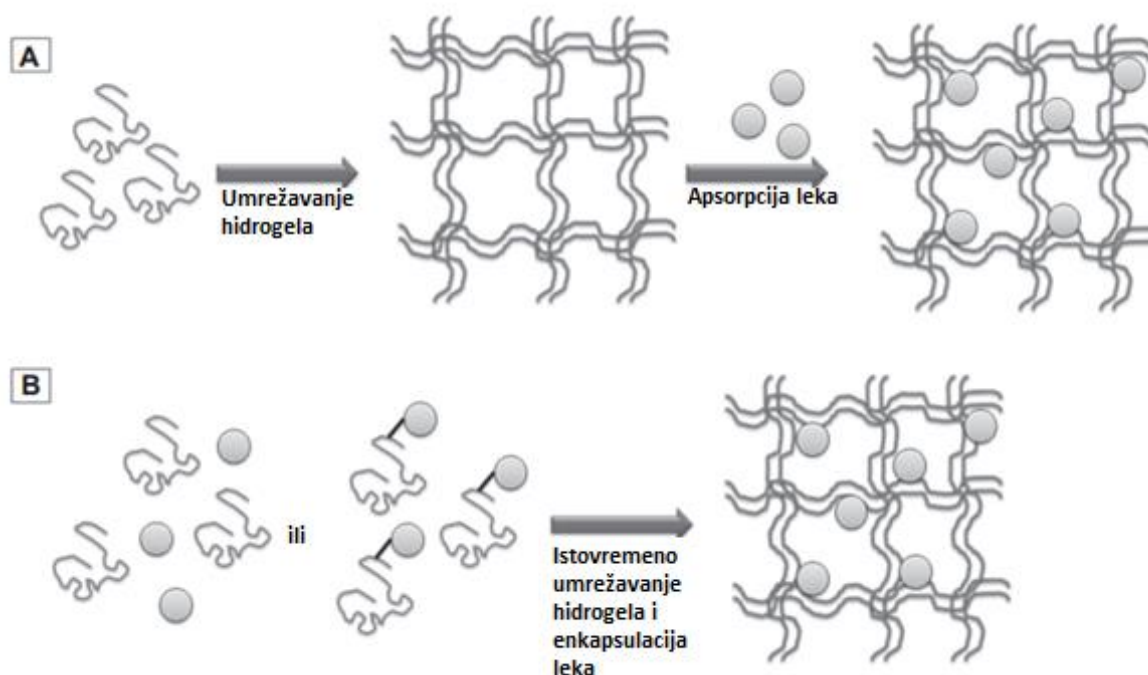
Hidrogelovi nalaze široku primenu u razvoju inteligentnih sistema za isporuku različitih aktivnih supstanci, od lekova male molekulske mase do makromolekula, poput peptida i proteina. Prednosti hidrogelova kao nosača farmakološki aktivnih supstanci ogledaju se u činjenici da lekovi mogu lako da difunduju kroz hidrogelove, pri čemu brzina oslobađanja leka može biti kontrolisana promenom stepena umreženja, korišćenjem monomera određene hidrofilnosti ili, pak, podešavanjem odnosa hidrofilnih i hidrofobnih monomera. Hidrogelovi omogućuju kontrolisano oslobađanje leka tokom dužeg vremenskog perioda. U poređenju sa hidrofobnim nosačima, hidrogelovi manje interaguju sa lekovima, zbog čega je veća frakcija leka dostupna za oslobađanje (Montoro i sar., 2014). Takođe, zbog jedinstvenih osobina, hidrogelovi se mogu koristiti za peroralnu, subkutanu, transdermalnu, okularnu i rektalnu primenu.

2.3.6.2 Struktura hidrogelova

Pogodnost hidrogela za primenu kao nosača aktivnih supstanci zavisi u velikoj meri i od njegove strukture. Najvažniji parametri koji se koriste za karakterizaciju strukture hidrogelske mreže su: zapreminska frakcija polimera u nabubrelom stanju, molekulska masa polimernih lanaca između dve susedne tačke umreženja i veličina pore hidrogelske mreže (Peppas i sar., 2000), na osnovu koje hidrogelovi mogu biti podeljeni na superporozne, makroporozne, mikroporozne i neporozne hidrogelove (Ganji i sar., 2010). Prvi parametar je mera količine fluida koju hidrogel može da upije i zadrži. Drugi parametar je mera stepena umreženja polimera, a treći predstavlja meru prostora između dva makromolekularna lanca dostupnog za difuziju leka. Ovi međusobno povezani parametri mogu biti određeni kako teorijski, tako i različitim eksperimentalnim tehnikama, pre svega metodom ravnotežnog bubrenja (Ganji i sar., 2010; Peppas i sar., 2000).

2.3.6.3 Inkorporiranje leka u hidrogel

Mehanizam inkorporiranja leka u hidrogel je blisko povezan sa procesima bubrenja i kontrahovanja hidrogelova, pri čemu lek može biti inkorporiran u hidrogel nakon ili u toku polimerizacije (*in situ*) (Lin i Metters, 2006). U prvom slučaju, suvi hidrogel se uroni u rastvor leka određene koncentracije, pa lek procesom difuzije ulazi u gel zajedno sa okolnim fluidom, pri čemu gel bubri (slika 9). Pri tome treba voditi računa o koncentraciji leka u rastvoru, koja ne sme biti prevelika, jer to može povećati viskozitet rastvora i usporiti difuziju leka unutar gela. Kod *in situ* inkorporiranja leka, formiranje hidrogelske mreže i enkapsulacija leka se odvijaju istovremeno. Uslovi pod kojima se odvija polimerizacija mogu imati negativne efekte na karakteristike leka i otežati prečišćavanje polimernog nosača (Barbucci i sar., 2018).



Slika 9. Inkorporiranje leka u hidrogel nakon (A) i u toku (B) polimerizacije (preuzeto i prilagođeno iz Lin i Metters, 2006)

Količina leka koja može biti uklopljena u hidrogel zavisi od nekoliko parametara, poput veličine molekula leka, naelektrisanja leka i gela, afiniteta leka za gel, stepena bubrenja i stepena umreženja hidrogela (Barbucci i sar., 2018; Lee i Lee, 2007).

2.3.6.4 Oslobađanje leka iz hidrogela

Zbog hidrofilnosti i visokog sadržaja vode, mehanizmi oslobađanja leka iz hidrogela se u mnogome razlikuju od oslobađanja leka iz hidrofobnih polimernih nosača. Oslobađanje leka iz hidrogela može biti kontrolisano difuzijom, bubrenjem ili hemijski kontrolisano (Lin i Metters, 2006). Difuzijom kontrolisano oslobađanje je najčešći mehanizam oslobađanja leka iz hidrogela. Bubrenjem kontrolisano oslobađanje leka se dešava kada je difuzija leka brža od bubrenja hidrogela. Kod hemijski kontrolisanog mehanizma, oslobađanje leka zavisi od reakcija koje se dešavaju unutar hidrogelskog matriksa, kao što su hidrolitička ili enzimska degradacija polimernih lanaca ili reakcije između polimerne mreže i leka. Brzina oslobađanja i količina oslobođenog leka iz hidrogela zavise od stepena bubrenja i gustine umreženja hidrogela, kao i od osobina samog leka, poput molekulske mase i naelektrisanja (Lee i Lee, 2007). Hidrogel na bazi p(NIPAM)-a brzo smanjuje zapreminu, što rezultira dvofaznim oslobađanjem leka, odnosno, inicijalno brzo oslobađanje aktivne supstance, praćeno je znatno sporijim, kontrolisanim oslobađanjem (Ashraf i sar., 2016).

2.3.6.5 Primena hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a

Zbog termoosetljivosti i brzog zapreminskog faznog prelaza, hidrogelovi na bazi p(NIPAM)-a od posebnog su interesa kao nosači različitih antimikrobnih, antiinflamatornih i antipiretičkih aktivnih supstanci. Kopolimerni hidrogel na bazi NIPAM-a i dekstrana je iskorišćen kao nosač za kontrolisano oslobađanje ornidazola i ciprofloksacina (Das i sar., 2015), dok su nanočestice izrađene od hidrogela na bazi NIPAM-a, akrilne kiseline i hidroksietil-metakrilata formulisane tako da se postigne kontrolisano oslobađanje amoksicilina (Moogooee i sar., 2011). Kopolimerni hidrogelovi p(NIPAM)-a sa želatinom (Manjula i sar., 2014), metakrilnom kiselinom (Zafar i sar., 2014) ili alil-aminom (James i sar., 2011) mogu biti iskorišćeni kao nosači za nanočestice srebra, koje imaju primenu u antimikrobnoj terapiji rana i opekotina. Kopolimerni hidrogelovi NIPAM-a sa 2-hidroksipropil-metakrilatom su ispitivani kao nosači za kontrolisano oslobađanje paracetamola (Ilić-Stojanović i sar., 2011), fenacetina (Ilić-Stojanović i sar., 2012) i ibuprofena (Ilić-Stojanović i sar., 2013).

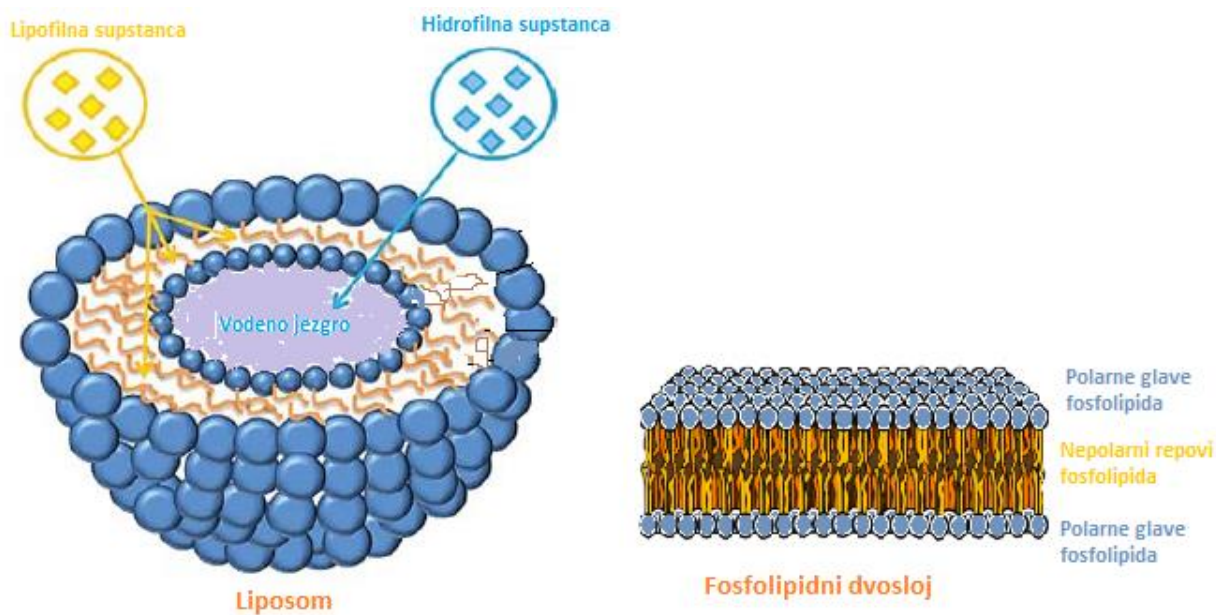
Lee i Lee su sintetisali hibridne hidrogelove na bazi NIPAM-a i želatina umreženih glutaraldehidom ili genipinom kako bi ispitali uticaj sadržaja želatina i vrste umreživača na uklapanje i oslobađanje sulfanilamida iz hibridnih hidrogelova (Lee i Lee, 2007). Pokazano je

da sa povećanjem sadržaja želatina opada stepen bubrenja hidrogela, pri čemu hidrogelovi umreženi glutaraldehydom imaju veći stepen bubrenja od hidrogelova umreženih genipinom. Količina uklopljenog sulfanilamida raste sa povećanjem sadržaja želatina, pri čemu je to izraženije kod hidrogelova umreženih glutaraldehydom. Sa druge strane, sadržaj oslobođenog sulfanilamida se smanjuje sa povećanjem sadržaja želatina u hibridnom hidrogelu. Lee i Huang su ispitivali oslobađanje sulfanilamida, kao model-leka, iz kopolimernog hidrogela na bazi NIPAM-a, glicidil-metakrilata (GMA) i *N,N*-dimetil-akrilamida (DMA) (Lee i Huang, 2008), i pokazali da količina oslobođenog sulfanilamida raste sa smanjenjem molarnog odnosa GMA/DMA, jer jačina veza između leka i hidrogela zavisi od sadržaja GMA, čije epoksi grupe mogu da reaguju sa amino grupama sulfanilamida i omogućće jače vezivanje leka za hidrogel. Lee i Cheng su ispitivali uticaj sadržaja monomera na oslobađanje sulfanilamida i svojstva biodegradabilnog hidrogela na bazi NIPAM-a, akrilne kiseline i poli(kaprolakton)-diakrilata (Lee i Cheng, 2013). Pokazano je da količina uklopljenog sulfanilamida opada sa povećanjem sadržaja akrilne kiseline, zbog većeg afiniteta hidrogela za vodu, nego za sulfanilamid. Sa druge strane, količina oslobođenog sulfanilamida se povećava čak 4 puta sa povećanjem sadržaja akrilne kiseline od 0 do 50%, jer oslobađanje leka zavisi prvenstveno od stepena bubrenja, koji takođe raste sa povećanjem sadržaja akrilne kiseline, zbog jače sposobnosti hidratacije karboksilnih grupa akrilne kiseline.

2.4 Liposomi

2.4.1 Pojam i klasifikacija liposoma

Liposomi su sferne, vezikularne strukture, koje se sastoje iz jednog ili više koncentričnih lipidnih dvoslojeva (lamela, membrana), koji okružuju vodeno jezgro (FDA, 2018; Laouini i sar., 2012; Vemuri i Rhodes, 1995). Lipidni dvoslojevi su po strukturi slični biološkim membranama, a sastoje se iz gusto pakovanih molekula prirodnih i/ili sintetskih fosfolipida čije su polarne glave okrenute ka spoljašnjosti, a nepolarni repovi ka unutrašnjosti dvosloja, i holesterola (Bergstrand, 2003). Fosfolipidi koji ulaze u sastav liposoma su biokompatibilni, biodegradabilni i neimunogeni, a najčešće korišćeni su fosfatidilholin (lecitin), fosfatidiletanolamin, fosfatidilglicerol i njihovi derivati (Gharib i sar., 2015, Laouini i sar., 2012). Holesterol povećava stabilnost i fluidnost dvoslojeva, uz istovremeno smanjenje njihove permeabilnosti za hidrosolubilne molekule (Vemuri i Rhodes, 1995). Šematski prikaz liposoma i fosfolipidnog dvosloja dat je na slici 10.



Slika 10. Šematski prikaz strukture liposoma i fosfolipidnog dvosloja (preuzeto i prilagođeno iz Laouini i sar., 2012)

Liposomi se mogu podeliti na više različitih načina: prema veličini, broju lipidnih dvoslojeva, načinu izrade, i slično (Laouini i sar., 2012; Vemuri i Rhodes, 1995). Veličina

liposoma i broj lipidnih dvoslojeva utiču na stepen enkapsulacije aktivne supstance unutar liposoma, a na osnovu ovih karakteristika, liposomi se dele na:

- male unilamelarne vezikule (SUV), veličine 20-100 nm,
- velike unilamelarne vezikule (LUV), veličine preko 100 nm,
- ogromne unilamelarne vezikule (GUV), veličine preko 1000 nm,
- oligolamelarne vezikule (OLV), veličine 100-500 nm, i
- multilamelarne vezikule (MLV), veličine preko 500 nm.

Pored liposoma različite lamelnosti, postoje i multivezikularne vezikule (MVV) (Kim i sar., 1983; Talsma i sar., 1987) i dvostruki liposomi (Yamabe i sar., 2003), koji su pogodni za enkapsulaciju hidrofilnih supstanci, poput citarabina (Yingchoncharoen i sar., 2016), i omogućavaju oralnu primenu vakcina (Ogue i sar., 2006) i peptidnih lekova, kao što je insulin (Katayama i sar., 2003).

Liposomi se mogu podeliti i prema sastavu i mehanizmu isporuke aktivnih supstanci na: konvencionalne, pH osetljive, katjonske, imunoliposome i dugocirkulišuće liposome (Sharma i Sharma, 1997).

2.4.2 Osobine liposoma: prednosti i nedostaci

Liposomi su često korišćeni nanonosai upravo zbog činjenice da unutar liposoma mogu biti inkorporirane kako hidrofilne, tako i lipofilne supstance. Lipofilne supstance bivaju gotovo u potpunosti ugrađene u lipidni dvosloj, dok se hidrofilne supstance raspoređuju u vodenoj fazi unutar liposoma (Kanasova i Nesmerak, 2017). Amfifilne supstance se, u zavisnosti od vrednosti particionog koeficijenta, raspodeljuju između lipidne i vodene faze (Gulati i sar., 1998; Immordino i sar., 2006).

Liposomi se smatraju dobrim nosačima aktivnih supstanci, pre svega zbog sposobnosti da povećaju rastvorljivost i stabilnost supstance, omoguće isporuku supstance na ciljno mesto delovanja i produže njeno oslobađanje (Laouini i sar., 2012; Lašić, 1998). Liposomi imaju veliku efikasnost enkapsulacije bez obzira na rastvorljivost supstance, malu toksičnost, štite supstancu od enzimske degradacije, kao i od degradacije inicirane dejstvom faktora iz spoljašnje sredine (pH, svetlost) tokom čuvanja i primene preparata, i smanjuju iritaciju osetljivih tkiva (Kanasova i Nesmerak, 2017; Laouini i sar., 2012).

Ipak, liposomi imaju i izvesne nedostatke. Pre svega, proizvodnja liposoma je skupa i teško je postići dobru reproducibilnost postupka izrade, što se naročito odnosi na veće serije

liposoma (Kanasova i Nesmerak, 2017). Takođe, liposomi su termodinamički nestabilni sistemi, zbog čega je moguća fuzija manjih liposomskih vezikula u veće, što može biti praćeno izlaskom aktivne supstance („curenje“) iz liposoma. Pored toga, liposomi mogu interagovati sa lipoproteinima iz krvi, aktivirati imuni sistem i biti preuzeti od strane ćelija retikulo-endotelnog sistema (RES), što skraćuje vreme zadržavanja liposoma u cirkulaciji, a može imati i neželjene efekte (Bergstrand, 2003; Lian i Ho, 2001). Neki od navedenih nedostataka danas su prevaziđeni. Tako, na primer, vreme zadržavanja liposoma u cirkulaciji može biti produženo oblaganjem liposoma polietilenglikolom, čime se usporava njihovo preuzimanje od strane makrofaga (Gabizon i sar., 2003).

2.4.3 Izrada liposoma

Različite vrste liposoma mogu biti pripremljene različitim metodama, što ukazuje na postojanje nekoliko različitih mehanizama prilikom formiranja liposoma (Lasch i sar., 2003). Ipak, osnovni princip na kome se zasniva formiranje liposoma, bez obzira na način izrade, jeste postojanje hidrofilnih i hidrofobnih interakcija između samih molekula lipida, kao i između molekula lipida i vode. Pritom, primena izvesne količine energije, bilo za mućkanje, zagrevanje ili homogenizaciju, dovodi do uređivanja lipidnih molekula u dvoslojeve sfernog oblika, čime se postiže termodinamička ravnoteža i nastaju liposomi (Mozafari, 2005).

Do danas su razvijene brojne tehnike izrade liposomskih vezikula, ali je svega nekoliko njih omogućilo da se značajna količina supstance inkorporira i zadrži unutar liposoma (Vemuri i Rhodes, 1995), pre svega, metoda reverzno-fazne evaporacije (Szoka i Papahadjopoulos, 1978) i metoda injektiranja rastvarača (etanola ili etra) (Deamer i Bangham, 1976). U konvencionalne metode spadaju i metoda hidratacije tankog lipidnog filma (Bangham i sar., 1965) i dijaliza deterdženta korišćenog za rastvaranje lipida (Zumbuehl i Weder, 1981).

Konvencionalne metode izrade liposoma uključuju nekoliko faza: rastvaranje lipida u organskom rastvaraču, odvajanje lipida od organskog rastvarača sušenjem, dispergovanje lipida u vodenom medijumu, prečišćavanje dobijenih liposoma i analizu finalnog proizvoda (Lasch i sar., 2003; Mozafari, 2005), a razlikuju se prema načinu odvajanja lipida od organskog rastvarača i naknadnom redispergovanju lipida u vodenom medijumu.

2.4.3.1 Metoda hidratacije tankog lipidnog filma

Metoda hidratacije tankog lipidnog filma, takozvana *Bangham* metoda, je inicijalno korišćena za dobijanje liposoma. Lipidi se rastvore u organskom rastvaraču, a zatim se organski rastvarač ukloni evaporacijom pod sniženim pritiskom. Na kraju, tanak lipidni film formiran na zidovima suda se hidratiše dodavanjem puferskog rastvora uz mešanje na temperaturi iznad temperature faznog prelaza lipida. Ovo je jednostavna metoda kojom se dobijaju pretežno MLV liposomi (Bangham i sar., 1965; Laouini i sar., 2012). Postupak izrade, vreme trajanja hidratacije i debljina lipidnog filma značajno utiču na karakteristike formiranih liposoma (Vemuri i Rhodes, 1995). Dobijanje uniformnih liposoma manje veličine vrši se primenom ultrazvuka ili ekstrudiranjem kroz polikarbonatne filtere (Milenković i sar., 2013).

Konvencionalne metode izrade liposoma uključuju primenu velikih količina organskih rastvarača, toksičnih za životnu sredinu i čoveka, koji moraju biti uklonjeni iz finalnog proizvoda. Ove metode se sastoje iz mnogo koraka i zahtevaju primenu velike količine energije, što otežava proizvodnju većih serija liposoma. Kako je industrijska proizvodnja liposoma postala realnost i potreba, razvijene su nove tehnike za proizvodnju većih količina liposoma, poput tehnike zagrevanja, sušenja raspršivanjem, sušenja zamrzavanjem, superkritične reverzno-fazne evaporacije i nekoliko veoma atraktivnih, modifikovanih tehnika injektiranja etanola, poput tehnike ukrštenog injektiranja, mikrofluidizacije i tehnike primene membranskog kontaktora (Laouini, 2012).

2.4.4 Karakterizacija liposoma

U cilju procene kvaliteta izrađenih liposoma i poređenja različitih serija neophodno je praćenje pojedinih fizičkih i hemijskih parametara kako bi se osigurala reproducibilnost postupka izrade i postiglo željeno dejstvo liposoma. Parametri od značaja prilikom karakterizacije liposoma su: prosečna veličina i distribucija veličine liposoma, oblik liposoma i indeks polidisperznosti, površinsko naelektrisanje, efikasnost enkapsulacije, odnos fosfolipida i leka, lamelarnost i stabilnost liposoma (Kanasova i Nesmerak, 2017; Laouini i sar., 2012).

Prosečna veličina i distribucija veličine liposoma su od posebne važnosti, jer utiču na ponašanje liposoma u organizmu (Chrai i sar., 2001) i mogu imati ulogu u razvoju imunskih reakcija (Kanasova i Nesmerak, 2017). Vezivanje serumskih proteina opsonina za liposome

je prvi signal za preuzimanje liposoma od strane ćelija RES-a (Gulati i sar., 1998), pri čemu manji liposomi bivaju sporije opsonizovani od većih, duže se zadržavaju u cirkulaciji i više akumuliraju u ciljnim tkivima (Sharma i Sharma, 1997). Priroda i gustina naelektrisanja na površini liposoma utiču na vrstu i stepen interakcije liposoma i ćelija, kao i na stabilnost liposoma (Lian i Ho; 2001; Sharma i Sharma, 1997).

Liposomska disperzija predstavlja smešu enkapsulirane i nekapsulirane frakcije leka. Efikasnost enkapsulacije se definiše kao odnos koncentracije inkorporirane supstance detektovane u formulaciji i inicijalne koncentracije supstance korišćene za pripremu formulacije (Piacentini, 2016). Lamelarnost liposoma utiče na efikasnost enkapsulacije i kinetiku oslobađanja leka iz liposoma, kao i na ponašanje liposoma nakon preuzimanja u ćelije (Laouini i sar., 2012).

Lipidi koji ulaze u sastav liposoma imaju karakterističnu temperaturu faznog prelaza (T_c), pri čemu postoje u različitim fizičkim stanjima na temperaturama iznad i ispod T_c . Ispod ove temperature, lipidi su u rigidnom, dobro organizovanom stanju (čvrsto-gel stanje), dok su iznad ove temperature u tečno-kristalnom (fluidnom) stanju. Fazno stanje liposomskih dvoslojeva utiče na permeabilnost, agregaciju, vezivanje za proteine i stabilnost liposoma. Kako T_c značajno varira u zavisnosti od dužine i prirode lanaca masnih kiselina, fluidnost lipidnog dvosloja može biti modifikovana primenom fosfolipida različite T_c . Liposomi izrađeni od lipida sa višim T_c imaju niži stepen preuzimanja od strane RES-a (Liam i Ho; 2001; Sharma i Sharma, 1997).

Metode za karakterizaciju liposoma neposredno nakon pripreme i tokom čuvanja moraju biti reproducibilne, precizne i brze, i neophodne su kako bi se obezbedila adekvatna kontrola kvaliteta liposomskih formulacija (Vemuri i Rhodes, 1995).

2.4.5 Stabilnost liposoma

Stabilnost liposoma je osnovni parametar koji treba razmotriti prilikom pripreme, čuvanja i primene liposoma u terapiji. Stabilan farmaceutski dozirani oblik zadržava fizički integritet i nema negativan uticaj na hemijsku stabilnost aktivnih supstanci tokom celokupnog vremena čuvanja i primene preparata. Kako bi se održala stabilnost preparata tokom vremena, potrebno je sprovesti detaljna ispitivanja fizičkih, hemijskih i mikrobioloških parametara, što se odnosi i na preparate na bazi liposoma (Laouini i sar., 2012), pri čemu protokol za ispitivanje stabilnosti liposomskih sistema mora biti razvijen za svaku formulaciju ponaosob (Chrai i sar., 2001).

Liposomi su heterogeni i termodinamički nestabilni sistemi, sa tendencijom da podležu fuziji, čime nastaju veće vezikule, što je termodinamički stabilnije stanje (Vemuri i Rhodes, 1995). Fuzija liposoma vodi curenju leka, zbog čega su vizuelni izgled i distribucija veličine liposoma važni parametri prilikom procene fizičke stabilnosti. Sa druge strane, osnovne gradivne jedinice liposoma su lipidi, bilo prirodni ili sintetski, koji sadrže nezasićene masne kiseline, podložne oksidaciji, što može dovesti do promene permeabilnosti lipidnog dvosloja. Interakcije leka sa fosfolipidima takođe utiču na hemijsku stabilnost, zbog čega stabilnost slobodnog leka može biti potpuno drugačija od stabilnosti leka inkorporiranog u liposome. Zbog toga, ispitivanje hemijske stabilnosti mora uključivati i ispitivanje stabilnosti leka ugrađenog u liposome (Laouini i sar., 2012). Većina liposomskih formulacija koje se koriste u terapiji su parenteralni proizvodi koji, samim tim, moraju biti sterilni. Stoga, važno je kontrolisati i mikrobiološku stabilnost preparata na bazi liposoma (Laouini i sar., 2012).

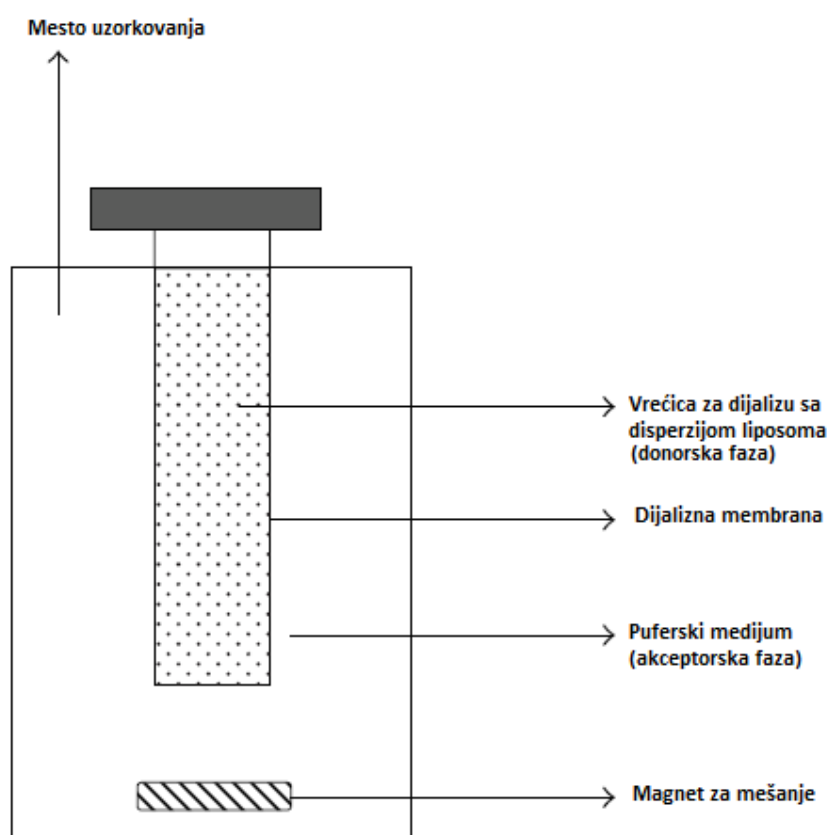
2.4.6 Inkorporiranje aktivnih supstanci u liposome

Inkorporiranje aktivnih supstanci u liposome se može postići kako pasivno, pri čemu se lek inkorporira u liposome u toku njihove izrade, ili aktivno, nakon njihovog formiranja. Hidrofobne aktivne supstance se uglavnom inkorporiraju pasivno, pri čemu količina inkorporirane i zadržane supstance zavisi od njene interakcije sa lipidima. Efikasnost inkorporiranja može ići i do 100%, ukoliko je rastvorljivost supstance u lipidima dobra. Pasivna enkapsulacija supstanci rastvorljivih u vodi zavisi od sposobnosti liposoma da zahvate vodeni rastvor u kome je supstanca rastvorena tokom formiranja vezikula. Efikasnost enkapsulacije hidrofилnih aktivnih supstanci je niža (do 30%) i u mnogome zavisi od njihove rastvorljivosti (Akbarzadeh, 2013).

2.4.7 Oslobođanje aktivnih supstanci iz liposoma *in vitro*

Oslobođanje supstance *in vitro* se najčešće prati primenom tehnike dijaliznih vrećica, koja ima nekoliko modifikacija, poput regularne, reverzne i uporedne (eng. *side-by-side*) dijalize (D'Souza, 2014; Shen i Burgess, 2013). Kod regularne dijalize (slika 11), ispitivana liposomska disperzija (donorska faza) se nalazi unutar dijalizne vrećice, dok se puferski medijum (akceptorska faza) nalazi spolja, pri čemu je zapremina donorske faze značajno manja od zapremine akceptorske faze. Empirijski je pokazano da bi unutrašnja zapremina dijalizne membrane trebalo da bude 6-10 puta manja od zapremine spoljašnjeg akceptorskog

medijuma (D'Souza i DeLuca, 2006), a sve sa ciljem da se obezbedi maksimalna brzina transporta leka kroz membranu. Pored toga, određeno je da bi molekulska masa „*cutoff*“-a dijalizne membrane trebalo biti oko 100 puta veća od veličine molekula leka (Xu i sar., 2012). Kod regularne dijalize, lek nakon oslobađanja iz liposoma difunduje kroz dijaliznu membranu u puferski medijum, u kome se određuje koncentracija leka pogodnim metodama, poput HPLC (Shazly i sar., 2008) ili UV-Vis metode (Milenković i sar., 2013). Kod tehnike dijaliznih vrećica, transport supstance kroz dijaliznu membranu u mnogome zavisi od rastvorljivosti ispitivane supstance u akceptorskoj fazi (D'Souza, 2014).



Slika 11. Šematski prikaz tehnike sa dijaliznim vrećicama (preuzeto i prilagođeno iz D'Souza, 2014)

2.4.8 Primena liposoma

Još šezdesetih godina prošlog veka uočen je potencijal liposoma kao biodegradabilnih i biokompatibilnih nosača farmaceutski i kozmetički aktivnih supstanci, koji mogu pojačati njihovo delovanje i smanjiti neželjene efekte. Međutim, primena liposoma u terapiji je započeta tek tridesetak godina kasnije, kada su prvi lekovi na bazi liposoma odobreni od

strane Agencije za hranu i lekove u Sjedinjenim Američkim Državama, sa antigljivičnim i antikancerskim aktivnim supstancama (Lian i Ho, 2001). Danas se liposomi, osim u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, primenjuju i u poljoprivredi i prehrambenoj industriji (Laouini i sar., 2012).

Liposomi kao nosači farmaceutski aktivnih supstanci mogu biti primenjeni sistemski ili lokalno, u obliku tečnih, polučvrstih i čvrstih preparata (Laouini i sar., 2012). U liposome mogu biti inkorporirane različite supstance, kao što su antibiotici (Gaspar, 2008), antikancerski lekovi (Hirai i sar., 2010; Zhang i sar., 2005), antiparazitici (Lopes, 2012) i glukokortikoidi (Bhardwaj i Burgess, 2010). Liposomi mogu da zaštite antibiotike osetljive na laktamazu, poput penicilina i cefalosporina, od enzimske degradacije, jer lipidi koji ulaze u sastav liposoma nisu podložni razlaganju pod dejstvom enzima. Ciljnom isporukom antikancerskih lekova povećava se njihova efikasnost, smanjuje potrebna doza i toksičnost leka, što je potvrđeno na primeru doksorubicina, čija liposomska formulacija pokazuje višestruko manju kardiotoksičnost od slobodnog leka. Takođe, inkorporiranjem antigljivičnog leka amfotericina B u liposome postiže se povećanje rastvorljivosti leka, efikasniji ulazak leka u makrofage i smanjenje toksičnosti leka. Pokazano je da liposomi mogu biti iskorišćeni i u razvoju vakcina i genskoj terapiji (Lašić, 1998).

Svojstva liposoma omogućavaju njihovu primenu kao nosača kozmetički aktivnih supstanci, koje mogu da zaštite od degradacije, povećaju im bioraspoloživost i omoguće produženo oslobađanje. U liposome mogu biti inkorporirani antioksidansi, vitamini, proteini i enzimi, koji štite kožu od negativnog uticaja UV zračenja. Tako, liposomi sa fotoliazom, enzimom koji omogućava reparaciju DNK, efikasno štite kožu od oštećenja izazvanih UV zračenjem (Hofer i sar., 2011). Liposomi, zbog visokog sadržaja fosfolipida, čak i kada ne sadrže aktivne supstance, imaju vlažeći i obnavljajući efekat, poboljšavaju elastičnost i barijernu funkciju kože, čime usporavaju njeno starenje (Laouini i sar., 2012).

Iako se liposomi prvenstveno koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, poslednjih godina sve je veći interes za primenu liposoma u poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Tako, liposomi mogu biti iskorišćeni kao nosači funkcionalnih komponenata hrane, poput proteina, enzima, vitamina, antioksidanasa i aroma, i biti primenjeni u cilju poboljšanja fermentacionih procesa (Kirby, 1990), konzerviranja i fortifikacije prehrambenih proizvoda (Marsanasco i sar., 2011). Liposomi se mogu primeniti u poljoprivredi, kao nosači fungicida, herbicida i pesticida, čime se omogućava njihovo produženo delovanje, usled dužeg zadržavanja liposoma na površini biljaka (Laouini i sar., 2012).

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Materijali i reagensi

Za sintezu sulfanilamida i hidrogelova, kao i za pripremu inkluzionih kompleksa, fizičkih smeša i liposoma korišćeni su sledeći materijali: hlorsulfonska kiselina, 99% (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka); acetanilid, 97% (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka); hlrovodonična kiselina (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); amonijum-hidroksid (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum-hidroksid (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); β -ciklodekstrin, 98% (Merck, Darmstadt, Nemačka); 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, 97% (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka); monomer *N*-izopropilakrilamid (NIPAM), 99% (Acros Organics, SAD); umreživač etilenglikoldimetakrilat (EGDM), 97% (Fluka, AG Buchs SG; Cemical Corp, CH); inicijator 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN), 98% (Acros Organics, SAD); metanol (Unichem, Beograd, Srbija); aceton (Centrohem, Beograd, Srbija); 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (PC, kritična temperatura $T_c = -15$ °C) (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka), pri čemu, prema deklaraciji, PC smeša sadrži 33% palmitinske, 13% stearinske, 31% oleinske i 15% linoleinske kiseline, dok su ostale masne kiseline prisutne u zanemarljivo malim količinama; dinatrijum-hidrogenfosfat, dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Centrohem, Beograd, Srbija), kalijum-dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Centrohem, Beograd, Srbija), ultračista voda iz Millipore Milli-Q sistema (provodljivost $< 0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Sve ostale upotrebljene hemikalije i reagensi bile su hromatografskog ili analitičkog stepena čistoće i korišćene su bez daljeg prečišćavanja.

3.2 Metode sinteze i pripreme farmaceutskih sistema sa sulfanilamidom

3.2.1 Sinteza i prečišćavanje sulfanilamida

Sinteza sulfanilamida započinje postepenim dodavanjem 7,5 g acetanilida u balon sa hlorsulfonskom kiselinom ($18,5 \text{ cm}^3$), pri čemu temperatura reakcione smeše ne sme da prelazi 20 °C. Kada prestane izdvajanje gasova, reakciona smeša se postepeno zagreva jedan sat na temperaturi 65 °C uz konstantno mešanje, a zatim izlije na 75 g usitnjenog leda, uz održavanje temperature vodene suspenzije na 20 °C. Hlađenjem se izdvajaju kristali 4-

acetamidobenzensulfonil-hlorida, koji se odvajaju od rastvora filtracijom na Bihnerovom levku i ispiraju vodom radi uklanjanja tragova kiseline (indikator-papir).

Dobijeni kristali se rastvore u 60 cm³ vode, doda se amonijak (15 cm³) i smeša ostavi na sobnoj temperaturi 24 sata. Stajanjem se istalože kristali 4-acetamidobenzensulfonamida, koji se odvoje filtriranjem na Bihnerovom levku, isperu vodom i prenesu u balon u kome se nalazi rastvor natrijum-hidroksida (5,5 g NaOH rastvoreno u 50 cm³ vode). Balon se poveže sa povratnim hladnjakom i reakciona smeša zagreva do ključanja na uljanom kupatilu. U zagrejanu reakcionu smešu se oprezno dolije koncentrovana hlorovodonična kiselina (1,5 cm³), doda malo aktivnog uglja i još vruća smeša filtrira preko filter papira. Topli filtrat se neutrališe hlorovodoničnom kiselinom do pH=7. Nakon hlađenja, izdvojeni kristali sintetisanog sulfanilamida se odvajaju filtriranjem, ispiraju hladnom vodom i suše. Prečišćavanje sintetisanog sulfanilamida vrši se prekrizacijom iz vodenog rastvora. Tako prečišćenom sulfanilamidu je određena tačka topljenja, koja iznosi 163 °C, što je u saglasnosti sa literaturom (Sukul i Spitteller, 2006).

3.2.2 Priprema inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša sa sulfanilamidom

3.2.2.1 Priprema inkluzionih kompleksa

Sulfanilamid (172 mg) i β-ciklodekstrin (1135 mg) ili 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin (1540 mg) se pomešaju i suspenduju u 150 cm³ destilovane vode. Dobijene suspenzije se uravnotežavaju mešanjem na sobnoj temperaturi 24 h, i dobijeni rastvori uparavaju na vakuum uparivaču na 60 °C do zapremine od oko 20 cm³, a zatim suše u eksikatoru iznad koncentrovane sumporne kiseline na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Molski odnos sulfanilamida i odgovarajućeg ciklodekstrina u kompleksu je 1:1.

3.2.2.2 Priprema fizičkih smeša

Fizičke smeše se pripremaju jednostavnim mešanjem sulfanilamida i kompleksirajućih agenasa, β-ciklodekstrina ili 2-hidroksi-β-ciklodekstrina, u molskom odnosu 1:1, u tarioniku sa pistilom.

3.2.3 Sinteza i priprema hidrogelova sa sulfanilamidom

3.2.3.1 Sinteza homopolimernih hidrogelova

Homopolimerni hidrogelovi su sintetisani u acetonu radikalskom polimerizacijom monomera NIPAM-a uz primenu inicijatora AIBN-a i umreživača EGDM-a. Sadržaj inicijatora je bio konstantan i iznosio je 2,7 mol%, dok je sadržaj umreživača varirao u opsegu 1-2,5 mol% (1; 1,5; 2 i 2,5 mol%).

Reakcione smeše su pripremljene rastvaranjem 500 mg NIPAM-a, 20 mg AIBN-a i određene količine EGDM-a (8,76 mg; 13,14 mg; 17,52 mg; 21,896 mg ili 26,27 mg) u acetonu (0,9 cm³) i dobro homogenizovane. Tako dobijene smeše su injektirane u jednostrano zatopljene staklene cevčice promera 5 mm, koje su zatim zatopljene i sa druge strane. Polimerizacija je vršena 3 h prema sledećem temperaturnom režimu: 0,5 h na 75 °C, 2 h na 80 °C i 0,5 h na 85 °C. Nakon hlađenja, sintetisani homopolimeri se izvade iz staklenih cevi, odmere i iseku na manje cilindre.

U cilju uklanjanja neproreagovanih jedinjenja, sintetisani hidrogelovi su preliveni metanolom (30 cm³) i ostavljeni da odstoje 72 h. Nakon tretiranja čistim metanolom, hidrogelovi se ispiraju rastvorima metanola i destilovane vode (75/25; 50/50, 25/75 i 0/100, v/v, respektivno) tokom 24 h. Posle ispiranja, hidrogelovi se suše u sušnici na 40 °C do konstantne mase.

3.2.3.2 Bubrenje hidrogelova

Bubrenje hidrogelova se prati gravimetrijski, tako što se uzorci hidrogelova u suvom stanju (kserogelovi) potapaju u vodene rastvore određene pH vrednosti i temperature, i zatim meri njihova masa u određenim vremenskim intervalima, do postizanja ravnoteže, odnosno do konstantne mase. Na osnovu mase uzorka pre i posle bubrenja, a prema jednačini 6, određuje se stepen bubrenja hidrogelova. Prilikom vađenja uzorka iz rastvora, višak rastvora uklanja se sa površine hidrogela filter papirom.

Ispitivan je uticaj temperature (20 i 38 °C) i pH vrednosti sredine (2,2 i 7,4) na bubrenje homopolimernih p(NIPAM) hidrogelova, kao i njihova sposobnost kontrakcije u temperaturnom opsegu od 20 do 65 °C. Rastvori određenih pH vrednosti pripremani su dodavanjem hlorovodonične kiseline ili natrijum-hidroksida u destilovanu vodu, pri čemu je kiselost merena digitalnim pH-metrom (HANNA, Portugal). Za termostatiranje je korišćeno vodeno kupatilo (Sutjeska, Beograd, Srbija).

3.2.3.3 Liofilizacija hidrogelova

Liofilizacija p(NIPAM) hidrogelova u nabubrelom stanju se vrši u 3 faze na uređaju Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator (GAMMA 1-16 LSC, Nemačka). U prvoj fazi, sintetisani hidrogelovi se brzo zamrzavaju na temperaturi od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 24 h. Faza sušenja se sastoji iz dve podfaze. U prvoj podfazi sušenja, količina rastvora se smanjuje sublimacijom na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pritisku od 0,05 kPa tokom 12 h. U drugoj podfazi sušenja, takozvanoj izotermalnoj desorpciji, hidrogelovi se zagrevaju na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 6 h na pritisku od 0,05 kPa, uz uklanjanje pare. Liofilizirani uzorci se pakuju pod vakuumom i čuvaju u frižideru na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.4 Inkorporiranje sulfanilamida u sintetisane hidrogelove

Odmerene mase sintetisanih kserogelova ($\sim 0,05\text{ g}$) se preliju sa po $0,5\text{ cm}^3$ metanolnog rastvora sulfanilamida koncentracije 50 mg/cm^3 , i ostave da bubre 48 h na sobnoj temperaturi, u cilju uklapanja sulfanilamida u polimernu mrežu. Nakon postizanja ravnoteže, nabubrela hidrogelovi sa uklopljenim sulfanilamidom se dekantovanjem odvoje od rastvora, isperu destilovanom vodom, pri čemu se višak vode ukloni filter papirom, i odmere. Na osnovu mase uzoraka hidrogelova pre i posle bubrenja u rastvoru sulfanilamida izračunava se efikasnost uklapanja.

3.2.3.5 Oslobođanje sulfanilamida iz hidrogelova

Ispitivanje oslobođanja sulfanilamida iz hidrogelova u *in vitro* uslovima je vršeno u rastvorima $\text{pH}=2,2$ ($6,28 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$ HCl) i $\text{pH}=7,4$ ($3,98 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$ NaOH). Uzorci nabubrela hidrogelova sa uklopljenim sulfanilamidom su prelivani sa po 3 cm^3 adekvatnog medijuma i temperirani na vodenom kupatilu na $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 24 h, uz umereno mešanje na magnetnoj mešalici.

Oslobođena količina sulfanilamida je praćena uzimanjem po $100\text{ }\mu\text{l}$ rastvora u različitim vremenskim intervalima (0; 0,5; 1; 2; 24 h) tokom 24 h. Uzorkovani rastvori su razblaživani dodavanjem 3 cm^3 metanola HPLC čistoće, filtrirani na celuloznom membranskom filteru promera pora $0,45\text{ }\mu\text{m}$ i analizirani primenom HPLC metode (odjeljak 3.3.1.7).

3.2.4 Priprema liposomskih disperzija sa sulfanilamidom

Liposomi sa sulfanilamidom različite veličine i lamelarnosti su izrađeni metodom tankog filma (Milenković i sar., 2013; Petrović i sar., 2014), sa izvesnim modifikacijama. Lipidna komponenta je rastvorena u hloroformu u balonu za uparavanje, pri čemu je konačna koncentracija lipida u liposomnim disperzijama iznosila 5×10^{-4} M. Nakon toga, izvršeno je uklanjanje hloroforma tokom 60 min na rotacionom vakuum uparivaču, kako bi se na zidu balona formirao tanak sloj lipida. Hidratacija lipidnog sloja izvršena je dodavanjem puferskog rastvora sulfanilamida (fosfatni pufer, pH=7,4), koncentracije 1×10^{-5} M. Hidratacija je vršena 60 min uz konstantno mešanje iznad temperature faznog prelaza lipida. Na taj način izrađeni su MLV liposomi. Da bi se izradili LUV i SUV liposomi, smeša je mešana na vorteksu (HI 190M, Hanna instruments, Italija) tokom 30 minuta pri brzini mešanja od 500 rpm, a zatim je vršeno ekstrudiranje (LiposoFast-Basic Extruder, Avestin, Inc., Kanada) smeše MLV liposoma kroz polikarbonatne filtere promera pora 400 i 100 nm, respektivno.

3.2.4.1 Određivanje veličine kapi, zeta potencijala i indeksa polidisperznosti liposomske disperzije

Prosečna veličina kapi i raspodela veličine kapi liposomske disperzije (indeks polidisperznosti, PDI) određene su tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti, odnosno foton korelacionom spektroskopijom, primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Na ovaj način se meri stepen fluktuacije intenziteta rasute svetlosti usled Braunovog kretanja kapi u uzorku, a zatim softverski prevodi u veličinu kapi pomoću Stokes-Einstein jednačine. U cilju smanjenja uticaja gustine i viskoziteta liposomske disperzije na rezultate merenja, uzorci su pre merenja razblaživani visokoprečišćenom vodom (1:10, v/v). Merenja su vršena na temperaturi od 25 °C.

Zeta potencijal izrađenih liposomskih disperzija određen je primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Naime, ovim uređajem se meri elektroforetska pokretljivost liposoma u električnom polju, koja se zatim softverski prevodi u zeta potencijal, pomoću Helmholtz-Smoluchowski jednačine. Merenja su vršena na 25 °C, nakon razblaživanja uzoraka visokoprečišćenom vodom.

3.2.4.2 *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida iz liposomskih disperzija

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida iz pripremljenih liposomnih disperzija sprovedeno je primenom tehnike sa dijaliznim vrećicama. Dijalizna vrećica (celulozna membrana, Mr *cut-off* 12000) se pre upotrebe potopi u rastvor pufera na sobnoj temperaturi tokom 24 h kako bi se uklonili tragovi konzervanasa, a zatim temeljno ispere destilovanom vodom. Dijalizna vrećica (110 × 43 mm) se napuni sa 5 cm³ liposomne disperzije sa sulfanilamidom (donorska faza), zatvori sa obe strane plastičnim štikaljkama, tako da konačna dužina dijalizne vrećice iznosi 30 ± 2 mm, a zatim postavi horizontalno, u staklenu čašu od 150 cm³ sa 50 cm³ fosfatnog pufera pH=7,4, tako da bude potpuno uronjena u puferski medijum (akceptorska faza). Oslobađanje sulfanilamida je praćeno na temperaturi od 23 ± 0,2 °C, uz konstantno mešanje na magnetnog mešalici, pri brzini od 100 rpm. Vrećica sa kontrolnim uzorkom sadržala je puferski rastvor sulfanilamida iste koncentracije kao u liposomskim disperzijama.

U definisanim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30, 50, 70, 90 i 120 min) vršeno je uzorkovanje 2 cm³ akceptorske faze, a koncentracija oslobođenog sulfanilamida u njoj određivana je spektrofotometrijski (odjeljak 3.3.1.6) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije sulfanilamida ($\lambda=258$ nm). Kinetika oslobađanja sulfanilamida iz liposoma i kontrolnog puferskog rastvora procenjena je primenom različitih matematičkih modela (nultog reda, prvog reda, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Baker–Lonsdale) pomoću DDSolver paketa za Microsoft Excel aplikacije.

3.3 Metode ispitivanja izrađenih farmaceutskih sistema

3.3.1 Fizičko-hemijske metode ispitivanja

3.3.1.1 *Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)*

FTIR spektri sulfanilamida, korišćenih ciklodekstrina, inkluzionih kompleksa, fizičkih smeša, monomera NIPAM-a, sintetisanih kserogelova i kserogelova sa uklopljenim sulfanilamidom snimljeni su tehnikom tankih transparentnih pastila, mešanjem 1 mg određenog uzorka sa 150 mg kalijum-bromida (KBr, 99%, Merck, Darmstadt, Nemačka), vakumiranjem i presovanjem pod pritiskom od oko 200 MPa. Umreživač EGDM je snimljen u obliku tankog filma između dve pločice od cink-selenida (ZnSe).

Za sve uzorke snimanja su vršena na FTIR spektrofotometru BOMEM MB-100 (Hartmann & Braun, Kanada) u oblasti talasnih brojeva 4000-400 cm^{-1} . Obrada spektara je izvedena primenom softvera Win-Bomem Easy.

3.3.1.2 Difrakcija X-zraka (XRD)

XRD spektri sulfanilamida, β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, inkluzionih kompleksa i odgovarajućih fizičkih smeša snimljeni su pri sledećim uslovima: uzorci su ozračeni monohromatskim CuK_{α} zračenjem i analizirani pod uglom 2θ između 5 i 55° sa korakom $0,05^{\circ}$ i dužinom snimanja $\tau=5$ s. U toku snimanja korišćeni su napon i jačina struje 40 kV i 20 mA, respektivno.

Sintetisani prazni kserogelovi i kserogelovi sa inkorporiranim sulfanilamidom su samleveni do praha, ozračeni monohromatskim CuK_{α} zračenjem i analizirani pod uglom 2θ između 5 i 70° sa korakom $0,05^{\circ}$ i dužinom snimanja $\tau=5$ s, pod naponom od 40 kV i jačinom struje 20 mA. Svi ispitivani uzorci snimljeni su na Phillips PW1030 difraktometru za prah.

3.3.1.3 Nuklearna magnetna rezonanca ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ spektri sulfanilamida, β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina i inkluzionih kompleksa snimljeni su na Bruker AC 250 E NMR spektrometru sa radnom frekvencijom 250 MHz u staklenoj kiveti prečnika 5 mm na sobnoj temperaturi pulsnom metodom sa višestrukim ponavljanjem pulseva. Uzorci su pripremani rastvaranjem ispitivanih jedinjenja ili kompleksa (500 μg) u 200 μl rastvarača. Kao rastvarač korišćena je deuterisana voda, D_2O .

3.3.1.4 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termičke karakteristike sulfanilamida, korišćenih ciklodekstrina, inkluzionih kompleksa i odgovarajućih fizičkih smeša ispitivane su u atmosferi azota u temperaturnom opsegu 30-230 $^{\circ}\text{C}$ sa brzinom skeniranja 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Ispitivanja su vršena na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru DSC Q10 TA Instrument. Uzorci (4-5 mg) su hermetički zatvoreni u aluminijumskim posudama i analizirani zajedno sa praznom aluminijumskom posudom kao referentnim uzorkom. Zagrevanje uzoraka je vršeno u atmosferi azota protoka 50 cm^3/min .

3.3.1.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija sulfanilamida, korišćenih ciklodekstrina i pripremljenih inkluzionih kompleksa, kao i liofiliziranih hidrogelova i hidrogelova sa uklopljenim sulfanilamidom ispitivana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Usitnjeni uzorci su pre analize prekriveni legurom zlato/paladijum (15/85) pomoću raspršivača JEOL Fine Coat JFC 1100E Ion Sputter (JEOL Co., Japan) i snimani na uređaju JEOL Scanning Electron Microscope JSM-5300 (JEOL Co., Japan).

3.3.1.6 Spektrofotometrija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti (UV-Vis)

Svi UV-Vis spektri snimani su na spektrofotometru Varian Cary-100 Conc. u oblasti talasnih dužina od 200-800 nm. Snimanje uzoraka je vršeno u kvarcnim kivetama (1×1×4,5 cm) na sobnoj temperaturi, u odnosu na fosfatni pufer ili destilovanu vodu kao kontrolu.

3.3.1.7 Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

Praćenje oslobađanja sulfanilamida iz hidrogelova, pri različitim uslovima pH sredine, vršeno je na HPLC uređaju Agilent 1100 Series, sa detektorom DAD 1200 Series. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 250 × 4,6 mm, 5 μm, a talasna dužina detekcije iznosila je 258 nm. Kao eluent je korišćen metanol protoka 1 cm³/min, zapremina injektiranih uzoraka je iznosila 10 μl, a temperatura kolone 25 °C. Za obradu podataka korišćen je Agilent ChemStation softver.

Metanolni rastvori dobijeni potapanjem sintetisanih hidrogelova različitog stepena umreženja podvrgnuti su HPLC analizi, kako bi se odredio sadržaj rezidualnog monomera NIPAM-a i neproreagovalog umreživača EGDM-a. Analiza je izvršena na HPLC uređaju Agilent 1100 Series, sa detektorom DAD 1200 Series. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 250 × 4,6 mm, 5 μm, a talasna dužina detekcije iznosila je 225 nm. Kao eluent je korišćen metanol protoka 1 cm³/min, zapremina injektiranih uzoraka je iznosila 10 μl, a temperatura kolone 25 °C. Za obradu podataka korišćen je Agilent ChemStation softver.

3.3.1.8 Tečna hromatografija – masena spektrometrija (UHPLC-DAD-HESI-MS/MS analiza)

Za identifikaciju degradacionih puteva i degradacionih proizvoda sulfanilamida nakon izlaganja delovanju UV-A, UV-B i UV-C zračenja primenjena je UHPLC-DAD-HESI-

MS/MS metoda. UHPLC-DAD-HESI-MS/MS analiza vršena je na Thermo Scientific tečno-hromatografskom sistemu visokih performansi (UHPLC) koji poseduje kvaternu pumpu sa degaserom, termostatirajuću kolonu, autosempler i DAD detektor, koji je povezan sa LCQ Fleet Ion Trap masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD). Za obradu i analizu podataka korišćeni su softveri Xcalibur (verzija 2.2 SP1.48) i LCQ Fleet (verzija 2.7.0.1103 SP1). Razdvajanje je vršeno na Hypersil gold C18 ($50 \times 2,1$ mm, $1,9 \mu\text{m}$) koloni (Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD).

Mobilna faza se sastojala od (A) vode + 0,1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Za hromatografsko razdvajanje korišćen je linearni gradijent: 0–2 min od 10 do 20% (B), 2–4,5 min od 20 do 90% (B), 4,5–4,8 min 90% (B), 4,8–4,9 min od 90 do 10% i 4,9–10 min 10% (B). Zapremina injektiranja je bila $10 \mu\text{L}$, protok mobilne faze $0,25 \text{ cm}^3/\text{min}$, a razdvajanje jedinjenja je praćeno na talasnim dužinama 208, 234, 260 i 583 nm.

Maseni spektri su snimani u pozitivnom modu. Parametri HESI-izvora su bili sledeći: napon izvora 4,5 kV, napon kapilare 19 V, napon tube 20 V, temperatura kapilare $275 \text{ }^\circ\text{C}$, protok glavnog (eng. *sheath*) i pomoćnog (eng. *auxiliary*) gasa je bio 50 i 8 au, respektivno. MS spektri su snimani u celokupnom opsegu od 50-1000 *m/z*. Za ispitivanje fragmentacije, skeniranje je vršeno primenom disocijacije indukovane kolizijom (CID). Normalizovana kolizijska energija CID ćelije je iznosila 25 eV. Sva jedinjenja su identifikovana na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: masenog spektra, tačnih masa i karakteristične fragmentacije.

3.3.2 Ostale metode ispitivanja izrađenih farmaceutskih sistema

3.3.2.1 Ispitivanje fazne rastvorljivosti

Ispitivanje fazne rastvorljivosti izvršeno je primenom *Higuchi-Connors* metode (Higuchi i Connors, 1965). Višak sulfanilamida (po 50 mg) se dodaje u 5 cm^3 vodenih rastvora β -ciklodekstrina, odnosno 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina rastućih koncentracija (od 0 do 10 mmol/dm^3). Uzorci se mešaju na sobnoj temperaturi tokom 24 h, a zatim filtriraju kroz membranski filter promera pora $0,45 \mu\text{m}$ (Econofilters, Agilent Technologies, Nemačka). Količina rastvorenog sulfanilamida se određuje primenom UV-Vis metode (odjeljak 3.3.1.6) zasnovane na konstruisanoj kalibracionoj krivoj. Kao slepa proba se koristi destilovana voda. Prisustvo ciklodekstrina ne interferira sa spektrofotometrijskim

određivanjem sulfanilamida. Konstante stabilnosti ($K_{1:1}$) inkluzionih kompleksa se računaju na osnovu dijagrama fazne rastvorljivosti, a prema jednačini 4 (odjeljak 2.2.6).

3.3.2.2 Ispitivanje fotostabilnosti sulfanilamida u liposomima i inkluzionim kompleksima

Puferski rastvor sulfanilamida koncentracije $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, i MLV, LUV i SUV liposomi sa istom koncentracijom sulfanilamida ozračivani su UV-A zračenjem tokom 0-150 min, UV-B zračenjem tokom 0-3 min i UV-C zračenjem tokom 0-0,5 min, u cilindričnom fotohemijском reaktoru „Rayonet“ (Southern New England Ultraviolet Co., Konektikat, SAD) sa 10 simetrično postavljenih UV-A i UV-B lampi, odnosno 8 UV-C lampi, sa emisijom maksimumima na 350, 300 i 254 nm, respektivno. U ispitivanjima su korišćene kvarcne kivete ($1 \times 1 \times 4,5 \text{ cm}$) sa $2,5 \text{ cm}^3$ uzorka, postavljene na kružno rotirajućem držaču, na udaljenosti 10 cm od lampi. Ukupno izmereni fluks energije na toj udaljenosti iznosio je $12,86 \text{ W}/\text{m}^2$ za UV-A zračenje, $15 \text{ W}/\text{m}^2$ za UV-B zračenje i $14,29 \text{ W}/\text{m}^2$ za UV-C zračenje. Nakon ozračivanja, uzorci su filtrirani preko celuloznih filtera promera pora $0,45 \mu\text{m}$ (Econofilters, Agilent Technologies, Nemačka) i snimani na UV-Vis spektrofotometru (odjeljak 3.3.1.6). Tako dobijeni uzorci su iskorišćeni i za identifikaciju degradacionih proizvoda sulfanilamida UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metodom (odjeljak 3.3.1.8).

Vodeni rastvori sulfanilamida i inkluzionih kompleksa (koncentracija sulfanilamida $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) su tretirani UV-B zračenjem u periodu od 0-5 min u cilindričnom fotohemijском reaktoru „Rayonet“ (Southern New England Ultraviolet Co., Konektikat, SAD) sa 8 simetrično postavljenih UV-B lampi, čiji je emisijom maksimum na 300 nm. Korišćene su kvarcne kivete ($1 \times 1 \times 4,5 \text{ cm}$) postavljene na kružno rotirajućem nosaču. Ukupno izmereni fluks zračenja koje pogađa uzorke, iznosio je $12 \text{ W}/\text{m}^2$ na udaljenosti od 10 cm od lampi. Uzorci su filtrirani kroz membranski filter promera pora $0,45 \mu\text{m}$ (Econofilters, Agilent Technologies, Nemačka) i analizirani UV-Vis metodom (odjeljak 3.3.1.6).

3.3.2.3 Ispitivanja antimikrobne aktivnosti sulfanilamida i inkluzionih kompleksa

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sulfanilamida je izvedeno u dve faze. U prvoj fazi je određen antimikrobni spektar delovanja sulfanilamida disk-difuzionom metodom, pri čemu su korišćeni sledeći mikroorganizmi:

Gram-pozitivne bakterije:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

- *Bacillus luteus in-house* soj,
- *Listeria monocytogenes* ATCC 15313,

Gram-negativne bakterije:

- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Proteus vulgaris* ATCC 8427,
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785.

Gljivice:

- *Candida albicans* ATCC 2091.

Kao podloga za rast bakterija je korišćen hranljivi agar (Torlak, Srbija), dok je za rast gljivica korišćen Sabouraud maltozni agar (Torlak, Srbija). Kao kontrola korišćen je rastvarač DMSO.

Pripremljena je serija rastvora sulfanilamida u DMSO koncentracije od 20 mg/cm³ do 0,625 mg/cm³. Na disk prečnika 9 mm, prethodno postavljen na odgovarajućoj podlozi u Petrijevoj šolji, zasejanoj odgovarajućom kulturom mikroorganizama, nanošeno je 50 µl ispitivanog rastvora, tako da je količina sulfanilamida po disku iznosila 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg i 31,25 µg. Uzorci su inkubirani tokom 24 h na temperaturi 37 °C (bakterije) i 25 °C (gljivice), nakon čega je meren prečnik zona inhibicije rasta mikroorganizama. Kao referentni antibiotici korišćeni su ampicilin i kombinacija sulfametoksazol/trimetoprim.

Druga faza mikrobioloških ispitivanja obuhvatala je uporedno ispitivanje antimikrobne aktivnosti sulfanilamida i njegovih inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima. Na osnovu rezultata dobijenih u prvoj fazi ispitivanja, odabrani su mikroorganizmi i koncentracije ispitivanih agenasa za drugu fazu.

Pripremljeni su rastvori sulfanilamida, kompleksa sulfanilamid:β-ciklodekstrin i sulfanilamid:2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin u DMSO, pri čemu je koncentracija sulfanilamida u njima iznosila 5 mg/cm³, 1,25 mg/cm³ i 0,31 mg/cm³. Primenjena je disk difuziona metoda, pri čemu je na disk nanošeno 50 µl ispitivanog rastvora. Uzorci su inkubirani tokom 24 h na temperaturi 37 °C, nakon čega je meren prečnik zona inhibicije rasta mikroorganizama.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Inkluzioni kompleksi

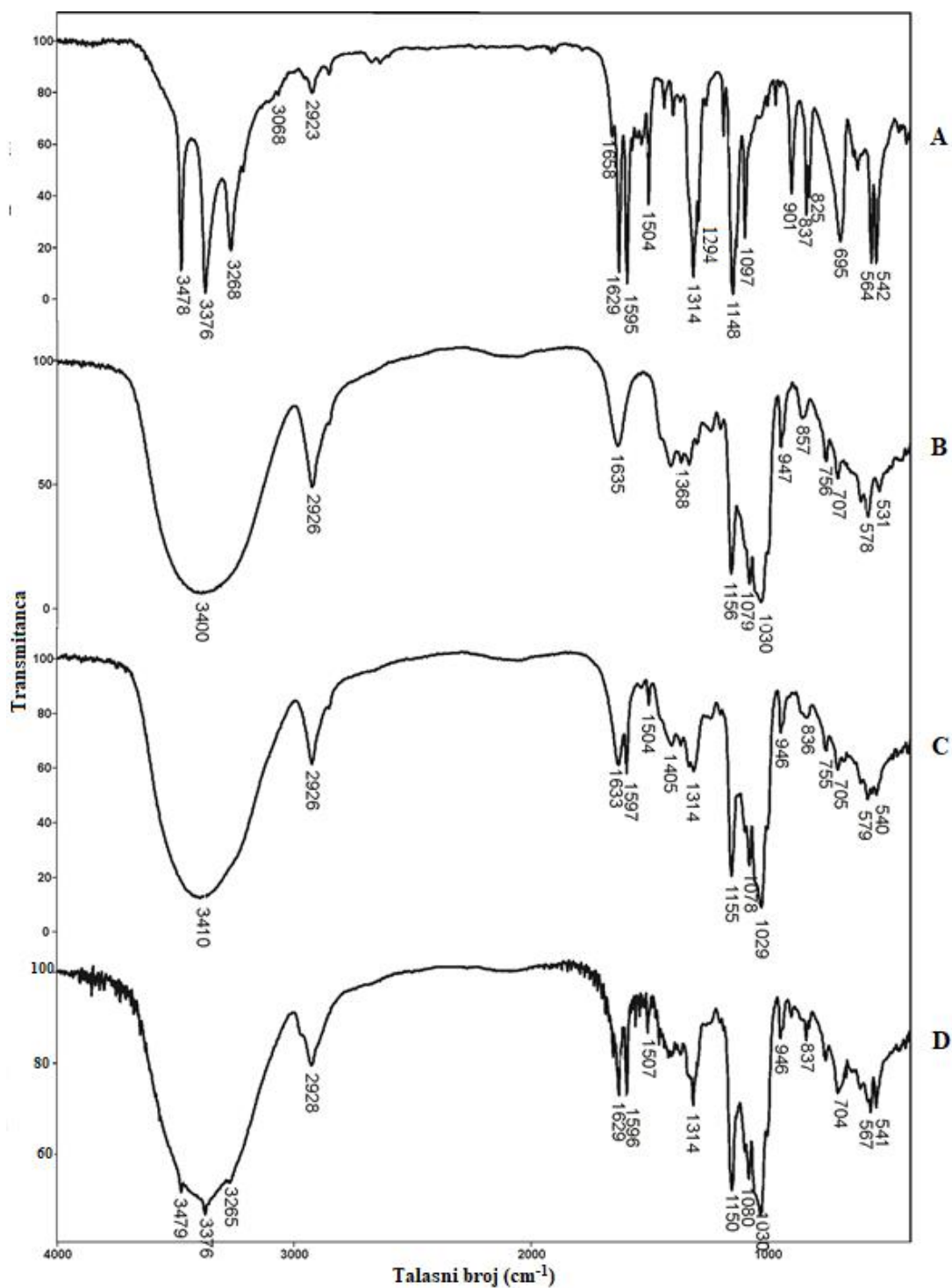
Inkluzioni kompleksi sulfanilamida sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, pripremljeni koprecipitacionom metodom, podvrgnuti su analizi primenom FTIR, $^1\text{H-NMR}$, XRD, DSC i SEM metoda, sa ciljem da se izvrši njihova strukturna karakterizacija i dokaže inkorporiranje sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina.

4.1.1 FTIR analiza

Uparednom analizom FTIR spektara sulfanilamida i β -ciklodekstrina sa spektrima odgovarajućeg inkluzionog kompleksa i fizičke smeše, uočavaju se razlike u izgledu spektra inkluzionog kompleksa u odnosu na spektre čistih supstanci i fizičke smeše (slika 12).

Karakteristične trake valencionih N-H vibracija primarne amino grupe očekuju se u opsegu talasnih brojeva $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$. Tri oštre trake srednjeg intenziteta na 3478 , 3376 i 3268 cm^{-1} u spektru sulfanilamida (slika 12 a) posledica su asimetričnih valencionih vibracija anilinske i sulfonamidne amino grupe, $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$, kao i simetričnih valencionih vibracija sulfonamidne amino grupe, $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$, respektivno. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Popova i sar., 2007; Topacli i Topacli, 2003; Varghese i sar., 2006). Osnovna traka N-H deformacionih vibracija javlja se na 1629 cm^{-1} . Trake od N-H deformacione vibracije primarnih amina, $\gamma(\text{N-H})$, očekuju se u opsegu talasnih brojeva $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$. U spektru sulfanilamida se javlja široka traka srednjeg intenziteta na 695 cm^{-1} , a njen položaj zavisi od prisustva vodoničnih veza. Valencione vibracije C-N veze aromatičnih amina, $\nu(\text{C-N})$, daju oštru traku na većim talasnim brojevima, jer je C-N veza jača usled delokalizacije slobodnog elektronskog para. Ova traka se javlja na 1294 cm^{-1} , dok se intenzivne trake od valencionih vibracija SO_2 grupe, $\nu(\text{SO}_2)$, javljaju na 1314 i 1148 cm^{-1} , iako je očekivani opseg talasnih brojeva za ove trake $1230\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$. U FTIR spektru sulfanilamida postoje i trake karakteristične za aromatični prsten. Trake koje potiču od vibracija aromatične C=C veze očekuju se u opsegu talasnih brojeva $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, i u spektru sulfanilamida se javljaju dve trake različitog intenziteta na 1595 i 1504 cm^{-1} . Usled 1,4-disupstitucije aromatičnog prstena, deformacione vibracije C-H veze van ravni daju traku srednjeg intenziteta na 837 cm^{-1} , što je unutar očekivanog opsega od $860\text{-}800\text{ cm}^{-1}$.

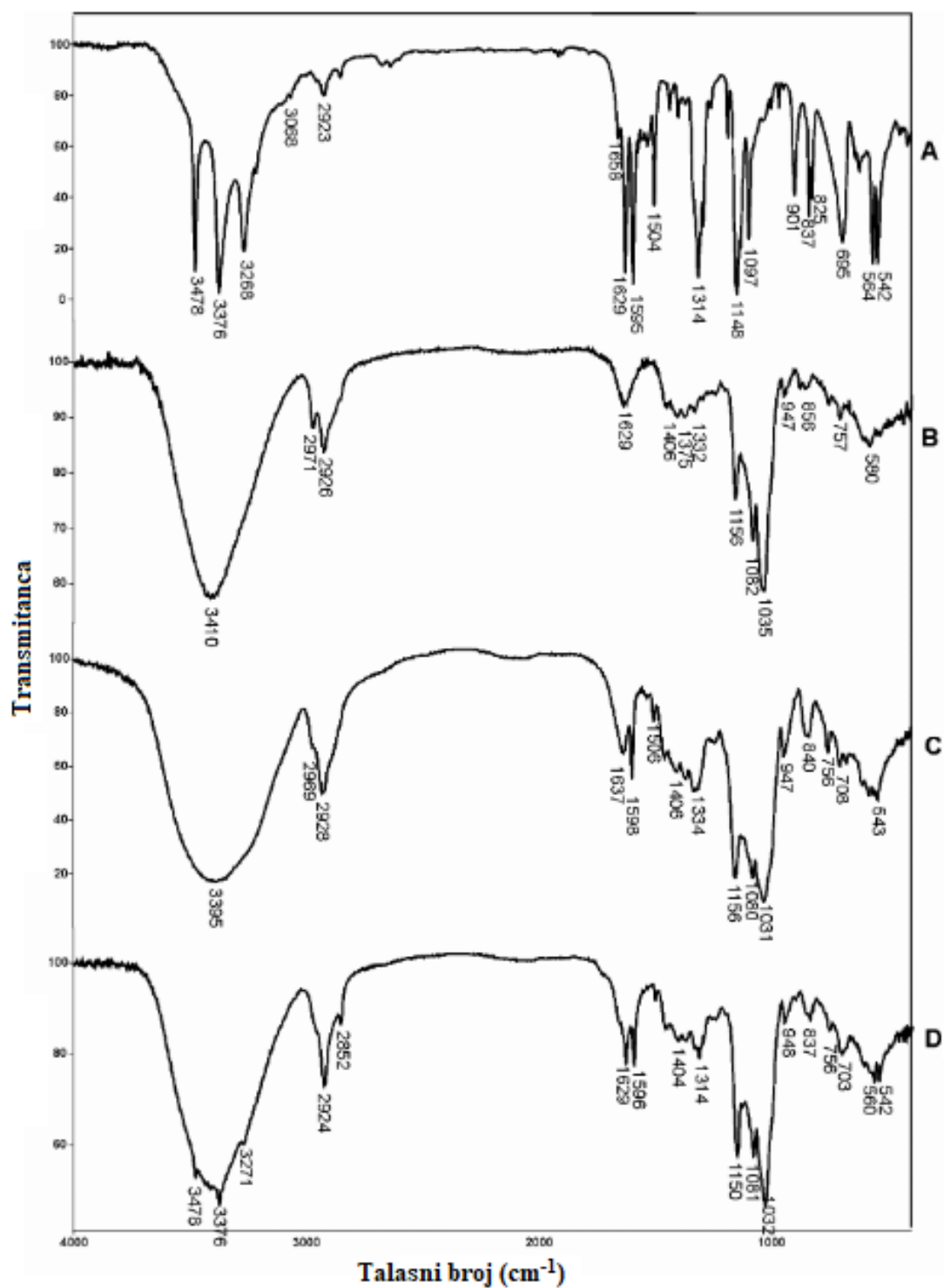
Poređenjem FTIR spektra sulfanilamida sa spektrima različitih polimornih oblika sulfanilamida dostupnim u literaturi (Borba i sar., 2013; Lin i Guillory, 1970) u opsegu talasnih brojeva 4000-3000 i 700-400 cm^{-1} , može se zaključiti da sintetisani sulfanilamid odgovara β -polimornom obliku.



Slika 12. FTIR spektar: a) sulfanilamida, b) β -ciklodekstrina, c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin, d) fizičke smeše sulfanilamida i β -ciklodekstrina

U FTIR spektru inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin postoji jedna široka traka u opsegu talasnih brojeva od $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, sa izraženim maksimumom na 3400 cm^{-1} , koja odgovara valencionim vibracijama hidroksilne grupe β -ciklodekstrina. Trake od N-H valencionih vibracija nisu prisutne u spektru inkluzionog kompleksa, ali postoje u spektru fizičke smeše. Takođe, u spektru inkluzionog kompleksa nema karakterističnih traka od $\delta(\text{NH}_2)$ na 1629 cm^{-1} , $\nu(\text{SO}_2)$ na 1148 cm^{-1} , $\gamma(\text{C-H})$ na 837 cm^{-1} i $\gamma(\text{N-H})$ na 695 cm^{-1} , dok je intenzitet traka od $\nu(\text{C=C})$ na 1595 i 1504 cm^{-1} i $\nu(\text{SO}_2)$ na 1314 cm^{-1} značajno manji u poređenju sa spektrom sulfanilamida.

FTIR spektri sulfanilamida, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, inkluzionog kompleksa i odgovarajuće fizičke smeše prikazani su na slici 13. Za razliku od spektra fizičke smeše, u spektru inkluzionog kompleksa se primećuju značajne razlike u odnosu na spektre čistih supstanci. Široka traka sa maksimumom apsorpcije na 3395 cm^{-1} u spektru inkluzionog kompleksa je rezultat valencionih vibracija hidroksilne grupe 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Ista traka se u spektru čistog 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina javlja na 3410 cm^{-1} . Pomeranje trake za 15 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva ukazuje da hidroksilna grupa učestvuje u formiranju vodoničnih veza. Karakteristične trake od valencionih i deformacionih vibracija N-H veze sulfanilamida nisu prisutne u spektru kompleksa, dok je intenzitet traka koje potiču od valencionih vibracija $\nu(\text{C=C})$ i $\nu(\text{SO}_2)$ značajno smanjen u poređenju sa spektrom sulfanilamida.

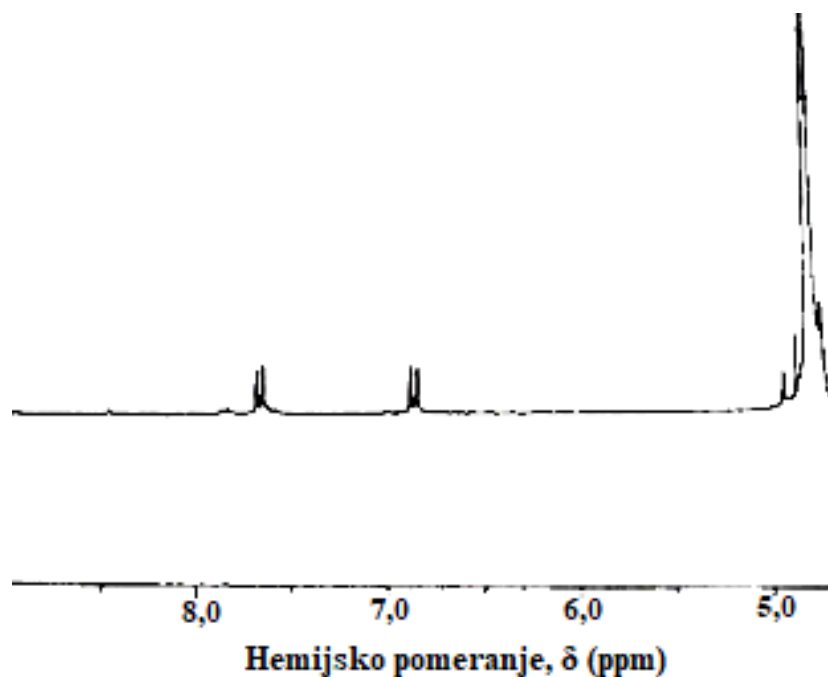


Slika 13. FTIR spektar: a) sulfanilamida, b) 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina, c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin, d) fizičke smeše sulfanilamida i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina

Rezultati FTIR analize pokazuju da je postignuto inkorporiranje sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina, pri čemu su formirani odgovarajući inkluzioni kompleksi.

4.1.2 ^1H -NMR analiza

Sintetisani sulfanilamid i formirani inkluzioni kompleksi podvrgnuti su ^1H -NMR analizi, kako bi se potvrdilo inkorporiranje sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina i odredio najverovatniji način inkorporiranja. ^1H -NMR spektar sulfanilamida je prikazan na slici 14.



Slika 14. ^1H -NMR spektar sulfanilamida

U ^1H -NMR spektru sulfanilamida uočavaju se dva dubleta na $\delta=7,6549$ i $\delta=6,8594$ ppm, koji potiču od aromatičnih protona u položaju C2 i C6, odnosno C3 i C5, što je u skladu sa literaturnim podacima (Cashin, 2011; Prabhu i sar., 1998). Kako je kao rastvarač korišćena deuterisana voda, došlo je do zamene aktivnih vodonikovih atoma iz amino grupa deuterijumom, zbog čega nema signala koji potiču od rezonancije NH_2 grupa.

Hemijska pomeranja i promene hemijskih pomeranja protona u kompleksu sulfanilamid: β -ciklodekstrin u poređenju sa čistim sulfanilamidom i β -ciklodekstrinom, prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Hemijska pomeranja (δ) i promene hemijskih pomeranja ($\Delta\delta$) protona u $^1\text{H-NMR}$ spektrima sulfanilamida, β -ciklodekstrina i odgovarajućeg inkluzionog kompleksa

	$\delta(\text{ppm})$					
	β -CD	β -CD	$\Delta\delta$	SUL	β -CD	$\Delta\delta$
	kompleks			kompleks		
H-1 β -CD	5,0586	5,0342	-0,0244			
H-2 β -CD	3,6312	3,6141	-0,0171			
H-3 β -CD	3,9545	3,8996	-0,0549			
H-4 β -CD	3,5690	3,5494	-0,0196			
H-5 β -CD	3,8679	3,7776	-0,0903			
H-6 β -CD	3,8679	3,8361	-0,0318			
H-2,6 SUL				7,6549	7,6317	-0,0232
H-3,5 SUL				6,8594	6,8545	-0,0049

Protonima iz benzenovog prstena sulfanilamida u položajima C2 i C6, kao i C3 i C5, menja se hemijsko pomeranje ($\Delta\delta$) za -0,0232 i -0,0049, respektivno, što pokazuje da su vodonikovi atomi u položajima C2 i C6 više uključeni u interakciju sa β -ciklodekstrinom. Najveće promene hemijskih pomeranja protona iz β -ciklodekstrina nakon kompleksiranja uočavaju se u položajima C5, C3 i C6, što je u saglasnosti sa učešćem ovih protona u interakcijama sa sulfanilamidom. Male vrednosti promena u hemijskom pomeranju ukazuju na nekovalentne interakcije, tipa vodoničnih veza, između sulfanilamida i β -ciklodekstrina u inkluzionom kompleksu.

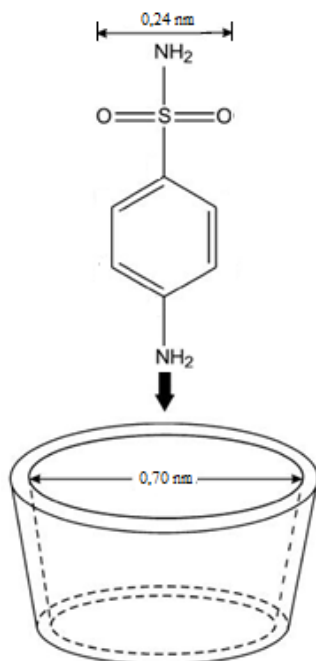
Hemijska pomeranja i promene hemijskih pomeranja protona u kompleksu sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin u poređenju sa čistim sulfanilamidom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, prikazani su u tabeli 4. Promene hemijskih pomeranja protona sulfanilamida u kompleksu na položajima C2 i C6, kao i C3 i C5, iznose 0,0036 i 0,0037, respektivno. Praktično jednake vrednosti promene hemijskog pomeranja pokazuju da su svi protoni podjednako uključeni u interakcije sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Najveću vrednost promene hemijskog pomeranja u molekulu 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina imaju protoni u položaju C3, dok je ova vrednost nešto niža za protone u položaju C5 i C6, što ukazuje na uključenost upravo ovih protona u nekovalentne interakcije

po tipu vodoničnih veza između sulfanilamida i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina. Protoni metil grupe 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina imaju najnižu vrednost hemijskog pomeranja (-0,0022).

Tabela 4. Hemijska pomeranja (δ) i promene hemijskih pomeranja ($\Delta\delta$) protona u $^1\text{H-NMR}$ spektrima sulfanilamida, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina i odgovarajućeg inkluzionog kompleksa

	δ (ppm)					
	HP- β -CD	HP- β -CD kompleks	$\Delta\delta$	SUL	HP- β -CD kompleks	$\Delta\delta$
H-3 HP- β -CD	3,9643	4,0069	0,0426			
H-5, H-6 HP- β -CD	3,8776	3,8532	-0,0244			
CH ₃ HP- β -CD	1,1408	1,1386	-0,0022			
H-2,6 SUL				7,6549	7,6585	0,0036
H-3,5 SUL				6,8594	6,8631	0,0037

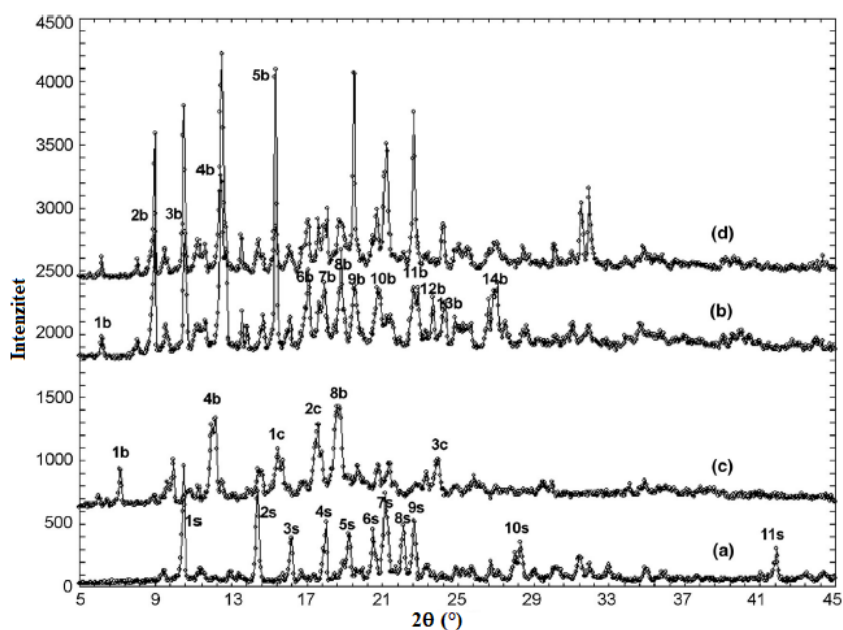
Kao i FTIR spektri, i rezultati NMR analize pokazali su da dolazi do inkorporiranja sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina i formiranja inkluzionih kompleksa. Pored toga, rezultati protonske NMR analize ukazuju da najverovatnije samo deo sulfanilamida, i to fenil grupa i aromatična amino grupa, bivaju ugrađene u šupljine ciklodekstrina. Na slici 15 je šematski prikazan najverovatniji način inkorporiranja sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina.



Slika 15. Šematski prikaz mogućeg načina inkorporiranja sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina

4.1.3 XRD analiza

Difraktogrami sulfanilamida, β -ciklodekstrina, inkluzionog kompleksa i odgovarajuće fizičke smeše prikazani su na slici 16.

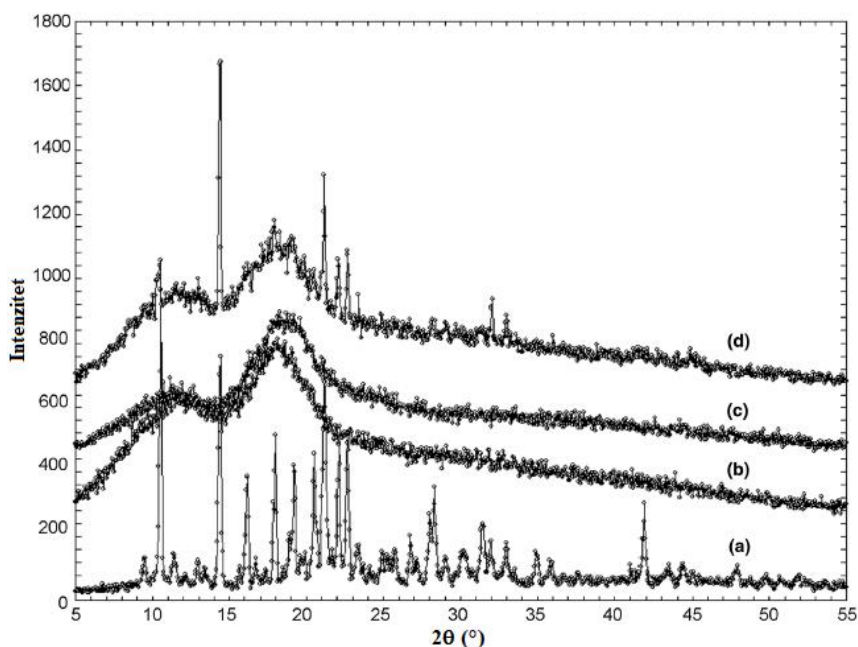


Slika 16. Difraktogrami: (a) sulfanilamida, (b) β -ciklodekstrina, (c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin, i (d) fizičke smeše sulfanilamida i β -ciklodekstrina

Difraktogram inkluzionog kompleksa se razlikuje od difraktograma sulfanilamida i β -ciklodekstrina. U difraktogramu inkluzionog kompleksa uočava se pojava novih pikova (1c-3c), kao i pomeranje pojedinih pikova koji potiču od β -ciklodekstrina (1b, 4b, 8b). Takođe, u ovom difraktogramu nema pikova koji potiču od sulfanilamida (1s-10s). Za razliku od difraktograma inkluzionog kompleksa, u difraktogramu fizičke smeše se uočavaju pikovi iz sulfanilamida i β -ciklodekstrina.

Sa druge strane, veoma izraženi pikovi u difraktogramu sulfanilamida potvrđuju visoku kristaličnost sintetisanog sulfanilamida. Rezultati XRD analize takođe upućuju na β -polimorfni oblik sintetisanog jedinjenja (Toscani i sar., 1995).

Difraktogrami sulfanilamida, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, inkluzionog kompleksa i odgovarajuće fizičke smeše prikazani su na slici 17.



Slika 17. Difraktogrami: (a) sulfanilamida, (b) 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, (c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, i (d) fizičke smeše sulfanilamida i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina

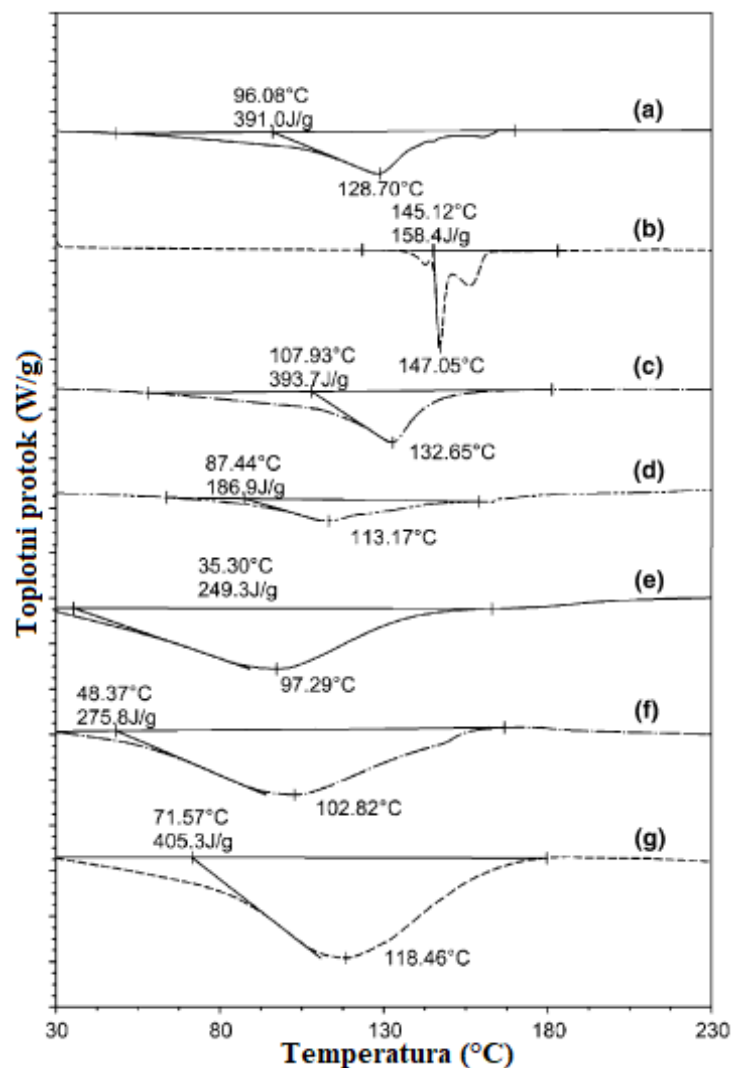
Uporednom analizom prikazanih difraktograma uočava se da je difraktogram inkluzionog kompleksa (17 c) gotovo identičan sa difraktogramom 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (17 b), pri čemu nema pikova karakterističnih za sulfanilamid, što potvrđuje da je sulfanilamid inkorporiran u šupljinu ciklodekstrina. Široki i nestrukturirani pikovi u difraktogramu 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, koji se pojavljuju u intervalu $2\theta = 11,5$ - $18,9^\circ$ ukazuju na neuređenost kristalne strukture na velikim rastojanjima. U difraktogramu

fizičke smeše uočavaju se pikovi pojedinačnih komponenti, što pokazuje da ona predstavlja jednostavnu smešu sulfanilamida i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina.

XRD analiza je potvrdila rezultate dobijene drugim metodama o postignutoj molekularnoj inkapsulaciji sulfanilamida u ciklodekstrinske šupljine.

4.1.4 DSC analiza

DSC termogrami sulfanilamida, β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, inkluzionih kompleksa i odgovarajućih fizičkih smeša prikazani su na slici 18.



Slika 18. DSC termogrami: (a) sulfanilamida, (b) β -ciklodekstrina, (c) 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, (d) inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin, (e) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, (f) fizičke smeše sulfanilamida i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, i (g) fizičke smeše sulfanilamida i β -ciklodekstrina

DSC termogrami oba inkluzionna kompleksa pokazuju temperaturne promene koje se razlikuju i od sulfanilamida i od odgovarajućeg ciklodekstrina. Sulfanilamid ima izražen endotermni pik sa maksimumom na 128,7 °C i pik manjeg inteziteta na približno 163 °C, koji odgovara temperaturi topljenja sulfanilamida. β -ciklodekstrin ima oštar endotermni pik na 147,05 °C, dok 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin poseduje široki endotermni pik na 132,65 °C. Pikovi termalnih promena karakterističnih za sulfanilamid nisu prisutni u termogramima inkluzionih kompleksa. Pikovi na 113,17 °C u termogramu kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin i na 97,29 °C u termogramu kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin ne odgovaraju termalnim promenama molekula gosta (sulfanilamida) i molekulima domaćina (β -ciklodekstrina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina), što takođe ukazuje na formiranje novih struktura sa drugačijim režimom temperaturnih promena.

Entalpija topljenja sulfanilamida, koja iznosi 391 J/g, smanjuje se nakon inkorporiranja sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina, na vrednost 186,9 J/g u kompleksu sa β -ciklodekstrinom, odnosno 249,3 J/g u kompleksu sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Ove promene entalpija takođe pokazuju da su formirane supramolekulske strukture u kojima su osobine ugrađenog sulfanilamida promenjene.

Na slici 19 prikazan je fizički izgled sintetisanog sulfanilamida i inkluzionih kompleksa sa sulfanilamidom.



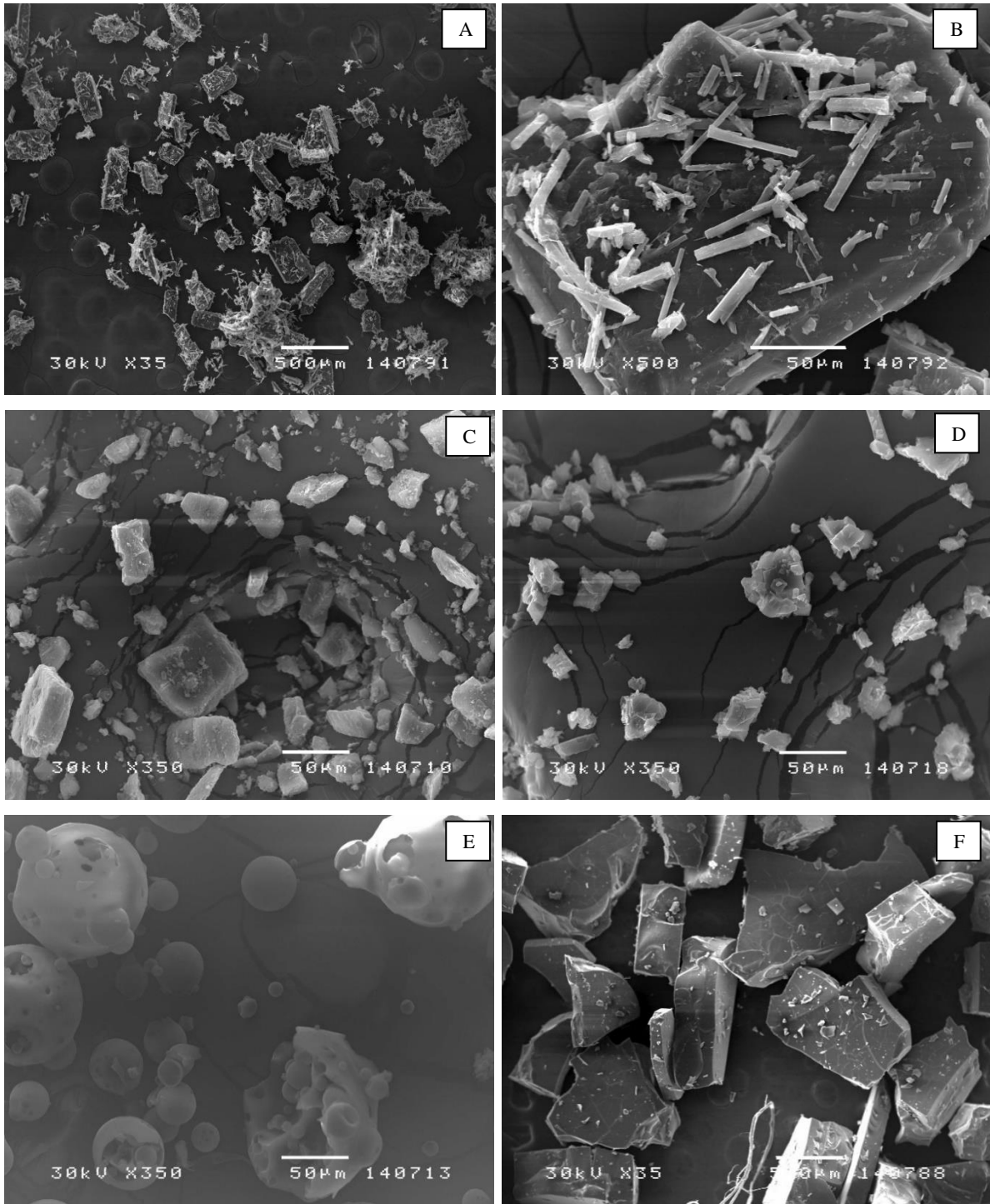
Slika 19. Izgled: (a) sintetisanog sulfanilamida, (b) inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin i (c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin

Inkorporiranjem u šupljine ciklodekstrina menjaju se fizičko-hemijske osobine sulfanilamida, zbog čega se novonastali supramolekulski kompleksi i vizuelno razlikuju od samog sulfanilamida. Naime, sulfanilamid je žućkasto-beo prah (19 a), dok je inkluzioni

kompleks sa β -ciklodekstrinom beo prašak sa slabo izraženim kristalima (19 b), a inkluzioni kompleks sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom ima providne i izražene kristale (19 c).

4.1.5 SEM analiza

SEM mikrografije sulfanilamida, β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina i odgovarajućih inkluzionih kompleksa prikazane su na slici 20. U poređnom analizom prikazanih mikrografija uočavaju se jasne razlike između morfologije i veličine čestica čistih supstanci i odgovarajućih inkluzionih kompleksa. Naime, na mikrografijama sulfanilamida se uočavaju štapičaste strukture, veličine do 50 μm , koje formiraju agregate nepravilnog oblika, kojih nema na mikrografijama inkluzionih kompleksa. Takođe, mikrografije β -ciklodekstrina i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina se razlikuju od mikrografija odgovarajućih kompleksa. Ova razlika je naročito uočljiva u slučaju 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, kod koga se na mikrografiji uočavaju sferne čestice amorfne karaktere veličine do 50 μm , dok se na mikrografiji inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin uočavaju kristali nepravilnog oblika i veličine preko 500 μm .



Slika 20. SEM mikrografije: (a) sulfanilamida (35×), (b) sulfanilamida (500×), (c) β -ciklodekstrina (350×), (d) inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin (350×), (e) 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (350×), i (f) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (35×)

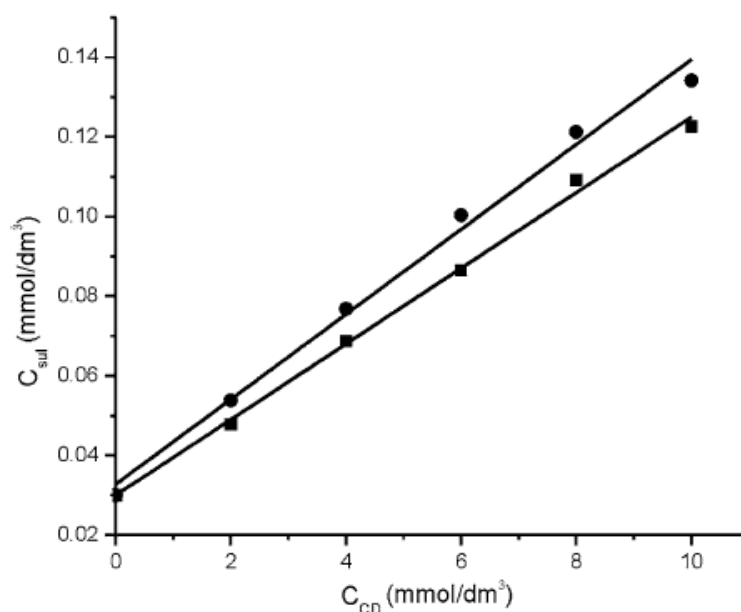
4.1.6 Fazna rastvorljivost

Ispitivanje fazne rastvorljivosti je imalo za cilj da se dobije uvid u interakcije ciklodekstrina i sulfanilamida u vodenom rastvoru, kao i da se odredi i uporedi rastvorljivost sulfanilamida bez i u prisustvu ciklodekstrina, a samim tim i kompleksirajuća sposobnost različitih ciklodekstrina.

Tokom ispitivanja fazne rastvorljivosti i kasnije fotostabilnosti, koncentracija sulfanilamida u uzorcima je određivana primenom UV-Vis metode (odjeljak 3.3.1.6), a na osnovu kalibracione krive. Zavisnost apsorbance od koncentracije sulfanilamida linearna je u opsegu koncentracije 1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, pri čemu važi jednačina 10, sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,9996$:

$$A = 0,11901 c + 0,09964 \quad (10)$$

Na slici 21 prikazani su dijagrami fazne rastvorljivosti.



Slika 21. Dijagrami fazne rastvorljivosti sulfanilamida u prisustvu β -ciklodekstrina (■) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (●) u vodi na 25 °C

Prikazani dijagrami fazne rastvorljivosti pripadaju A_L tipu (slika 7), što ukazuje da je molski odnos sulfanilamida i odgovarajućeg ciklodekstrina u inkluzionim kompleksima 1:1, pri čemu su formirani inkluzionni kompleksi rastvorljivi u vodi (Gavriloaia i sar., 2012; Higuchi i Connors, 1965). Parametri dobijeni prilikom ispitivanja fazne rastvorljivosti su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Parametri dobijeni ispitivanjem fazne rastvorljivosti sulfanilamida u prisustvu ciklodekstrina u vodi na 25 °C

Ciklodekstrin	Nagib	R²	Odsečak	K_{1:1}, dm³/mmol	Efikasnost solubilizacije *
β-CD	0,0095	0,9971	0,02985	0,32	4,09
HP-β-CD	0,01067	0,9926	0,03279	0,33	4,47

*Odnos između rastvorljivosti sulfanilamida u vodi u prisustvu najveće ispitivane koncentracije ciklodekstrina (10 mmol/dm³) i rastvorljivosti čistog sulfanilamida u vodi.

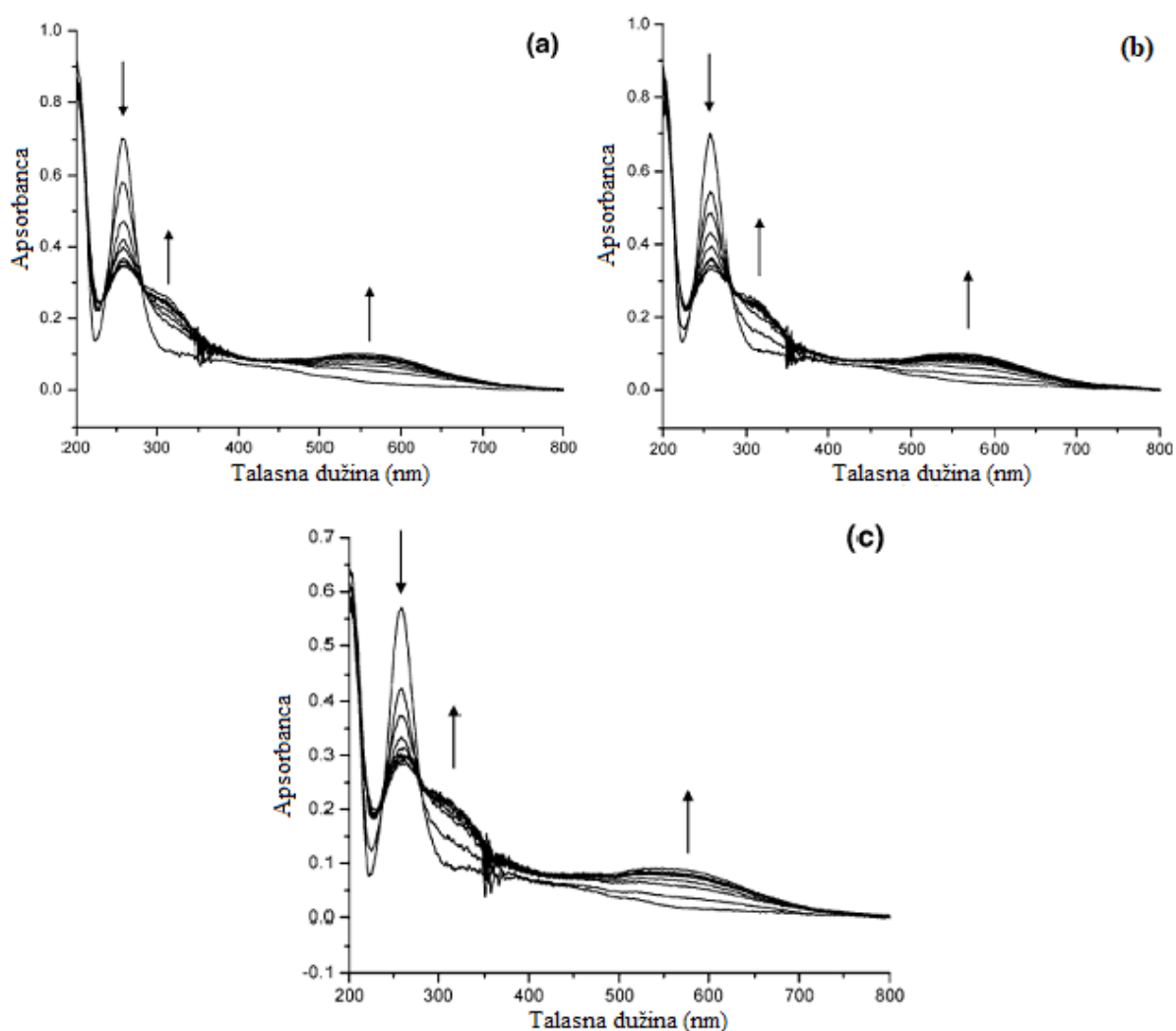
U slučaju oba ciklodekstrina, rastvorljivost sulfanilamida se linearno povećava sa povećanjem koncentracije ciklodekstrina u rastvoru. Naime, rastvorljivost sulfanilamida u vodi je jako mala i iznosi svega 7,5 mg/cm³ na sobnoj temperaturi. Kompleksiranjem sa β-ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom, rastvorljivost sulfanilamida u vodi se povećava 4,09 puta, odnosno 4,47 puta, respektivno. Sahin i Ozdemir su ispitivali efekat prisustva β-ciklodekstrina na rastvorljivost sulfametoksazola u vodi, pri različitim pH vrednostima. Pokazano je da se u prisustvu β-ciklodekstrina, rastvorljivost sulfametoksazola u vodi povećava 2 puta pri pH=4,5, a svega 1,5 puta pri pH=7 (Sahin i Ozdemir, 2018). Na osnovu vrednosti određenih konstanti stabilnosti za oba pripremljena kompleksa, može se zaključiti da je kompleks sulfanilamid:2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin stabilniji od kompleksa sulfanilamid:β-ciklodekstrin, pri čemu je kompleksaciona sposobnost 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina za sulfanilamid bolja.

Povećana rastvorljivost sulfanilamida u inkluzionim kompleksima može pozitivno uticati na njegov krajnji učinak u terapiji i učiniti ga bezbednijim za komercijalnu upotrebu. Naime, ovakvim formulacijama se može povećati apsorpcija i bioraspoloživost leka u organizmu, što omogućava da se sa manjom količinom aktivne supstance postigne terapijski učinak, uz smanjenje rizika za nastanak neželjenih reakcija, koje su jedan od glavnih razloga za zaobilaženje sulfonamidnih antimikrobnih lekova u terapiji, uprkos njihovom širokom spektru delovanja.

4.1.7 Fotostabilnost sulfanilamida u inkluzionim kompleksima

Kako je sulfanilamid fotoosetljiva supstanca, a ciklodekstrini mogu da povećaju fotostabilnost inkorporiranih supstanci, ispitivanje fotostabilnosti sulfanilamida u inkluzionim kompleksima je imalo za cilj da se kvalitativno i kvantitativno ispita njihov zaštitni efekat.

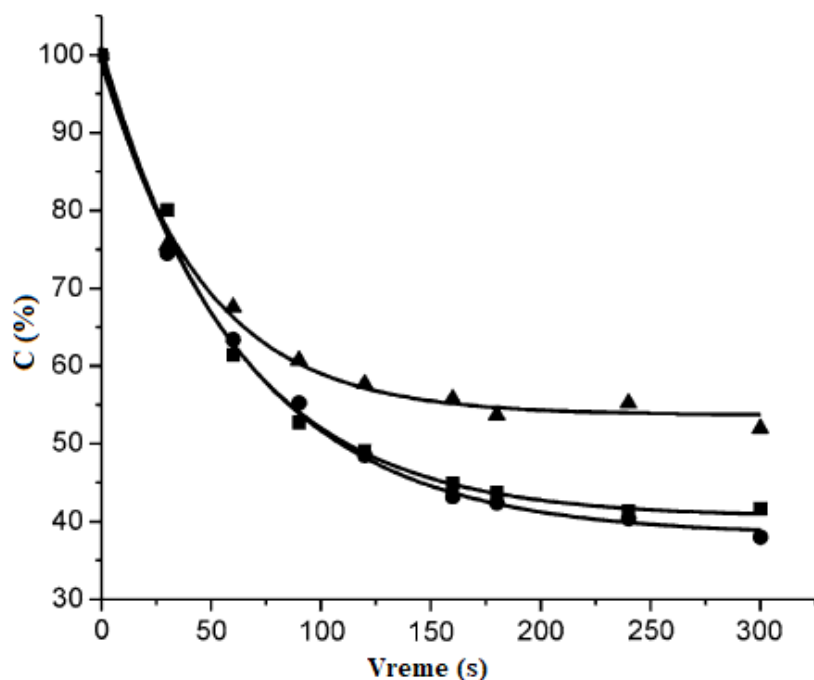
Fotodegradacija sulfanilamida u rastvoru i inkluzionim kompleksima praćena je na osnovu smanjenja apsorbance na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije sulfanilamida (258 nm) u funkciji vremena, tokom petominutnog izlaganja UV-B zračenju. Na slici 22 prikazana je promena apsorpcionih spektra sulfanilamida u rastvoru i inkluzionim kompleksima.



Slika 22. Promena UV-Vis spektara: (a) sulfanilamida, (b) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:β-ciklodekstrin i (c) inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksiopropil-β-ciklodekstrin tokom petominutnog delovanja UV-B zračenja

Postepeno smanjenje apsorbance na 258 nm uz istovremenu pojavu novih apsorpcionih maksimuma u spektru sulfanilamida, ukazuje na degradaciju sulfanilamida usled delovanja UV-B zračenja. Pojava novih apsorpcionih maksimuma u opsegu talasnih dužina 300-350 nm i 550-600 nm, kao i povećanje njihovog intenziteta sa produženjem vremena zračenja, ukazuju na nastanak degradacionih proizvoda koji apsorbuju u ovim oblastima. Literaturni podaci (Albini i Fasani, 2004) sugerišu da su potencijalni degradacioni proizvodi sulfanilamida u vodi pod dejstvom UV-B zračenja azo i nitro derivati sulfanilamida.

Promena sadržaja sulfanilamida u funkciji vremena zračenja za čist sulfanilamid i oba inkluziona kompleksa je prikazana na slici 23.



Slika 23. Profili fotodegradacije sulfanilamida pod dejstvom UV-B zračenja u rastvoru čiste supstance (●), inkluzionog kompleksa sulfanilamid:β-ciklodekstrin (■) i inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin (▲); C (%) – normalizovana koncentracija sulfanilamida

Nakon vremena zračenja od 300 s, preostala količina sulfanilamida u rastvoru iznosi 41,88%, dok je u slučaju inkluzionih kompleksa sa β-ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom preostala količina sulfanilamida veća i iznosi 46,44%, odnosno 57,67%, respektivno. Dobijeni rezultati pokazuju da se inkorporiranjem sulfanilamida u ciklodekstrinske šupljine i formiranjem inkluzionih kompleksa smanjuje fotoosetljivost

sulfanilamida i usporava njegova degradacija pod delovanjem UV-B zračenja, pri čemu 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin ima veći zaštitni efekat.

Rezultati prethodnih istraživanja su potvrdili da se inkorporiranjem aktivne supstance u šupljine ciklodekstrina i formiranjem inkluzionih kompleksa postiže povećanje rastvorljivosti sulfanilamida, ali i njegove fotostabilnosti.

4.1.8 Antimikrobna aktivnost sulfanilamida i inkluzionih kompleksa

Sulfanilamid je predstavnik grupe sintetskih antimikrobnih lekova koji spadaju u agense sa širokim spektrom delovanja, zbog čega je antimikrobna aktivnost sulfanilamida ispitana na sojevima Gram-pozitivnih, Gram-negativnih bakterija i gljivica. Rezultati prve faze ispitivanja antimikrobne aktivnosti prikazani su u tabeli 6 i prilogu 1 (slike 1.1 i 1.2).

Tabela 6. Antimikrobna aktivnost sulfanilamida

Mikroorganizam	Prečnik zona inhibicije rasta mikroorganizama (mm)							Ampicilin	SMX/TMP
	Količina sulfanilamida (µg/disk)								
	1000	500	250	125	62,5	31,25			
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,5	30,7	24,7	-	-	-	36,7	42,1	
<i>Bacillus luteus</i>	>90	>90	>90	55,6	42,9	36,8	56,9	48,8	
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	*	*	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	*	*	
<i>Proteus vulgaris</i>	33,2	30,7	28,2	-	-	-	13,2	22,9	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29,3	27,2	26,4	22,1	19,6	16,7	15,9	26,2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32,3	31,2	28,6	25,3	20,5	19,3	-	19,7	
<i>Candida albicans</i>	19,9	19,5	17,5	-	-	-	*	*	

*nije ispitivano

Rezultati dobijeni ispitivanjem antimikrobne aktivnosti potvrdili su da sulfanilamid deluje na G-pozitivne i G-negativne bakterije, a da pri većim dozama pokazuje aktivnost i

protiv gljivica. Najosetljiviji prema sulfanilamidu je *Bacillus luteus*, čiji je rast i u prisustvu najmanje ispitivane doze sulfanilamida (31,25 µg) značajno inhibiran, sa prečnikom zone inhibicije od 36,8 mm. Pored *Bacillus luteus*, sve ispitivane doze sulfanilamida inhibiraju rast i razmnožavanje *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, dok su *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris* osetljivi tek pri većim dozama sulfanilamida (≥ 250 µg). Od posebnog značaja je inhibitorski efekat sulfanilamida na rast i razmnožavanje *Pseudomonas aeruginosa*, bakterije koja je izuzetno otporna na nepovoljne uslove spoljašnje sredine i dejstvo velikog broja antibiotika, a česti je izazivač infekcija u bolničkim sredinama, pri čemu poseban problem predstavljaju multirezistentni sojevi (Basseti i sar., 2018).

Dobijeni rezultati pokazuju da sojevi bakterija *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* nisu osetljivi na delovanje sulfanilamida, dok je soj *Candida albicans* slabo osetljiv, zbog čega su ovi mikroorganizmi isključeni iz daljeg toka ispitivanja.

U okviru druge faze ispitivanja antimikrobne aktivnosti, uporedo je ispitana aktivnost čistog sulfanilamida i pripremljenih inkluzionih kompleksa sa istim sadržajem sulfanilamida, na osetljive sojeve bakterija, sa ciljem da se utvrdi kvalitativni i kvantitativni efekat inkorporiranja sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina na njegovu antimikrobnu aktivnost. Rezultati druge faze ispitivanja prikazani su u tabeli 7 i prilogu 1 (slika 1.3).

Tabela 7. Antimikrobna aktivnost sulfanilamida i inkluzionih kompleksa

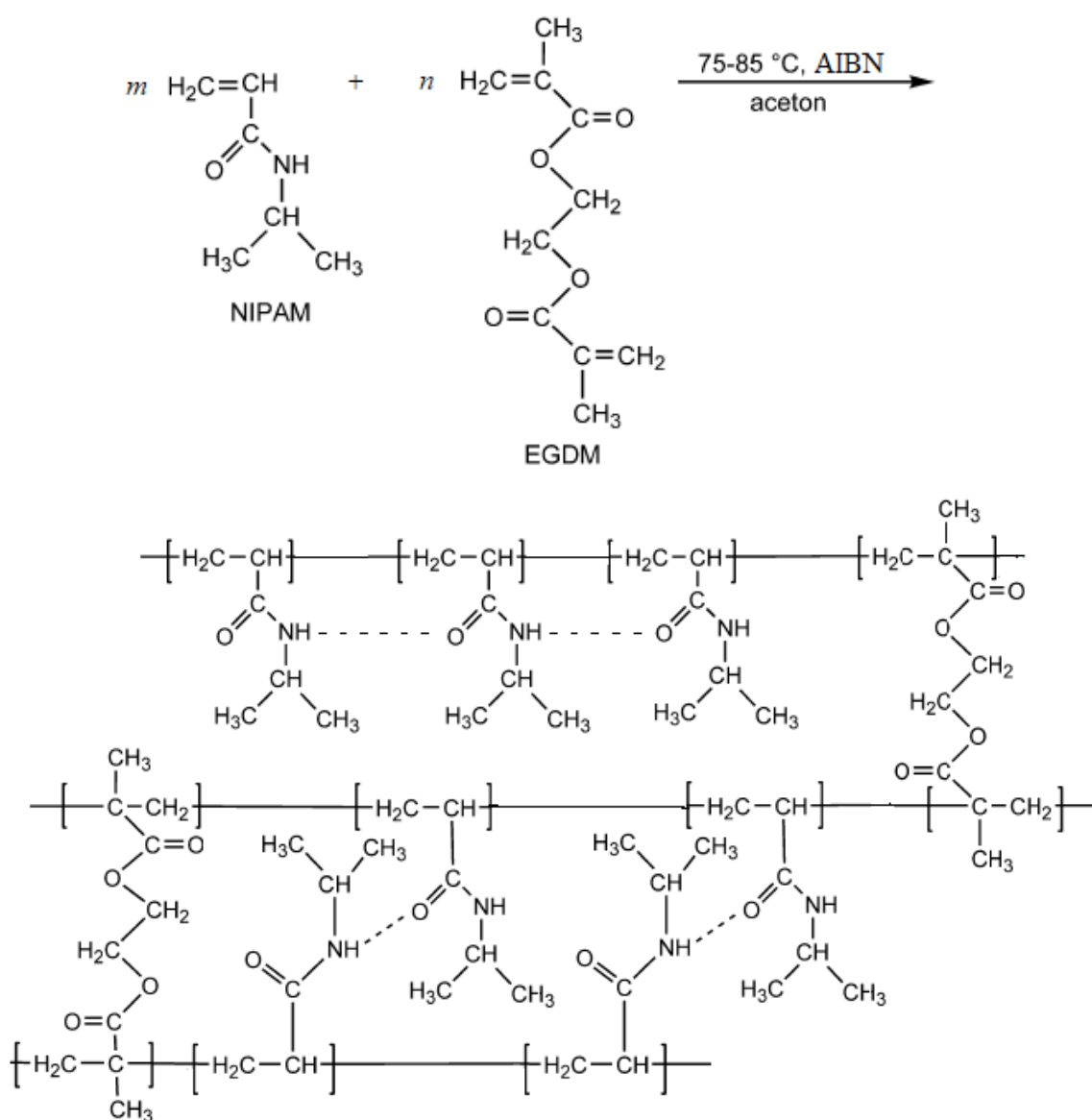
Uzorak	Količina		Mikroorganizmi		
	sulfanilamida (µg/disk)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus luteus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sulfanilamid		26,7	>90	26,9	30,2
Sulf:β-CD	250	29,2	>90	32,4	31,9
Sulf:HP-β-CD		29,7	>90	33,5	35,5
Sulfanilamid		-	>90	-	-
Sulf:β-CD	62,5	-	>90	-	-
Sulf:HP-β-CD		-	>90	-	-
Sulfanilamid		-	16,2	-	-
Sulf:β-CD	15,5	-	27	-	-
Sulf:HP-β-CD		-	28,4	-	-

Prikazani rezultati (tabela 7) pokazuju da inkorporiranje sulfanilamida u šupljine ciklodekstrina za posledicu ima povećanje njegovog antimikrobnog delovanja na svim ispitivanim mikroorganizmima. Tako, prečnik zone inhibicije rasta i razmnožavanja soja *Bacillus luteus* iznosi 16,2 mm za sulfanilamid, dok su vrednosti приметно veće za iste koncentracije sulfanilamida u inkluzionim kompleksima i iznose 27 mm za kompleks sa β -ciklodekstrinom, odnosno 28,4 mm za kompleks sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Povećanje efikasnosti sulfanilamida u inkluzionim kompleksima verovatno je posledica povećanja njegove rastvorljivosti u vodi.

4.2 Hidrogelovi

4.2.1 Sinteza hidrogelova

Homopolimerni hidrogelovi p(NIPAM)-a različitog stepena umreženja sintetisani su polimerizacijom preko slobodnih radikala, uz primenu inicijatora AIBN-a i umreživača EGDM-a. U reakcijama sinteze, sadržaj inicijatora je bio konstantan (2,7 mol%), dok je sadržaj umreživača varirao (1; 1,5; 2 i 2,5 mol%). Na slici 24 je šematski prikazano umrežavanje monomera NIPAM-a i formiranje polimera.

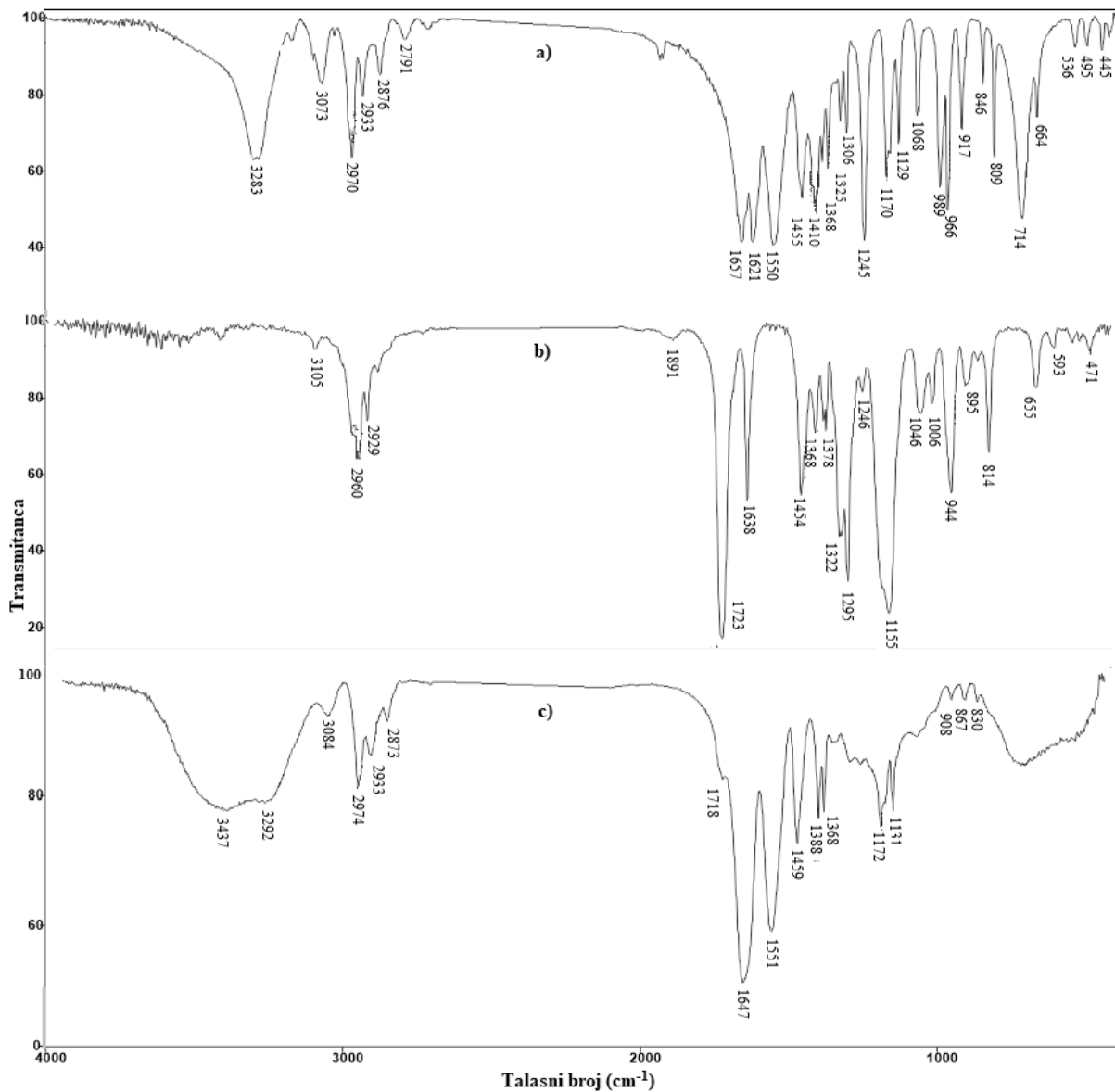


Slika 24. Šematski prikaz sinteze p(NIPAM) hidrogela slobodno-radikalskom polimerizacijom

U cilju definisanja strukture sintetisanih hidrogelova, njihova karakterizacija pre i posle uklapanja sulfanilamida izvršena je primenom FTIR, XRD i SEM metode.

4.2.2 FTIR analiza

FTIR spektri monomera NIPAM-a, umreživača EGDM-a i p(NIPAM)-a sa 2,5 mol% umreživača prikazani su na slici 25.



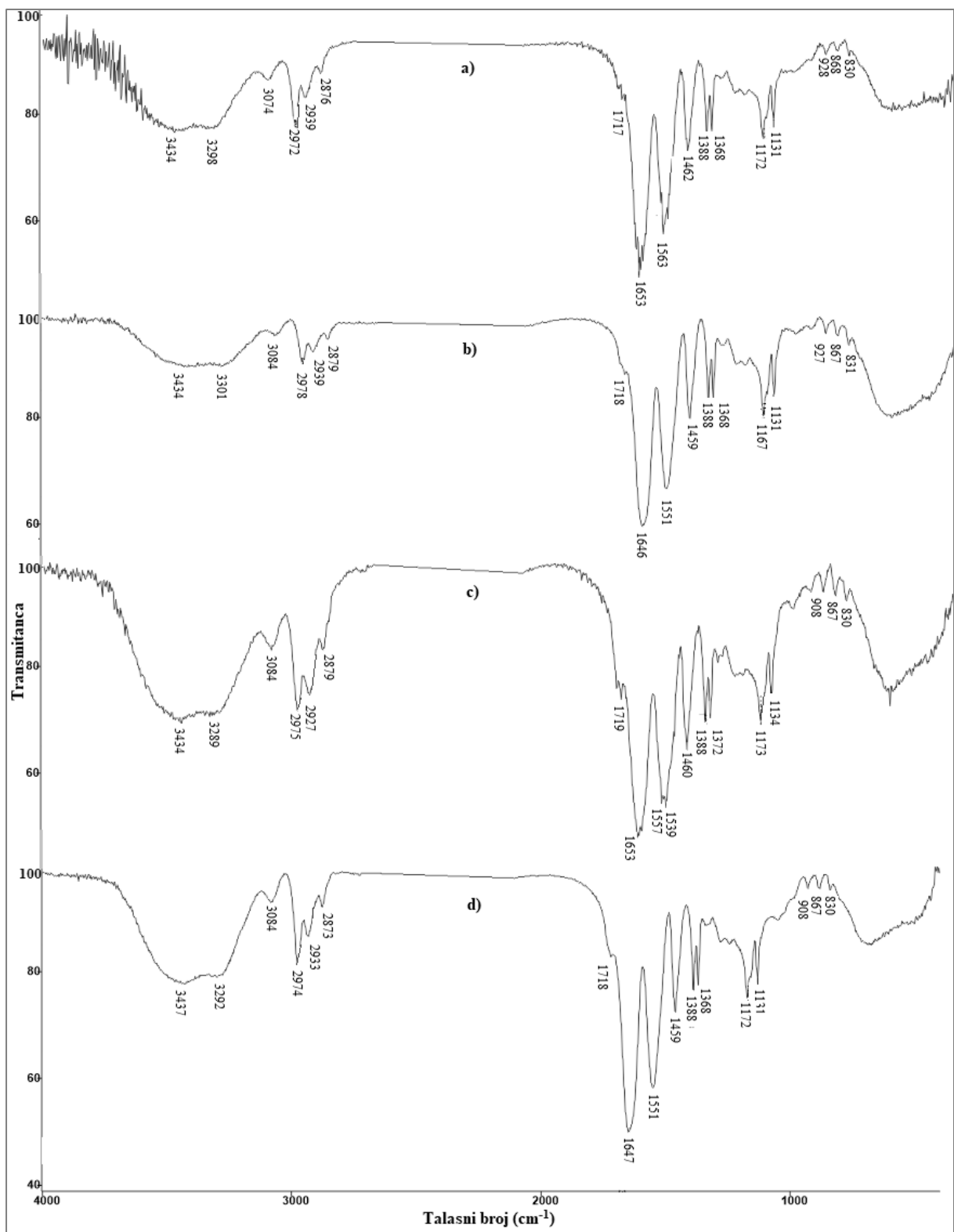
Slika 25. FTIR spektar: a) monomera NIPAM-a, b) umreživača EGDM-a i c) p(NIPAM)-a sa 2,5 mol% umreživača

U FTIR spektru monomera NIPAM-a u oblasti talasnih brojeva iznad 3000 cm^{-1} uočavaju se dve trake različitog intenziteta. Traka jakog intenziteta sa maksimumom na 3283 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija N-H grupe, $\nu(\text{N-H})$, i potvrđuje prisustvo sekundarne amino-grupe u strukturi monomera (Kurečić i sar., 2012), dok je traka na 3073 cm^{-1} rezultat valencionih vibracija vinilne grupe, $\nu(\text{=C-H})$. Trake sa maksimumima na 2970 cm^{-1} i 2876 cm^{-1} potiču od asimetričnih i simetričnih valencionih vibracija C-H veze iz metil grupa (Kurečić i sar., 2012), dok je traka srednjeg intenziteta na 2933 cm^{-1} rezultat asimetričnih valencionih vibracija C-H veze iz izopropil grupe. Najznačajnije obeležje FTIR spektara amida, kojima pripada i NIPAM, jeste prisustvo dve karakteristične trake koje potiču od valencionih vibracija C=O veze i kuplovanja deformacionih vibracija u ravni N-H veze i valencionih vibracija C-N veze, a označavaju se kao amidna traka I i amidna traka II, respektivno. Amidna traka I se javlja u opsegu talasnih brojeva $1680\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$, dok se amidna traka II javlja u opsegu talasnih brojeva $1540\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$, a njihov intenzitet i položaj zavise od vrste amida i prisustva i jačine vodoničnih veza (Tamirisa i sar., 2006). U FTIR spektru monomera NIPAM-a se uočavaju dve trake jakog intenziteta: amidna traka I na 1657 cm^{-1} i amidna traka II na 1550 cm^{-1} . U oblasti talasnih brojeva $1670\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ očekuje se traka srednjeg intenziteta koja potiče od valencionih vibracija C=C veze. Ova traka se u spektru NIPAM-a javlja na 1621 cm^{-1} , jer je zbog konjugacije sa karbonilnom grupom njen maksimum pomeren ka nižim vrednostima talasnih brojeva (Jadhav i sar., 2016). Deformacione vibracije C-H veze izopropil grupe daju dve trake srednjeg intenziteta na 1455 cm^{-1} i 1410 cm^{-1} , dok deformacione vibracije van ravni C-H veze vinilne grupe daju trake sa maksimumima na 989 cm^{-1} i 966 cm^{-1} , što je u skladu sa literaturnim podacima (Coates, 2000).

U FTIR spektru umreživača EGDM-a uočava se oštra traka jakog intenziteta na 1723 cm^{-1} koja potiče od valencionih vibracija karbonilne grupe, koja je konjugovana sa dvostrukom vezom, zbog čega se traka srednjeg intenziteta, koja potiče od valencionih vibracija C=C veze, uočava na 1638 cm^{-1} , što je u skladu sa literaturnim podacima (Coates, 2000). Valencione vibracije C-O grupe iz estra daju nekoliko traka u opsegu talasnih brojeva od $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, i u spektru EGDM-a se javljaju kao dve trake jakog intenziteta sa maksimumima na 1295 cm^{-1} i 1155 cm^{-1} , a potiču od asimetričnih i simetričnih vibracija, respektivno. Traka sa maksimumom na 3105 cm^{-1} potiče od asimetričnih valencionih vibracija C-H veze vinilne grupe, dok traka na 2960 cm^{-1} potiče od asimetričnih vibracija C-H veze metil grupe.

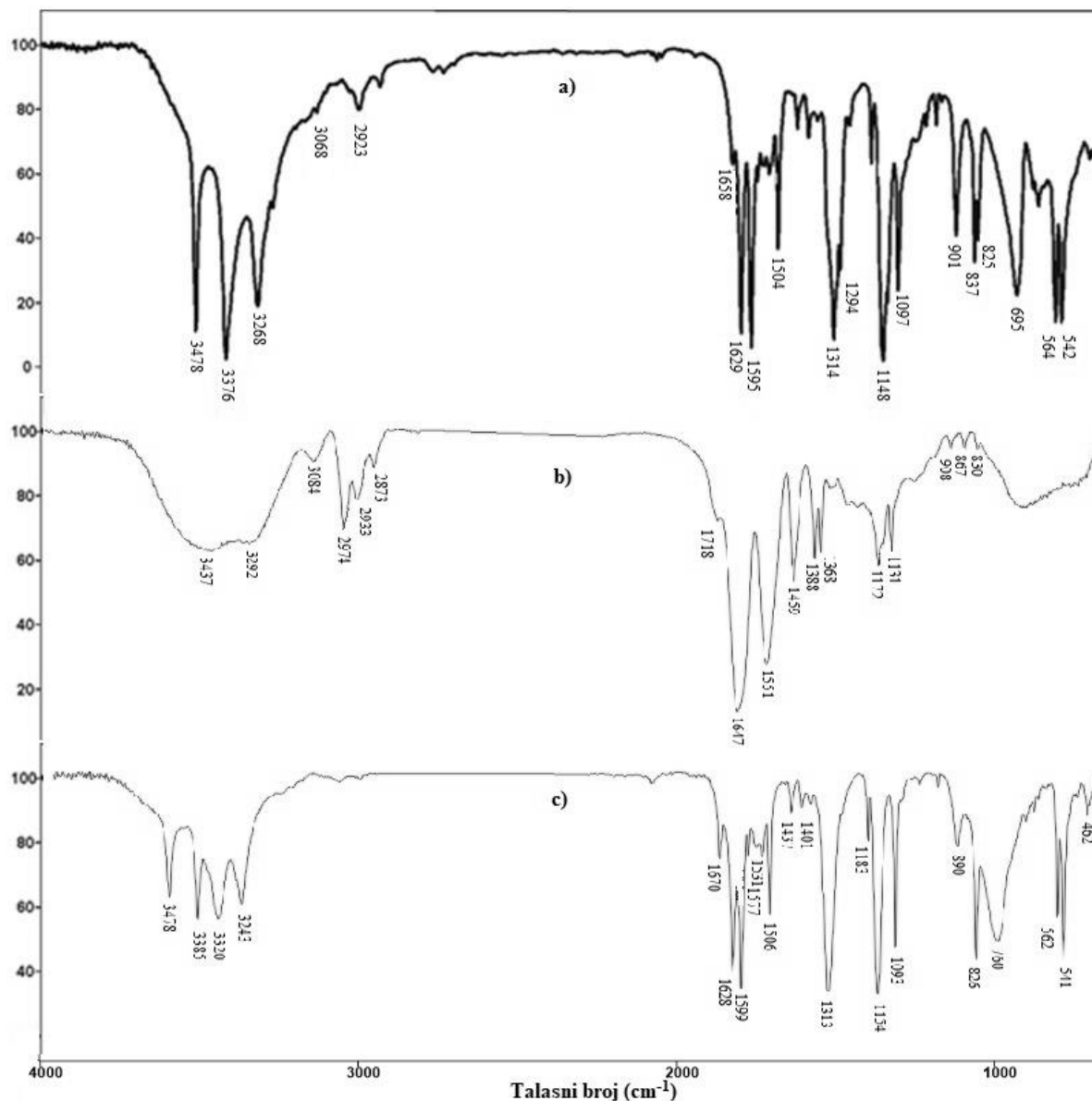
Upoređivanjem FTIR spektra homopolimera p(NIPAM)-a sa spektrima monomera i umreživača, uočava se jasna razlika, koja ukazuje na razliku u strukturi između sintetisanog polimera i početnih reaktanata. Naime, odsustvo traka karakterističnih za monomer i umreživač, kao i promena oblika i pomeranje određenih traka ka nižim ili višim talasnim brojevima, ukazuju na nastanak novih struktura.

FTIR spektri sintetisanih homopolimera p(NIPAM)-a sa 1; 1,5; 2 i 2,5 mol% umreživača, prikazani su na slici 26 a-d, respektivno. Sličnost prikazanih FTIR spektara homopolimera sa različitim sadržajem umreživača ukazuje na sličnost strukture sintetisanih hidrogelova. Odsustvo trake na 1621 cm^{-1} koja potiče od valencionih vibracija C=C veze, u spektrima homopolimera, pokazuje da se polimerizacija dešava vezivanjem monomera preko dvostrukih veza vinilnih grupa. U FTIR spektrima polimera uočava se široka traka u oblasti od 3600 cm^{-1} do 3100 cm^{-1} , koja potiče od valencionih vibracija N-H veze, čiji je maksimum, u odnosu na monomer, pomeren za 6 do 18 jedinica ka višim talasnim brojevima i nalazi se u opsegu od $3289\text{--}3301\text{ cm}^{-1}$. Širina ove trake posledica je preklapanja sa trakom koja potiče od valencionih vibracija O-H veze iz molekula vode (maksimum u opsegu od $3434\text{--}3437\text{ cm}^{-1}$), koji su prisutni u strukturi polimera, i formiranih intramolekulskih vodoničnih veza (Kurečić i sar., 2013). Traka koja potiče od valencionih vibracija C-H veze vinilne grupe, čiji se maksimum u spektru monomera nalazi na 3073 cm^{-1} , znatno je manjeg intenziteta i pomerena je za 1 do 11 jedinica ka većim talasnim brojevima, što dodatno potvrđuje da se polimerizacija dešava raskidanjem dvostruke veze (Kurečić i sar., 2013). U FTIR spektrima polimera, kao i u spektru monomera, prisutne su amidne trake, s tim što je maksimum amidne trake I pomeren za 4 do 11 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva i nalazi se u opsegu $1646\text{--}1653\text{ cm}^{-1}$, a maksimum amidne trake II za 1 do 13 jedinica ka višim vrednostima talasnih brojeva, i nalazi se u opsegu od 1551 cm^{-1} do 1563 cm^{-1} , što pokazuje da C=O i N-H veze učestvuju u formiranju intramolekulskih vodoničnih veza (Katsumoto i sar., 2002). U spektrima polimera, traka koja potiče od valencionih vibracija karbonilne grupe pomerena je za 4-6 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva, javlja se na 1717 cm^{-1} do 1719 cm^{-1} , i značajno je manjeg intenziteta u odnosu na istu traku u spektru umreživača. Razlike koje postoje u intenzitetu i položaju maksimuma između različitih hidrogelova, posledica su variranja sadržaja umreživača i razlika u strukturi sintetisanih homopolimera.



Slika 26. FTIR spektri p(NIPAM)-a sa: a) 1 mol%, b) 1,5 mol%, c) 2 mol%, d) 2,5 mol% umreživača

FTIR spektri sulfanilamida, homopolimernog p(NIPAM) hidrogela sa 2,5 mol% umreživača, kao i p(NIPAM) hidrogela sa 2,5 mol% umreživača i uklopljenim sulfanilamidom, prikazani su na slici 27.



Slika 27. FTIR spektri: a) sulfanilamida, b) p(NIPAM) hidrogela sa 2,5 mol% umreživača, c) p(NIPAM) hidrogela sa 2,5 mol% umreživača i inkorporiranim sulfanilamidom

U FTIR spektru hidrogela sa inkorporiranim sulfanilamidom, u oblasti talasnih brojeva od 3500-3200 cm^{-1} uočavaju se 4 maksimuma koja potiču od valencionih vibracija N-H veza iz sulfanilamida i homopolimera. Maksimumi na 3385 cm^{-1} i 3320 cm^{-1} , koji potiču od asimetričnih valencionih vibracija N-H veze sulfonamidne NH_2 grupe i valencionih vibracija N-H veze hidrogela, pomereni su za 9, odnosno 28 jedinica ka većim talasnim

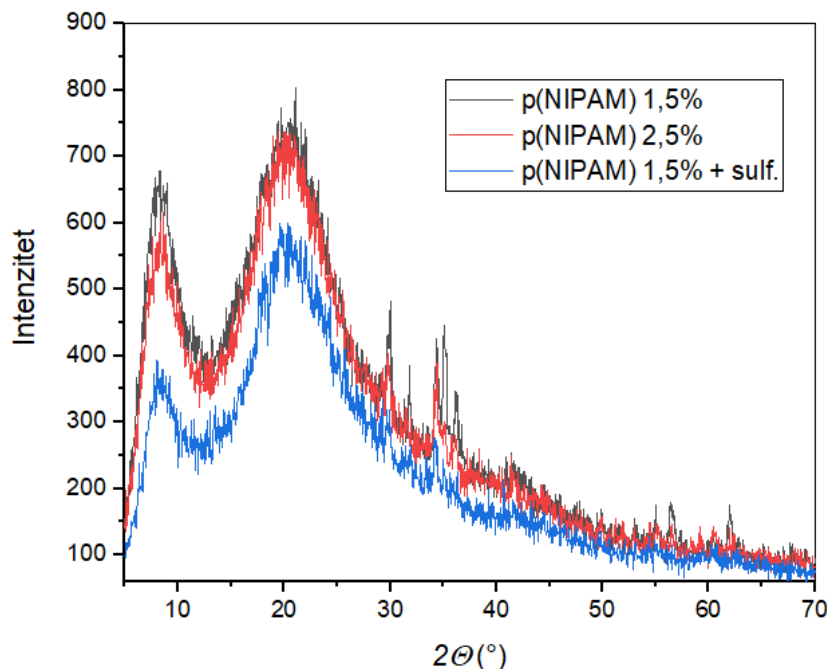
brojevima, respektivno, u odnosu na odgovarajuće maksimume u spektrima sulfanilamida i praznog hidrogela. Maksimum na 3243 cm^{-1} koji odgovara simetričnim vibracijama N-H veze sulfonamidne NH_2 grupe pomeren je za 25 jedinica u odnosu na položaj u spektru sulfanilamida (3268 cm^{-1}), što ukazuje da pomenute grupe učestvuju u građenju vodoničnih veza između molekula sulfanilamida i hidrogela. Amidna traka I, $\nu(\text{C}=\text{O})$, javlja se na 1670 cm^{-1} , dok se amidna traka II, $\delta(\text{N-H})$, javlja na 1577 cm^{-1} , i njihovi maksimumi su pomereni za 23, odnosno 26 jedinica ka većim talasnim brojevima, u odnosu na spektar čistog homopolimera. Pomeranje maksimuma amidnih traka i smanjenje njihovog intenziteta u odnosu na čist homopolimer ukazuje na učestvovanje C=O i -NH grupa u formiranju vodoničnih veza (Katsumoto i sar., 2002). Prisustvo sulfanilamida unutar hidrogela potvrđuje i pojava karakterističnih traka na 1599 cm^{-1} i 1506 cm^{-1} , koje potiču od valencionih vibracija C=C veze aromatičnog prstena sulfanilamida, a koje su pomerene za 4, odnosno 2 jedinice ka višim vrednostima talasnih brojeva, u odnosu na spektar čistog sulfanilamida. Takođe, pojava dve oštre trake jakog intenziteta na 1313 cm^{-1} i 1154 cm^{-1} , koje potiču od valencionih vibracija SO_2 grupe, potvrđuje inkorporiranje sulfanilamida u homopolimerni hidrogel. Jaka traka koja potiče od deformacionih vibracija N-H grupa sulfanilamida pomeren je za 1 jedinicu ka nižim vrednostima talasnih brojeva i javlja se na 1628 cm^{-1} .

Rezultati FTIR analize pokazuju da dolazi do promene intenziteta i pomeranja karakterističnih traka sulfanilamida i homopolimernog hidrogela ka nižim ili višim vrednostima talasnih brojeva, što ukazuje na uklapanje sulfanilamida u strukturu hidrogela.

4.2.3 XRD analiza

Rezultati XRD analize p(NIPAM)-a sa 1,5 i 2,5 mol% umreživača, kao i p(NIPAM)-a sa 1,5 mol% umreživača i uklopljenim sulfanilamidom, prikazani su na slici 28. Svi prikazani difraktogrami sadrže dva široka, nestrukturirana pika, pri čemu je njihov intenzitet nešto manji u slučaju hidrogela sa uklopljenim sulfanilamidom. Sekundarni difrakcioni pik je uži i javlja se na vrednosti ugla difrakcije $2\theta \sim 8^\circ$, dok je fundamentalni pik širi i javlja se na $2\theta \sim 20^\circ$, što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima (Kim i sar., 2000; Liu i sar., 2004; Ribeiro i sar., 2017). Smatra se da je sekundarni pik rezultat interakcija između polimernih lanaca, zbog prisustva voluminoznih bočnih grupa, a da fundamentalni difrakcioni pik potiče od intermolekulskih interakcija nevezanih atoma (Liu i sar., 2004). Široki difrakcioni pikovi niskog intenziteta ukazuju na nizak stepen kristaličnosti ispitivanih uzorka, zbog čega se u literaturi njihova struktura opisuje kao amorfna (Liu i sar., 2004; Ribeiro i

sar., 2017). U difraktogramu uzorka sa uklopljenim sulfanilamidom ne postoje pikovi koji potiču od sulfanilamida, što pokazuje da je sulfanilamid inkorporiran u unutrašnjost hidrogela.

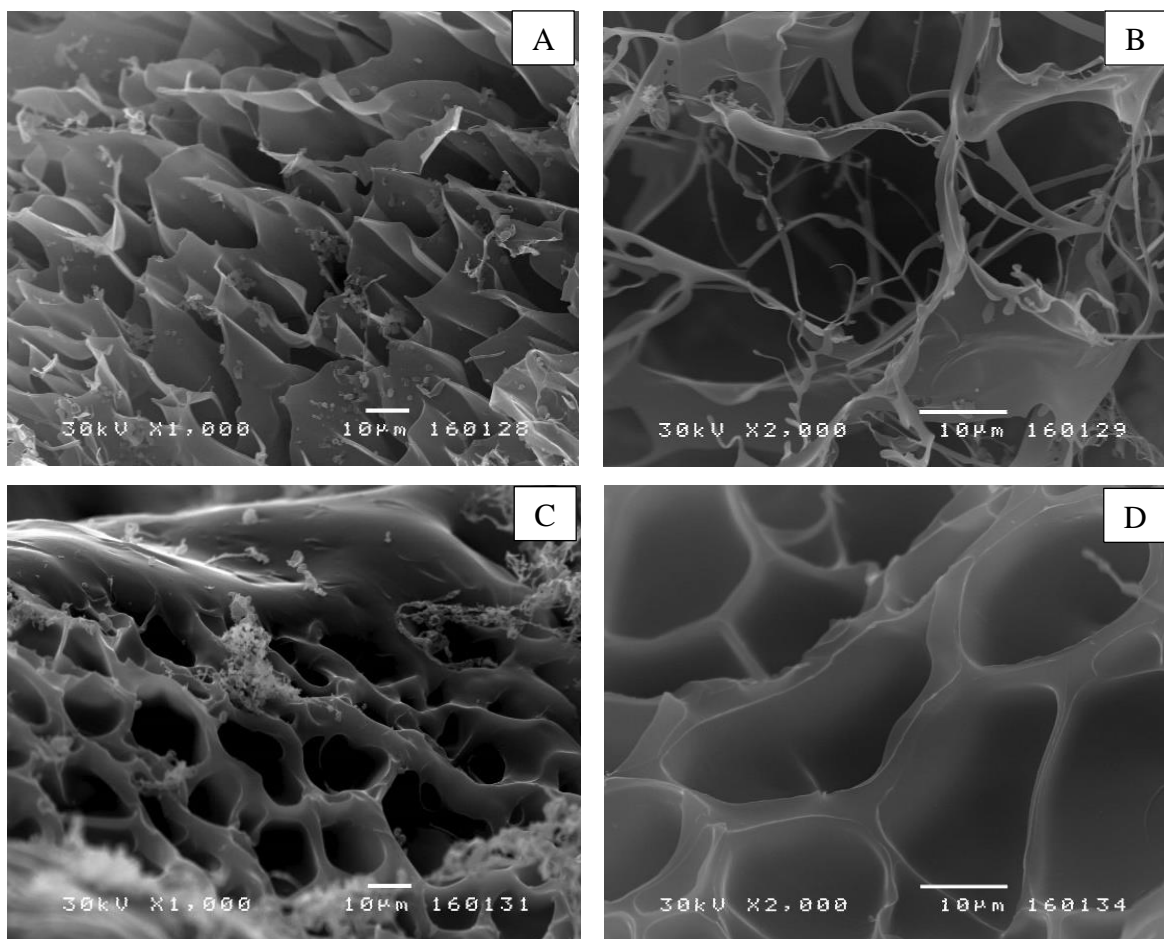


Slika 28. Difraktogrami p(NIPAM)-a sa 1,5 i 2,5 mol% umreživača, i p(NIPAM)-a sa 1,5 mol% umreživača i uklopljenim sulfanilamidom

Rezultati XRD analize su, kao i rezultati analize FTIR spektara, potvrdili da dolazi do inkorporiranja sulfanilamida u šupljine hidrogela.

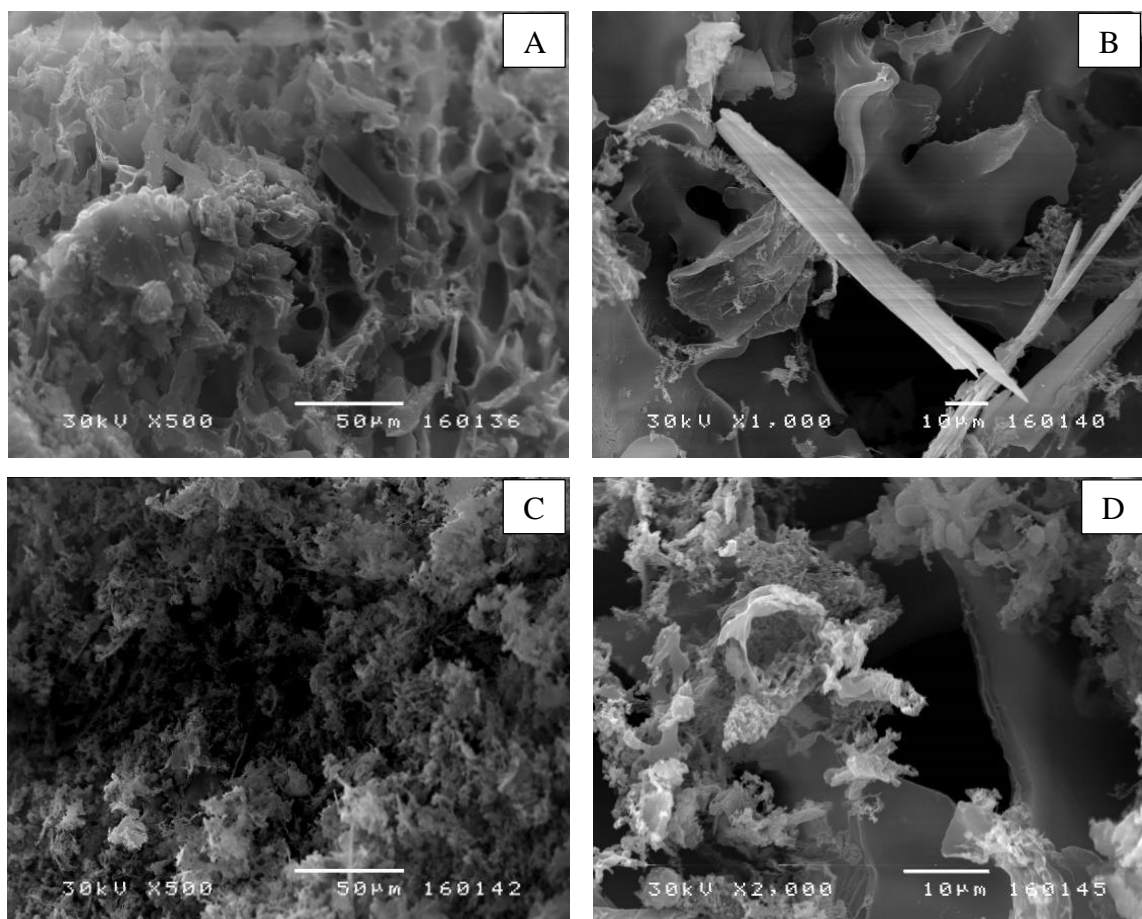
4.2.4 SEM analiza

SEM mikrografije liofiliziranih uzoraka hidrogelova p(NIPAM)-a sa 1,5 i 2,5 mol% umreživača, prethodno nabubrelih do ravnoteže, pri različitim uvećanjima, kao i liofiliziranih hidrogelova p(NIPAM)-a sa 1,5 i 2,5 mol% umreživača i uklopljenim sulfanilamidom, prikazane su na slikama 29 i 30, respektivno.



Slika 29. SEM p(NIPAM) hidrogela sa: a) 1,5 mol% (1000×), b) 1,5 mol% (2000×), c) 2,5 mol% (1000×), i d) 2,5 mol% (2000×) umreživača

Na SEM mikrografijama liofiliziranih uzoraka (slika 29) uočava se porozna struktura sintetisanih hidrogelova, sa porama promera oko 30 μm . Kod hidrogelova sa manjim sadržajem umreživača, trodimensionalna mreža je nepravilna, sa mnoštvom međusobno povezanih pora. Hidrogelovi sa većim sadržajem umreživača sadrže pore pravilnijeg oblika i debljih zidova, nalik kanalima, što daje tubularnu mikrostrukturu hidrogelova (Ma i sar., 2017). Ovakva struktura hidrogelova olakšava ulazak i izlazak vode iz hidrogelske mreže, što je posebno važno u primeni hidrogelova kao nosača farmakološki aktivnih supstanci.



Slika 30. SEM p(NIPAM) hidrogela sa uklopljenim sulfanilamidom sa: a) 1,5 mol% (500×), b) 1,5 mol% (1000×), c) 2,5 mol% (500×), i d) 2,5 mol% (2000×) umreživača

Upoređivanjem SEM mikrografija uzoraka hidrogelova sa uklopljenim sulfanilamidom (slika 30) sa mikrografijama praznih hidrogelova (slika 29) uočava se jasna razlika u izgledu površinskih struktura hidrogela. Ipak, postoje i površine sa strukturom sličnom praznom hidrogelu. Pored toga, na mikrografijama se uočavaju i nepravilno raspoređeni kristali sulfanilamida, što pokazuje da je deo aktivne supstance uklopljen u kanale i pore unutrašnjosti hidrogela, dok je deo zaostao na površini.

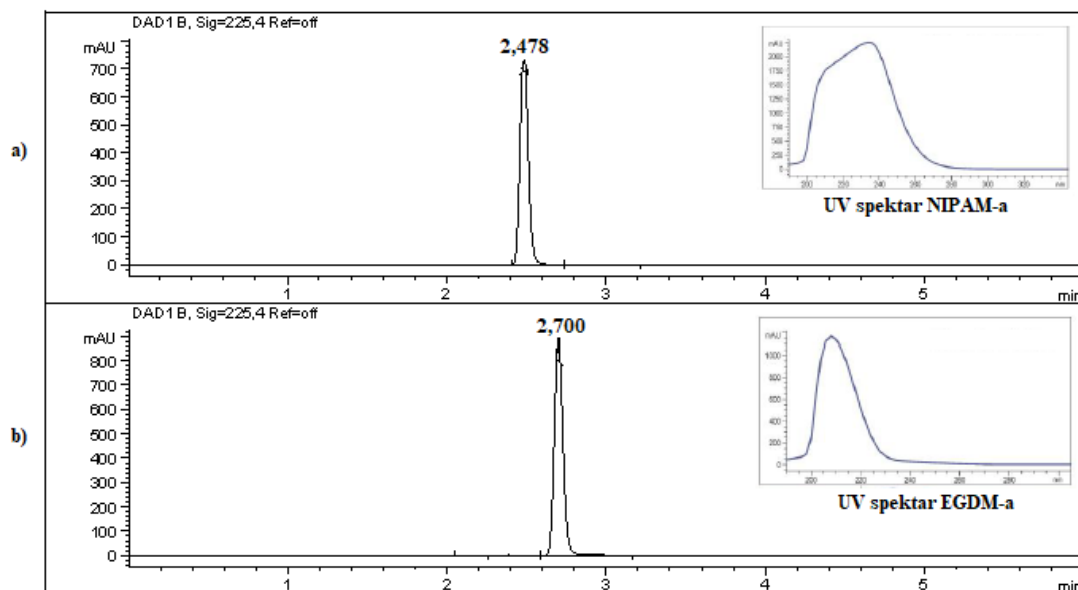
Rezultati fizičko-hemijskih metoda primenjenih za karakterizaciju praznih hidrogelova i hidrogelova sa uklopljenim sulfanilamidom pokazali su da je sulfanilamid inkorporiran u sintetisane hidrogelove.

4.2.5 HPLC analiza rezidualnih reaktanata

Polimerizacija je retko 100% efikasan proces, a naknadni postupci prečišćavanja obično ne mogu u potpunosti da uklone zaostale reaktante. Rezidualni molekuli monomera i

umreživača menjaju mehanička svojstva materijala, a često predstavljaju i komponente štetne po zdravlje, zbog čega njihov sadržaj u polimeru mora biti pažljivo kontrolisan, kako bi polimer bio bezbedan za upotrebu. Prisustvo zaostalih molekula monomera ili umreživača može da dovede do iritacije kože, oka i respiratornog trakta, kao i do alergijskih reakcija, poput kontaktnog dermatitisa (Pemberton i Lohmann, 2014). Iz navedenih razloga, posebnu pažnju treba obratiti na uslove polimerizacije ili primeniti neki od naknadnih postupaka za smanjenje sadržaja rezidualnih reaktanata u sintetisanim polimerima. Tehnike za smanjenje sadržaja rezidualnih reaktanata se mogu podeliti na hemijske, kod kojih zaostali reaktanti formiraju nove polimerne lance ili novo jedinjenje manje toksičnosti, koje se lakše uklanja ili je manje isparljivo, i fizičke, kod kojih se rezidualni reaktanti uklanjaju isparavanjem, ekstrakcijom pogodnim rastvaračima ili upotrebom jonoizmenjivačkih smola (Araujo i sar., 2002). Kostić i saradnici su pokazali da jednostavnim stajanjem akrilatnih proteza u vodi sobne temperature tokom jednog do 7 dana, sadržaj rezidualnih reaktanata u njima višestruko opada (Kostić i sar., 2009).

U cilju određivanja sadržaja rezidualnih reaktanata u sintetisanim hidrogelovima p(NIPAM)-a izvršena je HPLC analiza metanolnih rastvora dobijenih trodnevnom potapanjem sintetisanih hidrogelova. Izabrana talasna dužina detekcije iznosila je 225 nm. Pri opisanim uslovima analize (odjeljak 3.3.1.7), hromatografski pikovi koji potiču od monomera NIPAM-a i umreživača EGDM-a su dobro razdvojeni, sa retencionim vremenima na $R_t = 2,478$ min i $R_t = 2,700$ min, respektivno (slika 31).



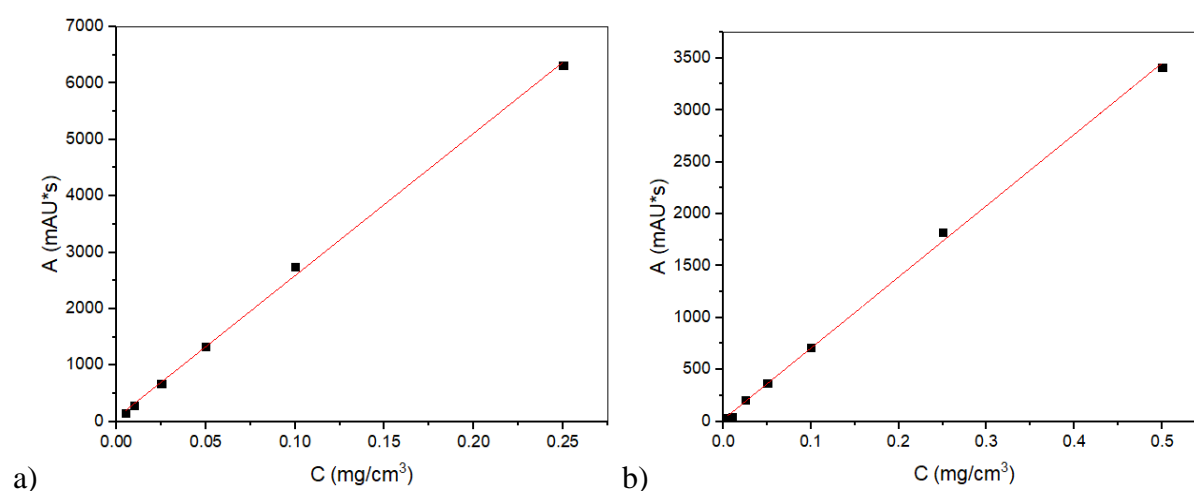
Slika 31. HPLC hromatogrami i odgovarajući UV spektri: a) monomera NIPAM-a, b) umreživača EGDM-a

Kalibracione krive za određivanje sadržaja monomera NIPAM-a i umreživača EGDM-a u metanolnim rastvorima prikazane su na slici 32, respektivno. Zavisnost površine pika od koncentracije NIPAM-a linearna je u opsegu 0,005-0,25 mg/cm³, pri čemu važi jednačina 11, sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,9989$, dok je zavisnost površine pika od koncentracije EGDM-a linearna u opsegu 0,005-0,5 mg/cm³, pri čemu važi jednačina 12, sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,9987$:

$$A = 25231 c + 67,074 \quad (11)$$

$$A = 6864,4 c + 20,97 \quad (12)$$

gde je: A površina pika (mAU*s), a c koncentracija odgovarajućeg reaktanta (mg/cm³).



Slika 32. Kalibracione krive: a) NIPAM-a, b) EGDM-a

Sadržaj neproreagovalih reaktanata u uzorcima sintetisanih homopolimernih hidrogelova (mg/g hidrogela), kao i njihov udeo u odnosu na početnu masu u reakcionoj smeši, prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Sadržaj rezidualnih reaktanata u sintetisanim hidrogelovima u odnosu na ukupnu masu sintetisanih hidrogelova i u odnosu na početnu masu u reakcionoj smeši

Hidrogel	Sadržaj	Sadržaj	Sadržaj	Sadržaj
	NIPAM-a, mg/g	NIPAM-a, %	EGDM-a, mg/g	EGDM-a, %
p(NIPAM) 1%	18,81	1,91	2,19	1,73
p(NIPAM) 1,5%	16,51	1,69	2,45	1,88
p(NIPAM) 2%	9,16	0,95	1,82	1,86
p(NIPAM) 2,5%	11,41	1,19	1,66	1,29

Sadržaj rezidualnog monomera NIPAM-a kreće se u opsegu od 0,95-1,91%, dok je opseg nešto uži za sadržaj umreživača i iznosi 1,29-1,88%, u odnosu na njihov početni sadržaj u reakcionoj smeši. Prikazani podaci pokazuju da je najveći deo (>98%) monomera i umreživača iskorišćen u sintezi polimera, i da je zaostala količina rezidualnih reaktanata u granicama tolerancije (ISO 1567, 1999).

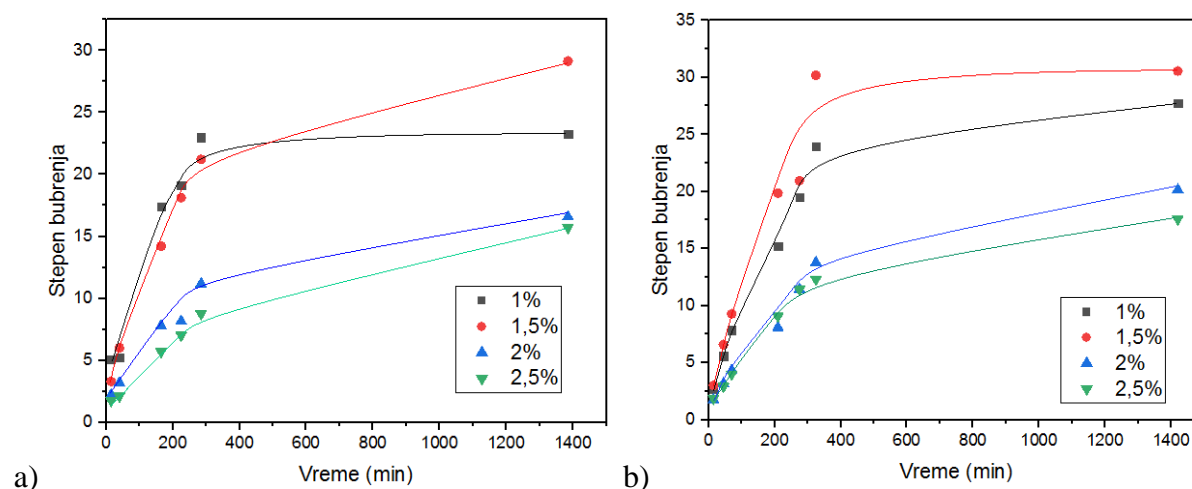
Nizak sadržaj rezidualnih reaktanata u sintetisanim hidrogelovima predstavlja jedan od osnovnih uslova za njihovu primenu kao nosača farmakološki aktivnih supstanci u medicini i farmaciji. U slučaju kada sinteza nije dovoljno efikasna, postpolimerizacioni tretmani imaju veliku ulogu u smanjivanju sadržaja zaostalih reaktanata u polimerima.

4.2.6 Bubrenje hidrogelova

Kapacitet bubrenja hidrogela zavisi od osobina monomera koji ulaze u sastav hidrogela i stepena umreženja, ali i od osobina medijuma u kome se bubrenje odvija, poput pH vrednosti i temperature.

4.2.6.1 Ispitivanje uticaja pH i sadržaja umreživača na bubrenje hidrogelova

Bubrenje uzoraka p(NIPAM) hidrogelova sa različitim sadržajem umreživača praćeno je u rastvorima pH vrednosti 2,2 i 7,4 na temperaturi od 20 °C. Stepenn bubrenja je računat prema jednačini 6. Na slici 33 prikazani su profili bubrenja, koji predstavljaju zavisnost stepena bubrenja od vremena, za p(NIPAM) hidrogelove sa različitim sadržajem umreživača, pri različitim pH vrednostima.



Slika 33. Profili bubrenja p(NIPAM) hidrogelova različitog stepena umreženja na: a) pH=2,2 i b) pH=7,4 na 20 °C

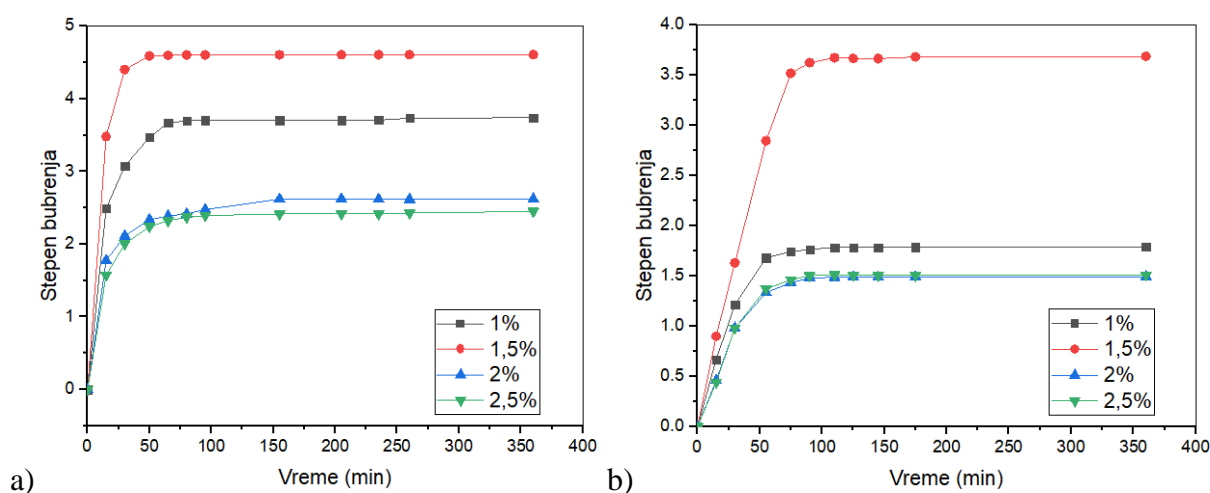
Dobijene vrednosti stepena bubrenja p(NIPAM) hidrogelova sa različitim sadržajem umreživača u rastvoru pH=2,2 (slika 33 a) slične su vrednostima stepena bubrenja odgovarajućih hidrogelova pri pH=7,4 (slika 33 b), što ukazuje da homopolimerni p(NIPAM) hidrogelovi nisu osetljivi na promenu pH vrednosti sredine, a što je u saglasnosti sa njihovom hemijskom strukturom i rezultatima drugih autora (Taşdelen i sar., 2004). Naime, hidrogelovi p(NIPAM)-a ne sadrže funkcionalne grupe podložne jonizaciji, zbog čega spadaju u nejonske hidrogelove i ne reaguju na promene pH vrednosti sredine.

Kod svih ispitivanih uzoraka, stepen bubrenja se povećava naglo tokom prvih 300 minuta, a zatim postepeno, sve do dostizanja ravnotežne vrednosti. Najveći stepen bubrenja na sobnoj temperaturi ima hidrogel sa sadržajem umreživača 1,5 mol% u rastvoru pH=7,4, pri čemu 1 g hidrogela može da veže 30,55 g rastvora. Uzorak istog hidrogela u rastvoru pH=2,2 ima stepen bubrenja 29,14. Uzorci p(NIPAM) hidrogela sa 1 mol% umreživača imaju manje stepene bubrenja od hidrogela sa 1,5 mol% umreživača, jer nije postignuta dovoljna gustina umreženja hidrogela, usled male koncentracije umreživača. Sa druge strane, najmanji stepen bubrenja poseduje hidrogel sa najvećim sadržajem umreživača (2,5 mol%) na obe pH vrednosti, kod koga 1 g apsorbuje svega 17,58 g rastvora pri pH=7,4, odnosno 15,71 g pri pH=2,2, što je gotovo upola manje u odnosu na hidrogel sa najvećim stepenom bubrenja. Na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da sa povećanjem sadržaja umreživača opada stepen bubrenja hidrogela, što potvrđuje da sastav hidrogela utiče na karakteristike bubrenja, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Kurečić i sar., 2012; Tsao i sar., 2010). Naime, sa povećanjem sadržaja umreživača povećava se gustina umreženja hidrogelova, a smanjuju se pokretljivost polimernih lanaca i dužine grana, zbog čega hidrogelovi sa većim sadržajem umreživača imaju manju sposobnost apsorbovanja vode, što vodi manjem stepenu bubrenja.

Upoređivanjem dobijenih rezultata sa dostupnim literaturnim podacima za hidrogelove umrežene drugačijim umreživačem i/ili dobijene drugačijom metodom polimerizacije, uočavaju se razlike u stepenu bubrenja. Tako, p(NIPAM) hidrogelovi dobijeni slobodno-radikalskom polimerizacijom monomera NIPAM-a uz primenu *N,N'*-metilenbis(akrilamida) (MBA) kao umreživača imaju značajno manji stepen bubrenja u odnosu na p(NIPAM) hidrogelove dobijene slobodno-radikalskom polimerizacijom primenom umreživača EGDM-a. Hidrogel p(NIPAM)-a sa 1,5 mol% MBA ima stepen bubrenja svega 4,5 na 25 °C (Tsao i sar., 2010), dok p(NIPAM) sa 1,5 mol% EGDM-a poseduje stepen bubrenja 30,55 na istoj temperaturi. Hidrogelovi p(NIPAM)-a dobijeni UV polimerizacijom uz primenu 1 mol% MBA kao umreživača mogu da vežu 24 g rastvora po gramu hidrogela

(Kurečić i sar., 2012), dok p(NIPAM) sa 1 mol% EGDM-a apsorbuje 27,7 g rastvora. Sve ovo pokazuje da, pored sadržaja umreživača, vrsta umreživača i način polimerizacije takođe utiču na stepen bubrenja hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a.

Profili bubrenja p(NIPAM) hidrogelova sa različitim sadržajem umreživača na temperaturi od 38 °C, pri različitim pH vrednostima, prikazani su na slici 34.

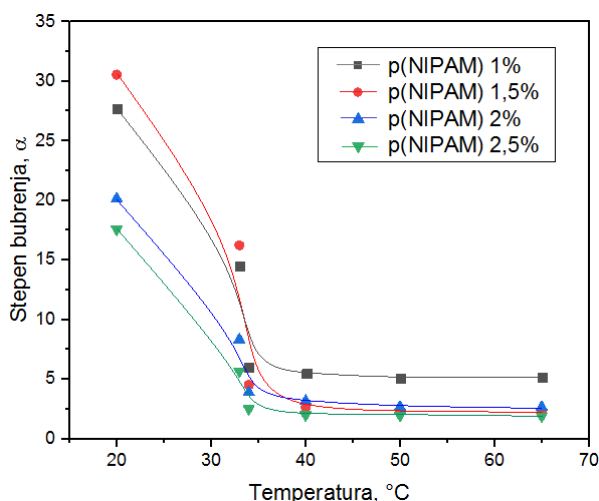


Slika 34. Profili bubrenja p(NIPAM) hidrogelova različitog stepena umreženja na: a) pH=2,2 i b) pH=7,4 na 38 °C

Vrednosti stepena bubrenja hidrogelova na 38 °C (slika 34) su višestruko niže nego na 20 °C (slika 33). Naime, prikazani rezultati bubrenja hidrogelova na temperaturi od 38 °C potvrđuju da su hidrogelovi na temperaturama iznad VPTT kontrahovani, usled jačih hidrofobnih intramolekulskih interakcija, zbog čega njihov stepen bubrenja ne prelazi vrednost 5. Sa aspekta sadržaja umreživača, hidrogelovi na 38 °C se ponašaju na isti način kao i hidrogelovi na sobnoj temperaturi, odnosno sa porastom sadržaja umreživača opada stepen bubrenja hidrogelova.

4.2.6.2 Uticaj temperature na bubrenje hidrogelova

Ponašanje p(NIPAM) kserogelova prilikom bubrenja u destilovanoj vodi je praćeno u opsegu temperatura od 20-65°C, u cilju ispitivanja njihove termoosetljivosti. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 35.



Slika 35. Promena stepena bubrenja hidrogelova p(NIPAM)-a sa različitim sadržajem umreživača u zavisnosti od temperature

Svi ispitivani uzorci hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a pokazuju osetljivost na promenu temperature, pri čemu sa povećanjem temperature opada stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova, što ih svrstava u negativno temperaturno-osetljive hidrogelove. Naglo smanjenje stepena bubrenja kod svih ispitivanih hidrogelova dešava se pri promeni temperature od 33 °C do 34 °C, što predstavlja temperaturu zapreminskog faznog prelaza (Means i sar., 2017). Dalje povećanje temperature vodi daljem smanjenju stepena bubrenja. Pored toga, stepen bubrenja očekivano opada sa povećanjem sadržaja umreživača, jer se povećava gustina umreženja hidrogela i ograničava pokretljivost polimernih lanaca (Tsao i sar., 2010).

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata može se zaključiti da homopolimerni hidrogelovi p(NIPAM)-a nisu osetljivi na promenu pH vrednosti, ali da reaguju na promenu temperature okolne sredine.

Kinetički parametri bubrenja (difuzioni ekponent, n , konstanta bubrenja karakteristična za određenu vrstu polimerne mreže, k , i koeficijent difuzije, D) p(NIPAM) hidrogelova na temperaturi od 20 °C i pH=7,4, prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Kinetički parametri bubrenja p(NIPAM) hidrogelova na 20 °C pri pH=7,4

Hidrogel	n	$k \times 10^3$ (min ^{1/n})	R^2	$D \times 10^6$ (cm ² /min)
p(NIPAM) 1 mol%	0,671	15,85	0,9984	4,427
p(NIPAM) 1,5 mol%	0,683	15,95	0,9956	4,483
p(NIPAM) 2 mol%	0,626	15,26	0,9906	4,104
p(NIPAM) 2,5 mol%	0,639	16,62	0,9803	4,867

Vrednosti difuzionog eksponenta n , za sintetisane homopolimerne hidrogelove na bazi p(NIPAM)-a, kreću se u opsegu od 0,626-0,683 (tabela 9), što ukazuje na anomalni transport, odnosno ne-Fick-ovu difuziju tečnosti u gel ($0,5 < n < 1$) (Ganji i sar., 2010; Ritger i Peppas, 1987).

4.2.7. Hidrogelovi kao sistemi za modifikovano oslobađanje sulfanilamida

Inteligentna reakcija hidrogelova na promenu temperature i VPTT bliska fiziološkoj temperaturi ljudskog organizma svrstavaju hidrogelove na bazi p(NIPAM)-a u potencijalne nosače farmakološki aktivnih supstanci, zbog čega su i ispitivani kao sistemi za modifikovano oslobađanje sulfanilamida.

4.2.7.1 Inkorporiranje sulfanilamida u hidrogelove

Sadržaj sulfanilamida u hidrogelovima p(NIPAM)-a različitog stepena umreženja određen je merenjem mase uzoraka hidrogelova pre i posle bubrenja u rastvoru sulfanilamida. Efikasnost uklapanja sulfanilamida u hidrogel, η , izračunava se pomoću jednačine 13:

$$\eta (\%) = \frac{L_g}{L_u} \cdot 100 \quad (13)$$

pri čemu je: L_g - masa sulfanilamida uklopljenog u hidrogel ($\text{mg/g}_{\text{kserogela}}$), a L_u - maksimalna dostupna masa sulfanilamida za uklapanje u hidrogel ($\text{mg/g}_{\text{kserogela}}$).

U tabeli 10 su prikazane vrednosti efikasnosti uklapanja sulfanilamida (%) za uzorke p(NIPAM) hidrogelova različitog stepena umreženja.

Tabela 10. Masa uklopljenog sulfanilamida (L_g) i efikasnost uklapanja (η) za uzorke hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a

Hidrogel	Masa kserogela (g)	L_g sulfanilamida ($\text{mg/g}_{\text{kserogela}}$)	η sulfanilamida (%)
p(NIPAM) 1 mol%	0,0473	461,74	87,36
p(NIPAM) 1,5 mol%	0,0509	450,55	91,73
p(NIPAM) 2 mol%	0,0489	479,91	93,87
p(NIPAM) 2,5 mol%	0,0509	468,05	95,29

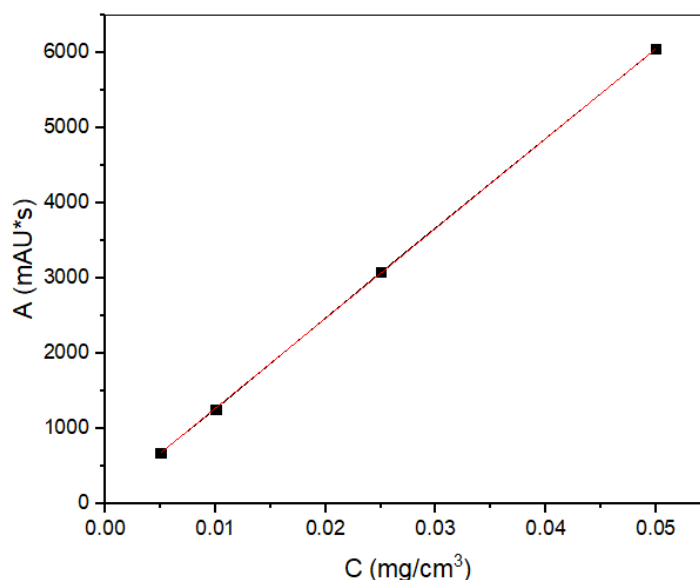
Rezultati prikazani u tabeli 10 pokazuju zadovoljavajuću efikasnost uklapanja sulfanilamida u svim uzorcima hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a, pri čemu se količina uklopljenog sulfanilamida kreće u opsegu od 450,55 mg/g do 479,91 mg/g kserogela. Efikasnost uklapanja raste sa povećanjem stepena umreženja hidrogelova, a kreće se u opsegu od 87,36% za hidrogel sa 1 mol% umreživača do 95,29% za hidrogel sa 2,5 mol% umreživača. Lee i Huang (2008) su pretpostavili da sulfanilamid može da interaguje sa GMA, jedinjenjem sa strukturom sličnom EGDM-u, zbog čega je sadržaj uklopljenog sulfanilamida bio veći kod uzoraka sa većim sadržajem GMA, uprkos manjem stepenu bubrenja.

4.2.7.2 Oslobađanje sulfanilamida iz hidrogelova

Sadržaj sulfanilamida oslobođenog iz hidrogelova različitog stepena umreženja na temperaturi od 38 °C na pH=2,2 i pH=7,4 praćen je HPLC metodom. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja sulfanilamida prikazana je na slici 36. Zavisnost površine pika od koncentracije sulfanilamida linearna je u opsegu 0,005-0,05 mg/cm³, pri čemu važi jednačina 14, sa koeficijentom linearne korelacije $R^2 = 0,99997$:

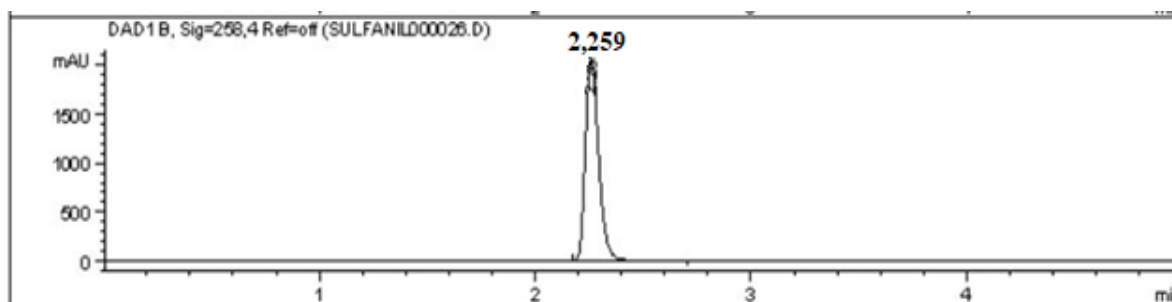
$$A = 119615,7 c + 76,27 \quad (14)$$

gde je: A površina pika (mAU*s), a c koncentracija sulfanilamida (mg/cm³).



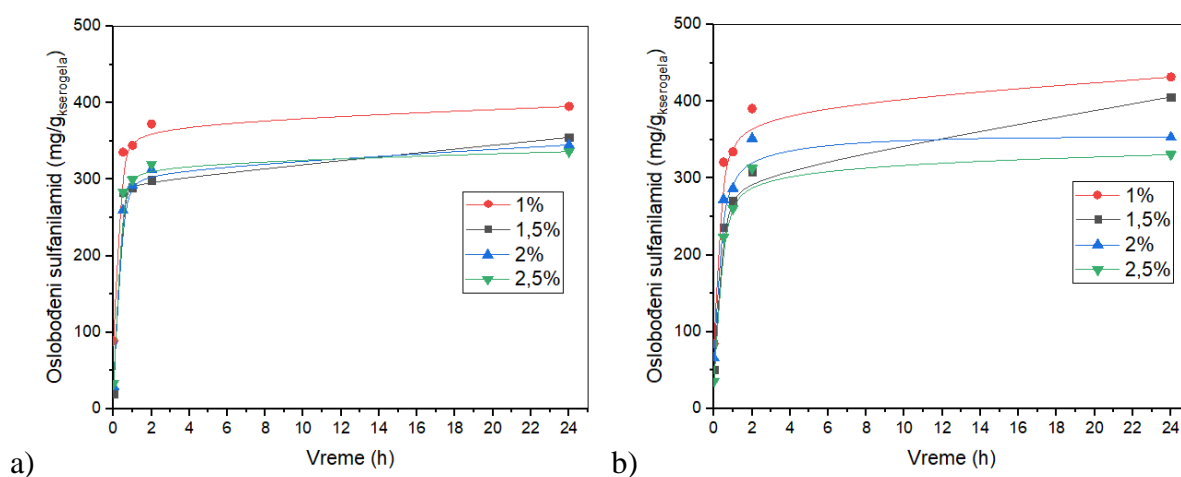
Slika 36. Kalibraciona kriva za sulfanilamid

Pri definisanim uslovima HPLC analize, sulfanilamid daje pik na retencionom vremenu $R_t = 2,259$ min (slika 37).



Slika 37. HPLC hromatogram sulfanilamida

Oslobađanje sulfanilamida iz hidrogelova na bazi p(NIPAM)-a različitog stepena umreženja na temperaturi od 38°C u rastvorima pH=2,2 i pH=7,4, koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu, prikazano je na slici 38 a i b, respektivno.



Slika 38. Količina oslobođenog sulfanilamida iz hidrogelova na 38°C u rastvorima a) pH=2,2 i b) pH=7,4

Analizom dobijenih rezultata uočava se da se najveća količina sulfanilamida oslobodi iz uzorka p(NIPAM)-a sa najmanjim sadržajem umreživača u rastvoru pH vrednosti 7,4. Pri navedenim uslovima, oslobodi se 431,83 mg/g_{kserogela}, što predstavlja 93,5% uklopljenog sulfanilamida. Nešto manja količina sulfanilamida se oslobodi iz istog uzorka hidrogela u kiseloj sredini, i to 395,48 mg/g_{kserogela}, odnosno 85,6% uklopljenog sulfanilamida, što je u skladu sa rezultatima bubrenja. Takođe, može se primetiti da se sa povećanjem sadržaja umreživača smanjuje količina oslobođenog sulfanilamida. Tako se iz hidrogela sa 2,5 mol% EGDM-a oslobodi svega 336,24 mg/g_{kserogela} pri pH=7,4, odnosno 330,84 mg/g_{kserogela} pri pH=2,2, što iznosi 73,3%, odnosno 71,8% uklopljenog sulfanilamida, respektivno. Može se pretpostaviti da umrežene strukture ometaju kontrakciju hidrogela na temperaturama iznad

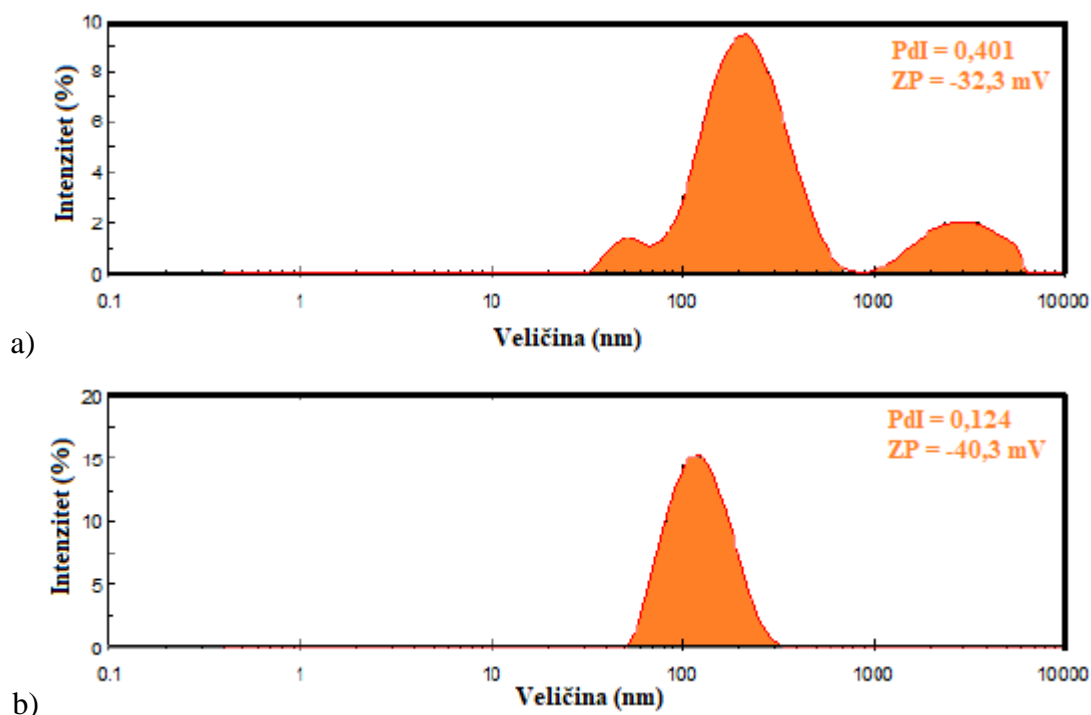
VPTT, čime usporavaju difuziju tečnosti iz hidrogela (Lee i Yeh, 2005; Zhang i sar., 2004). Dakle, veći sadržaj umreživača dovodi do povećanja gustine hidrogelske mreže, većeg zadržavanja tečnosti i sporijeg oslobađanja leka iz hidrogela, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Tsao i sar., 2010).

4.3 Liposomi

4.3.1 Karakterizacija liposoma sa sulfanilamidom

Struktura i integritet liposoma su važna svojstva koja odražavaju sposobnost liposoma i liposomskih formulacija da prime i zadrže inkorporiranu aktivnu supstancu. Za potpunu karakterizaciju liposomske formulacije potrebno je odrediti mnogo različitih parametara, poput morfologije i lamelarnosti liposoma, površinskih karakteristika, uključujući naelektrisanje, veličine liposoma i viskoziteta liposomske disperzije, kao i profil *in vitro* oslobađanja aktivne supstance iz liposoma pod određenim eksperimentalnim uslovima (FDA, 2018). Ipak, veličina liposoma, raspodela veličina liposoma i zeta potencijal jesu osnovne i kritične karakteristike vezikularnih sistema, pre svega sa aspekta kvaliteta i stabilnosti, ali i sa aspekta bezbednosti njihove primene.

Na slici 39 prikazana je raspodela veličina liposoma sa inkorporiranim sulfanilamidom pre i posle ekstrudiranja kroz polikarbonatni filter promera pora 100 nm.

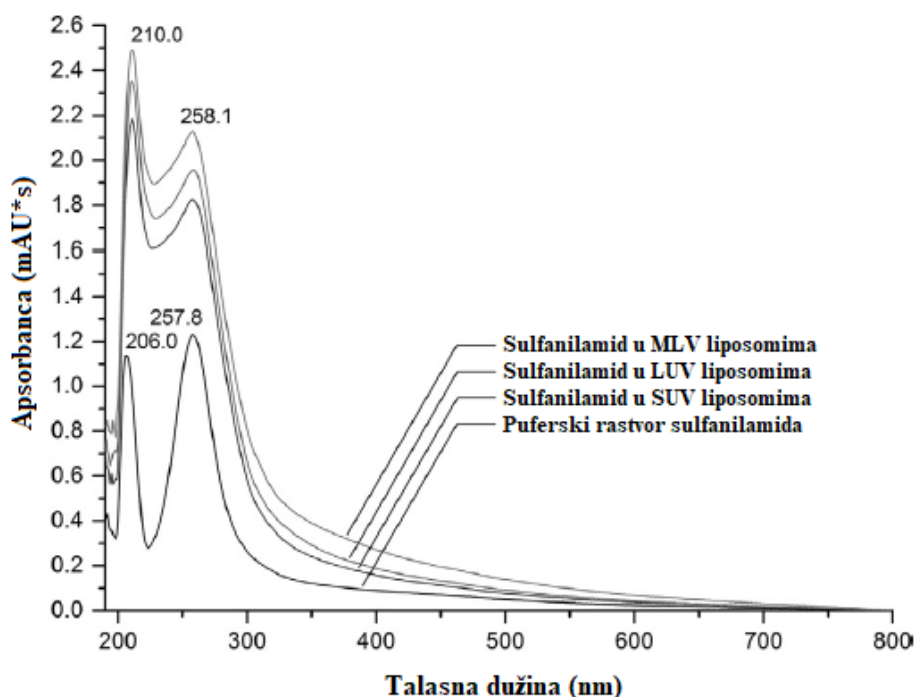


Slika 39. Raspodela veličine liposoma sa sulfanilamidom: (a) pre i (b) posle ekstrudiranja kroz filter promera pora 100 nm

Pre ekstrudiranja, liposomna disperzija predstavlja smešu liposoma različite lamelarnosti i veličine, pri čemu se najveći broj liposoma nalazi u opsegu veličina od 100 do 1000 nm. Indeks polidisperznosti ovakve liposomske disperzije je visok ($PdI = 0,401$), što ukazuje na neuniformnost veličine čestica i težnju ka aglomeraciji. Sa druge strane, prosečna veličina liposoma nakon ekstrudiranja iznosi 116 nm, sa vrlo uskom raspodelom veličina čestica ($PdI = 0,124$).

Zeta potencijal je još jedna važna karakteristika i odražava stabilnost liposomskih disperzija. Visoke apsolutne vrednosti zeta potencijala dovode do elektrostatičkog odbijanja liposoma, čime se sprečava njihova aglomeracija i povećava stabilnost liposomske disperzije. Smatra se da apsolutne vrednosti zeta potencijala veće od 30 mV ukazuju na dobru fizičku stabilnost koloidnog sistema (Müller i sar., 2012). Dobijene vrednosti zeta potencijala za liposomsku disperziju pre i posle ekstrudiranja iznose -32,3 mV, odnosno -40,3 mV, respektivno. Veća apsolutna vrednost zeta potencijala liposomske disperzije nakon ekstrudiranja, uz uniformnu veličinu čestica, potvrđuje njenu veću stabilnost.

Za brzu procenu veličine i lamelarnosti izrađenih liposoma korišćena je UV-Vis apsorpciona spektroskopija. UV-Vis apsorpcioni spektri liposoma različite veličine i lamelarnosti sa inkorporiranim sulfanilamidom, kao i spektar puferkog rastvora sulfanilamida koncentracije 1×10^{-5} M, prikazani su na slici 40.



Slika 40. UV-Vis spektri sulfanilamida inkorporiranog u MLV, LUV i SUV liposomima i spektar sulfanilamida u puferu

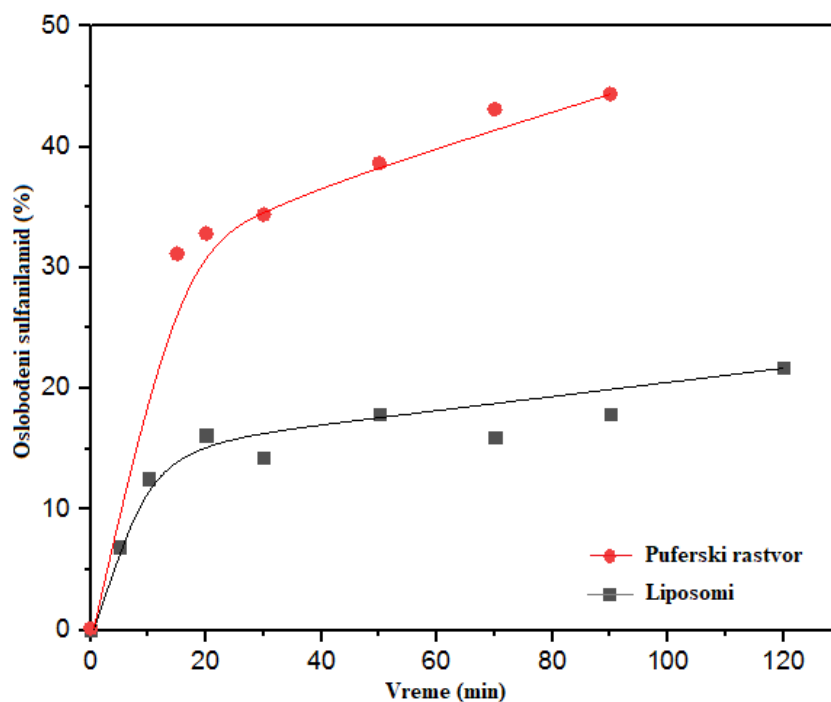
Na osnovu prethodnih istraživanja (Khankhasaeva i sar., 2015; Silverstein i sar., 2014), poznato je da apsorpcioni spektri sulfanilamida imaju intenzivni apsorpcioni maksimum na oko 260 nm. Centralna hromofora sulfanilamida je benzenov prsten sa maksimumom apsorpcije na oko 255 nm (Friedel i Orchin, 1951). Međutim, prisustvo amino grupa i slobodnih elektronskih parova, dovodi do batohromnog pomeranja apsorpcione trake u sulfanilamidu, zbog čega se ona javlja na ~258 nm.

Liposomi rasejavaju svetlost, što utiče na apsorpcione spektre, zbog čega se bazna linija ne poklapa u potpunosti sa x -osom u slučaju spektara sulfanilamida u liposomima različite veličine i lamelarnosti. Rasejavanje svetlosti ili Rejljevo rasejavanje (eng. *Rayleigh scattering*) kod MLV liposoma je drugačije od onog kod SUV i LUV vezikula (Wittung i sar., 1994). Naime, zbog većeg sadržaja liposoma različite veličine i lamelarnosti, rasejavanje svetlosti, a samim tim i odstupanje od bazne linije je veće kod MLV liposoma. Rejljevo rasejavanje se primenjuje za čestice prečnika manjeg od $\lambda/20$ i omogućava brzu procenu dimenzija liposoma (Patrascu i sar., 2010; Wittung i sar., 1994).

Apsorpcioni spektri sulfanilamida u liposomima i puferu su slični po obliku pikova, ali je položaj pikova u liposomima pomeren ka većim vrednostima talasnih dužina (od 257,8 na 258,1 nm), zbog različite mikrookoline. Naime, verovatni način inkorporiranja sulfanilamida u liposome podrazumeva njegovo uklapanje u polarnu unutrašnjost liposoma. Stoga, pomeranje maksimuma sulfanilamida u liposomima verovatno nastaje zbog uticaja polarne sredine u kojoj se molekul sulfanilamida nalazi, a to je vodena sredina u unutrašnjosti liposoma.

4.3.2 *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida iz liposoma

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja sulfanilamida sprovedeno je primenom tehnike sa dijaliznim vrećicama (Bhardwaj i Burgess, 2010; D'Souza, 2014), pri čemu liposomska disperzija sa inkorporiranim sulfanilamidom, odnosno puferški rastvor sulfanilamida u dijaliznim vrećicama, predstavlja donatorsku fazu, a čist puferški medijum koji okružuje dijalizne vrećice predstavlja akceptorsku fazu. Procenat oslobođenog sulfanilamida iz liposomske disperzije i iz kontrolnog puferškog rastvora određen je u prethodno definisanim vremenskim intervalima primenom UV-Vis spektroskopije, a dobijeni profili oslobađanja prikazani su na slici 41.



Slika 41. Profili oslobađanja sulfanilamida iz liposoma i puferskog rastvora

In vitro oslobađanje sulfanilamida iz liposoma odlikuje se bifaznim profilom, pri čemu je inicijalno brže oslobađanje, praćeno sporijim oslobađanjem sulfanilamida. Tako se u prvih 20 minuta oslobodi 16,3% sulfanilamida, dok posle 120 minuta ukupni procenat oslobođenog sulfanilamida iznosi 21,6%. Razlog ovome može biti brža difuzija slobodnog sulfanilamida i/ili sulfanilamida solubilizovanog u micide u odnosu na sporije oslobađanje sulfanilamida iz liposoma. Poređenjem dobijenih profila oslobađanja sulfanilamida iz liposoma i puferskog rastvora, uočava se da je oslobađanje sulfanilamida iz puferskog rastvora dvostruko brže, pri čemu za 90 minuta 44,3% sulfanilamida difunduje kroz polupropustljivu membranu iz puferskog rastvora, dok se za isto vreme svega 17,9% sulfanilamida oslobodi iz liposoma i difunduje u akceptorsku fazu.

Radi dobijanja boljeg uvida u kinetiku oslobađanja sulfanilamida iz liposoma, dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su u odgovarajuće matematičke modele - nultog reda, prvog reda, Higuchi, Korsmeyer–Peppas i Baker–Lonsdale (Costa i Lobo, 2001), a izračunati parametri prikazani su u tabeli 11. Na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) i AIC vrednosti (engl. *Akaike Information Criterion*) (Costa i Lobo, 2001), model koji najbolje opisuje oslobađanje sulfanilamida iz liposoma jeste Korsmeyer–Peppas model (najveći R^2 i najmanji AIC).

Tabela 11. Kinetika oslobađanja sulfanilamida iz liposoma i puferskog rastvora

Kinetički model	Parametar	Sulfanilamid u liposomima	Sulfanilamid u puferu
Nultog reda $F = k_0 \cdot t$	k_0	0,228	0,651
	R^2	-0,2091	0,0241
	AIC	56,3222	52,2794
Prvog reda $F = 100 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot t}]$	k_1	0,003	0,010
	R^2	-0,0854	0,3657
	AIC	55,3514	49,2628
Korsmeyer-Peppas $F = k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP}	6,634	17,472
	n	0,236	0,207
	R^2	0,9254	0,998
	AIC	33,2504	10,7935
Baker-Lonsdale $\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	k_{BL}	0	0,001
	R^2	0,7102	0,8672
	AIC	43,4663	38,32
Higuchi $F = k_H \cdot t^{1/2}$	k_H	2,216	5,489
	R^2	0,6833	0,8123
	AIC	44,2654	40,739

R^2 : koeficijent determinacije; AIC: Akaikov informacijski kriterijum; F: frakcija oslobođenog leka u vremenu t ; k_0 : konstanta oslobađanja nultog reda; k_1 : konstanta oslobađanja prvog reda; k_{KP} : konstanta oslobađanja u Korsmeyer-Peppes modelu koja uzima u obzir strukturne i geometrijske karakteristike doziranog oblika; n : eksponent oslobađanja/difuzije ($n \leq 0,43$ – Fick-ova difuzija; $0,43 < n < 0,85$ – anomalno ponašanje, ne-Fick-ova difuzija; $n \geq 0,85$ – oslobađanje nultog reda); k_{BL} : kombinovana konstanta oslobađanja u Baker-Lonsdale modelu; k_H : konstanta oslobađanja u Higuchi modelu (Costa i Lobo, 2001; Đorđević i sar., 2016; Zhang i sar., 2010).

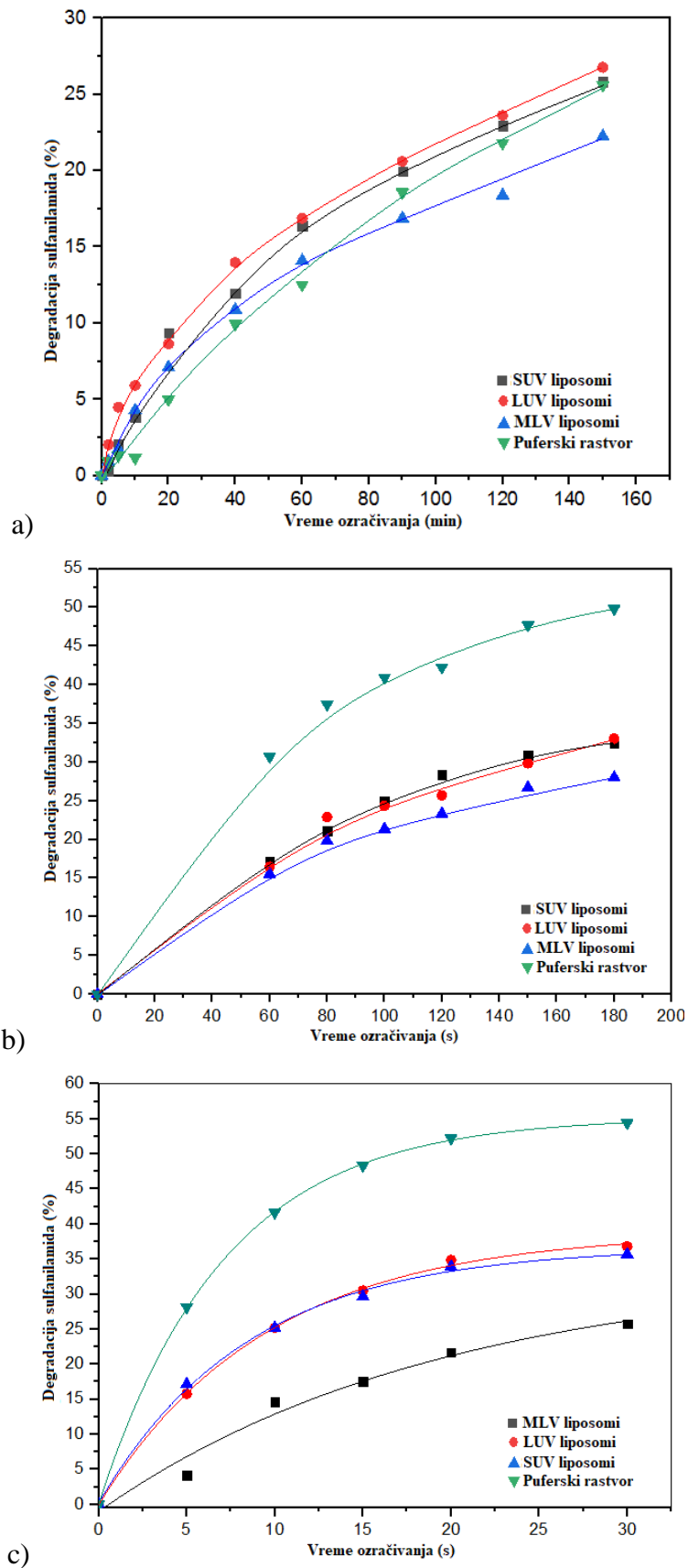
Na osnovu eksponenta oslobađanja/difuzije, čija vrednost iznosi 0,236 u slučaju liposoma, odnosno 0,207 u slučaju puferskog rastvora, a koji ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance u Korsmeyer–Peppas modelu (Costa i Lobo, 2001), može se zaključiti da je dominantan mehanizam oslobađanja sulfanilamida difuzija ($n \leq 0,43$), kako iz liposoma, tako i iz puferskog rastvora.

4.3.3 Fotostabilnost sulfanilamida u puferском rastvoru i liposomima

Jedan od razloga za inkorporiranje sulfanilamida u liposome jeste njegova fotoosetljivost. Stoga, da bi se dobio uvid u stabilnost sulfanilamida nakon inkorporiranja u liposome, na oksidativni stres izazvan kontinuiranim UV zračenjem, i procenio zaštitni efekat liposoma kao nosača za sulfanilamid, pripremljene liposomske disperzije podvrgnute su ispitivanjima fotostabilnosti primenom apsorpcione spektroskopije. Da bi se utvrdilo da li i kako različiti faktori, poput veličine liposoma, energije zračenja UV fotona i vremena izlaganja UV zračenju, utiču na stabilnost sulfanilamida, tri tipa liposoma sa sulfanilamidom (SUV, LUV i MLV) tretirani su UV-A, UV-B i UV-C zračenjem u različitim vremenskim intervalima, uporedo sa puferским rastvorom sulfanilamida, kao kontrolom.

Na UV-Vis spektrima sulfanilamida u puferu i liposomima (prilog 2) evidentno je smanjenje apsorbanca na 258 nm usled delovanja UV zračenja različitih talasnih dužina, što implicira da je sulfanilamid u rastvoru i liposomima fotoosetljiv. Proporcionalno pojavljivanje novih apsorpcionih maksimuma u oblasti talasnih dužina 300-350 nm i 550-600 nm, uočljivo je u slučaju svih ispitivanih uzoraka. Intenzitet ovih maksimuma se povećava sa povećanjem vremena zračenja, što ukazuje na kontinuirano formiranje degradacionih proizvoda.

Rezultati prikazani na slici 42 ukazuju da nestabilnost sulfanilamida prema UV zračenju proporcionalno raste sa povećanjem energije zračenja fotona, odnosno da je sulfanilamid najmanje osetljiv na delovanje UV-A, a najviše na delovanje UV-C zračenja. Tako se nakon 150 minuta delovanja UV-A zračenja degradira svega 25,6% sulfanilamida, dok se već nakon 0,5 minuta izlaganja UV-C zračenju razloži dvostruko više sulfanilamida, odnosno 54,5%, u puferском rastvoru. Upoređivanjem ovih rezultata sa rezultatima degradacije sulfanilamida u SUV, LUV i MLV liposomima (tabela 12) usled delovanja UV zračenja različite jačine, može se zaključiti da se fotostabilnost sulfanilamida nakon inkorporiranja u lipidne vezikule povećava. Pri tome, najveći zaštitni efekat pokazuju MLV liposomi. Razlika je najizraženija u slučaju delovanja zračenja najveće energije, kada se razloži 35,7% sulfanilamida u SUV, a svega 25,7% u MLV liposomima. Brzina i stepen degradacije sulfanilamida u SUV i LUV liposomima su veoma slični u svim ispitivanim uslovima, što pokazuje da promena veličine liposoma od 100 do 400 nm nema značajniji uticaj na distribuciju sulfanilamida u liposomima.

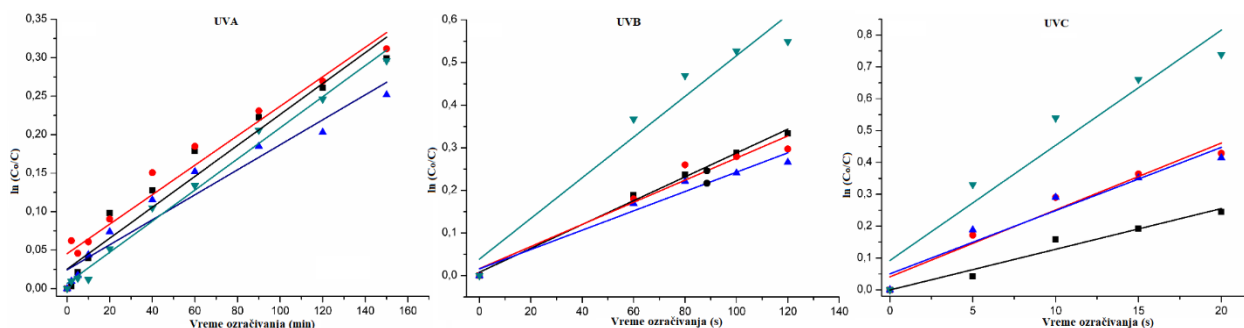


Slika 42. Degradacija sulfanilamida u MLV, LUV i SUV liposomima i fosfatnom puferu pod dejstvom: a) UV-A, b) UV-B i c) UV-C zračenja, u funkciji vremena ozračivanja

Tabela 12. Fotodegradacija sulfanilamida u puferu i liposomima

Uzorak	Degradacija sulfanilamida (%)		
	UV-A	UV-B	UV-C
SUV	25,8	32,9	35,7
LUV	26,8	33,1	36,8
MLV	22,0	28,0	25,7
Pufer	25,6	49,8	54,5

Radi dobijanja boljeg uvida u razlike u degradaciji sulfanilamida u različitim sistemima, ispitana je kinetika degradacije sulfanilamida u puferskom rastvoru i liposomima različite veličine i lamelnosti. Odgovarajući kinetički grafici, koji predstavljaju logaritamsku zavisnost koncentracije sulfanilamida od vremena ozračivanja, $\ln C_0/C = f(t)$, prikazani su na slici 43, za sve tri vrste zračenja. Prikazani grafici podržavaju linearnu zavisnost, sa vrednostima koeficijenta determinacije u opsegu od $R^2 = 0,93-0,99$.



Slika 43. Kinetika degradacije sulfanilamida pri delovanju UV-A, UV-B i UV-C zračenja

Konstante brzine degradacije sulfanilamida, k , u različitim sistemima, izračunate iz nagiba jednačine 15, prikazane su u tabeli 13:

$$\ln C_0/C = k \cdot t \quad (15)$$

pri čemu je:

C_0 – inicijalna koncentracija sulfanilamida,

C – koncentracija sulfanilamida nakon vremena ozračivanja t ,

k – konstanta brzine reakcije degradacije sulfanilamida (min^{-1}).

Tabela 13. Konstante brzine reakcije degradacije sulfanilamida u puferu i liposomima

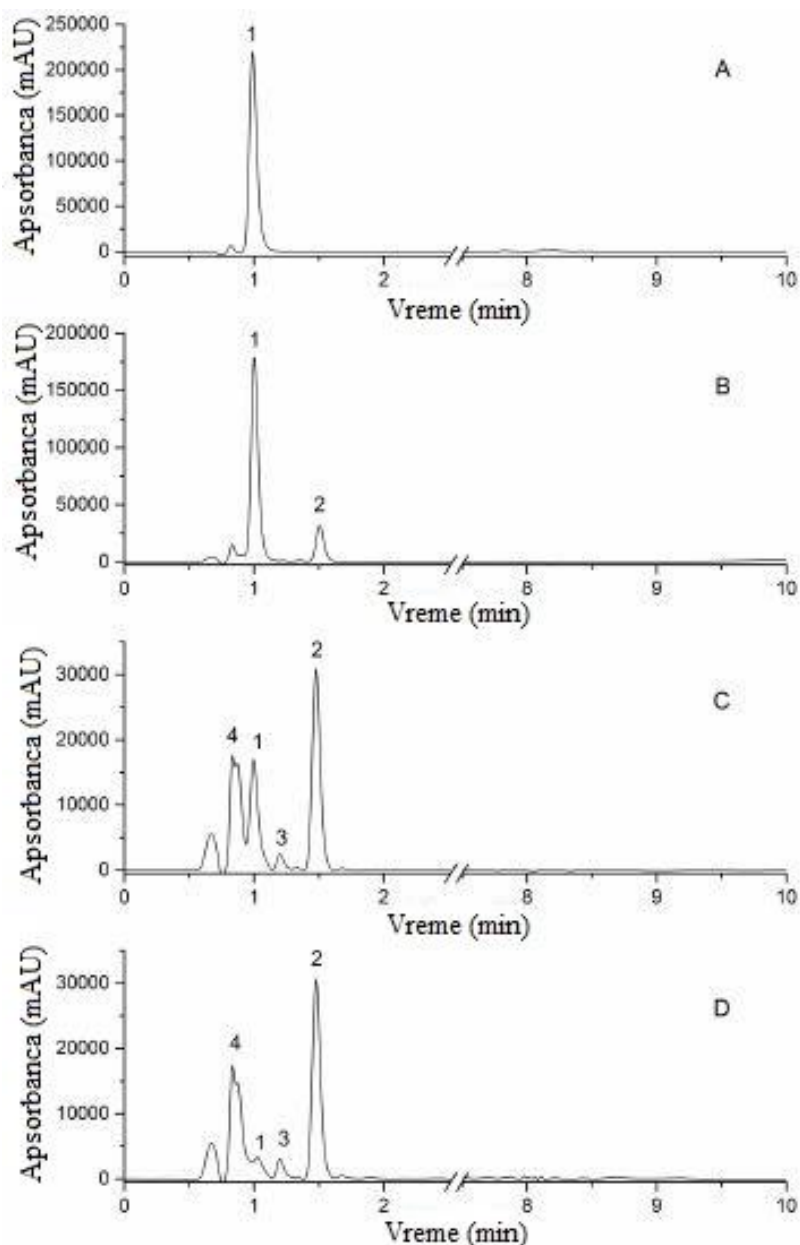
Uzorak	UV-A (350 nm)	UV-B (300 nm)	UV-C (254 nm)
	$k \times 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
SUV	2,01	2,80	19,85
LUV	1,91	2,59	20,99
MLV	1,62	2,27	12,78
Pufer	2,02	4,77	36,16

Rezultati prikazani u tabeli 13 jasno pokazuju da brzina reakcije degradacije sulfanilamida *in vitro* zavisi od intenziteta primenjenog zračenja, pri čemu brzina raste sa povećanjem energije UV zračenja. Takođe, na osnovu prikazanih rezultata se može zaključiti da liposomi imaju ulogu u zaštiti sulfanilamida (smanjenje vrednosti k), pri čemu su najniže vrednosti konstanti brzine reakcije za sulfanilamid u MLV liposomima, i to za sve tri vrste UV zračenja.

Degradacija sulfanilamida u puferu i liposomima izazvana delovanjem UV zračenja prati kinetiku prvog reda, što je uobičajeno za fotohemijske reakcije (Veljković, 1969). Reakcija prvog reda uključuje brojne procese unutrašnjeg premeštanja ili razlaganja supstanci prisutnih u reakcionoj smeši. U većini reakcija prvog reda, i druge komponente prisutne u reakcionim smešama, kao što su molekuli rastvarača, učestvuju u reakciji. Međutim, kako su promene ovih molekula male po obimu ili po prirodi, ne smatraju se relevantnim, pa se mogu zanemariti. Zbog toga se može pretpostaviti da brzina reakcije degradacije zavisi samo od sulfanilamida.

4.3.4 Identifikacija fotodegradacionih proizvoda sulfanilamida

U cilju identifikacije degradacionih proizvoda sulfanilamida u rastvoru nakon delovanja UV zračenja, primenjena je tačna hromatografija ultravisokih performansi u kombinaciji sa tandemskom masenom spektrometrijom. Analizi je podvrgnut standardni rastvor sulfanilamida koncentracije 1×10^{-5} M pre i nakon ozračivanja (slika 44).



Slika 44. UHPLC hromatogrami sulfanilamida pre (a) i nakon izlaganja UV-A (b), UV-B (c) i UV-C (d) zračenju

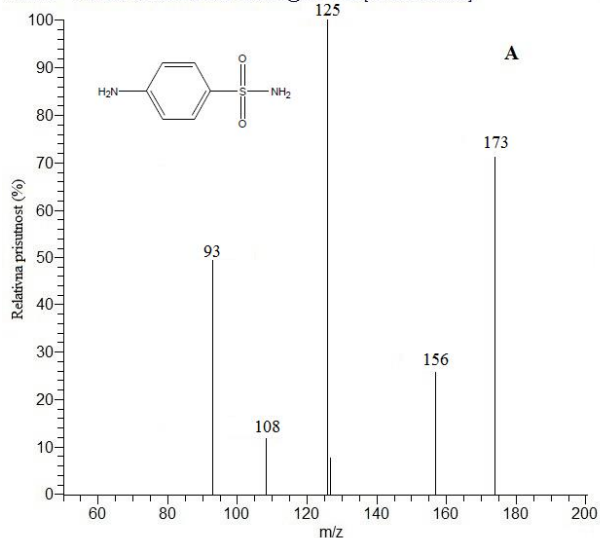
UHPLC hromatogram rastvora sulfanilamida pre ozračivanja (slika 44 a) sadrži samo jedan pik na retencionom vremenu 1,01 min, koji potiče od sulfanilamida. Fragmentacijom molekuskog pika sulfanilamida, m/z 173, dobijaju se 4 nova fragmentna jona na m/z 156; 125; 108 i 93 (slika 45 a). Dobijeni fragmentni joni sulfanilamida su u saglasnosti sa podacima dostupnim u literaturi (Liu i sar., 2011; Sági i sar., 2015; Trovo i sar., 2009). Spektri dobijeni na UV-Vis detektoru sa apsorpcionim maksimumima na 257,8 nm i 206 nm dodatno potvrđuju da pik na retencionom vremenu 1,01 min potiče od sulfanilamida (Khankhasaeva i sar., 2015).

Na UHPLC hromatogramima dobijenim nakon izlaganja standardnog rastvora sulfanilamida dejstvu UV-A, UV-B i UV-C zračenja (slika 44 b-d) uočava se prisustvo 3 nova pika. Nakon delovanja UV-A zračenja (slika 44 b), intenzitet pika koji potiče od sulfanilamida se smanjuje, ali se javlja novi pik na retencionom vremenu 1,51 min, koji odgovara sulfanilnoj kiselini (pik 2). Jačina UV-A zračenja nije velika, zbog čega je sulfanilna kiselina jedini detektibilni degradacioni proizvod, čak i nakon 150 minuta ozračivanja. Nakon izlaganja rastvora sulfanilamida delovanju UV-B i UV-C zračenja, uočava se drastično smanjenje intenziteta sulfanilamidnog pika, pri čemu se, pored sulfanilne kiseline, detektuju se i dva nova degradaciona proizvoda, anilin sa pikom na retencionom vremenu 1,19 min (pik 3) i benzidin sa pikom na 0,82 min (pik 4). U tabeli 14 prikazani su karakteristični parametri identifikovanih jedinjenja u uzorcima rastvora sulfanilamida pre i nakon ozračivanja, dok su na slici 45 prikazani njihovi maseni spektri.

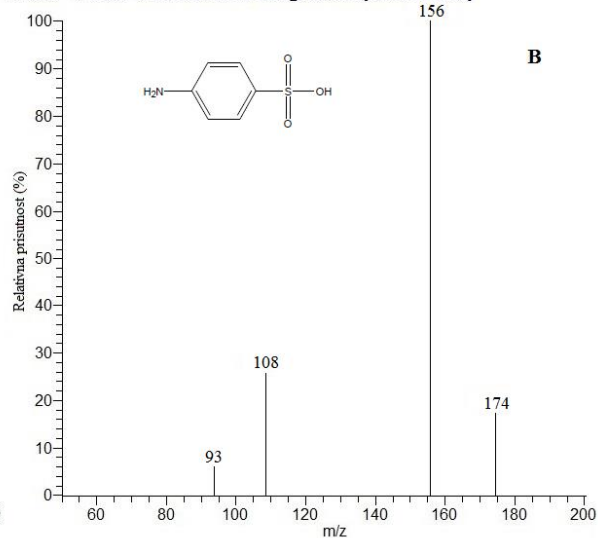
Tabela 14. Karakteristični parametri sulfanilamida i identifikovanih degradacionih proizvoda

Pik	Jedinjenje	R _t (min)	Mr	[M+H] ⁺	MS/MS	λ _{max} (nm)
1	Sulfanilamid	1,01	172	173	156	262
					125	
					108	
					93	
2	Sulfanilna kiselina	1,51	173	174	156	249
					108	
					93	
					81	
3	Anilin	1,19	93	94	77	232
					66	284
					65	
					51	
4	Benzidin	0,82	184	185	181	286
					167	
					143	
					102	
					85	

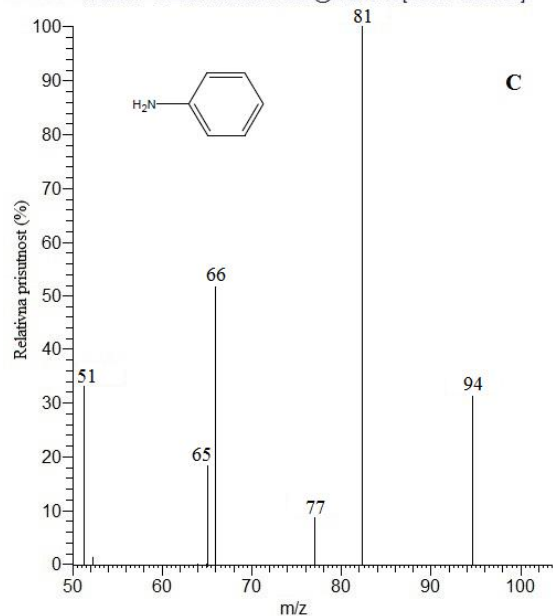
T: ITMS - T: ITMS - c ESI Full ms2 173.61@cid15.00 [50.00-1000.00]



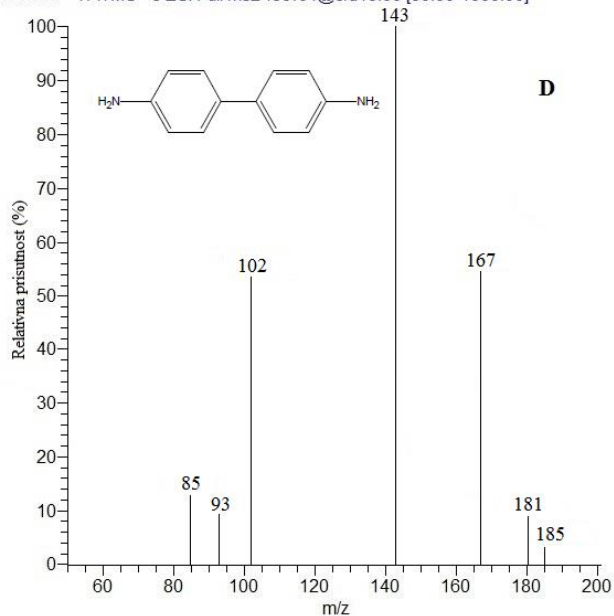
T: ITMS - T: ITMS - c ESI Full ms2 174.03@cid15.00 [50.00-1000.00]



T: ITMS - T: ITMS - c ESI Full ms2 94.03@cid15.00 [50.00-1000.00]

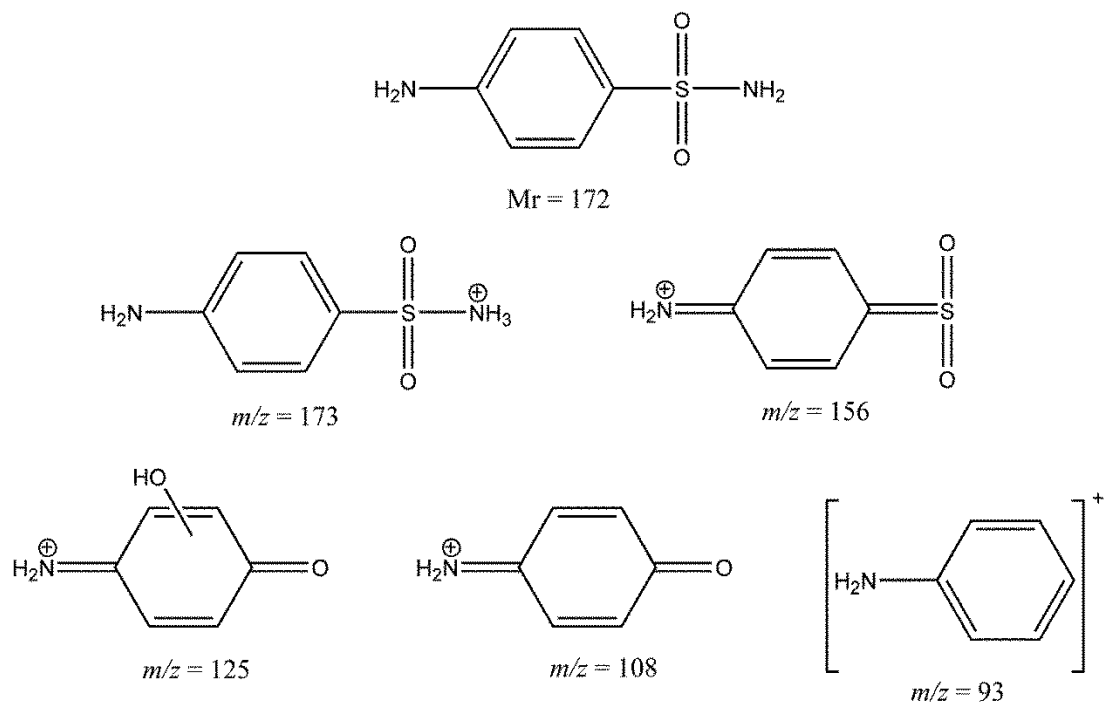


T: ITMS - T: ITMS - c ESI Full ms2 185.01@cid15.00 [50.00-1000.00]

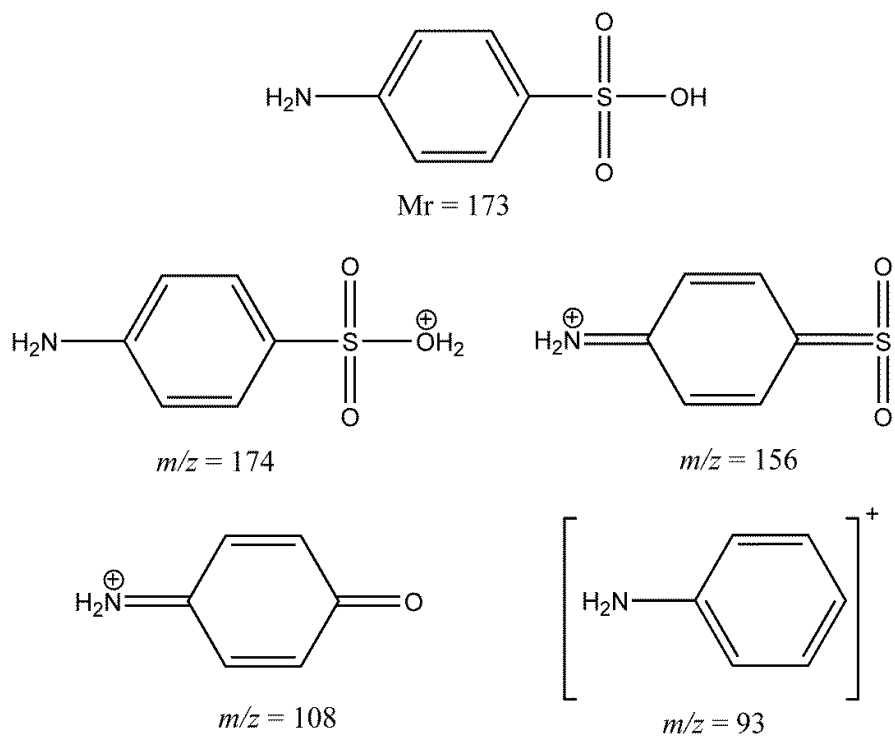


Slika 45. Maseni spektri: a) sulfanilamida, b) sulfanilne kiseline, c) anilina, i d) benzidina

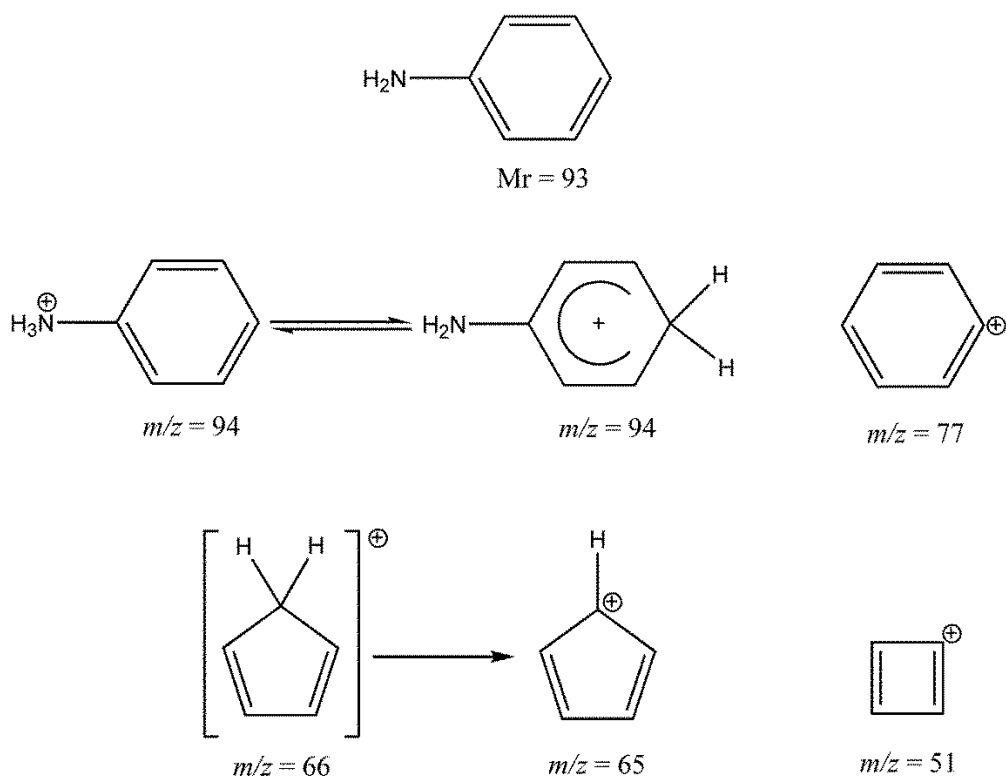
Strukture identifikovanih jedinjenja i karakterističnih fragmenatnih jona na osnovu kojih je i izvršena identifikacija fotodegradacionih proizvoda sulfanilamida u rastvoru, prikazane su na slikama 46-49.



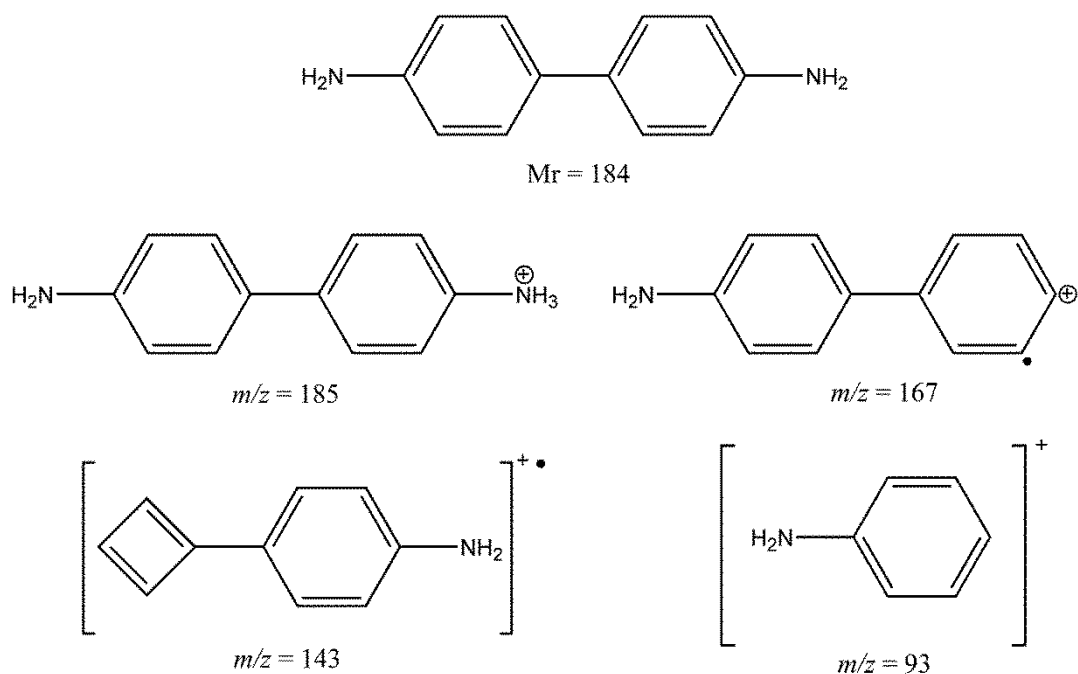
Slika 46. Struktura sulfanilamida i karakterističnih fragmentnih jona



Slika 47. Struktura sulfanilne kiseline i karakterističnih fragmentnih jona



Slika 48. Struktura anilina i karakterističnih fragmentnih jona



Slika 49. Struktura benzidina i karakterističnih fragmentnih jona

Na osnovu površina pika degradacionih proizvoda (slika 44), može se zaključiti da je sulfanilna kiselina glavni degradacioni produkt sulfanilamida. Činjenica da nakon delovanja

sve tri vrste zračenja nastaje isti degradacioni proizvod ukazuje na isti mehanizam degradacije sulfanilamida. Strukture sulfonamidnih antimikrobnih lekova sadrže benzenov prsten, heteroatome i druge funkcionalne grupe osetljive na delovanje UV zračenja. Smatra se da je sulfanilamid osetljiv na foto-oksidaciju usled prisustva anilinskog dela strukture (Albini i Fasani, 2004). Takođe, poznato je da UV zračenje vodi nastanku slobodnih radikala u organskim jedinjenjima, pogotovo u onim sa C=C vezama, poput sulfanilamida. Kada se jednom formiraju, slobodni radikali mogu inicirati lančane reakcije i dovesti do kompletne degradacije aktivne supstance.

Albini i Fasani (2004) su pokazali da su potencijalni fotodegradacioni proizvodi sulfanilamida azo i nitro-derivati. Međutim, poređenjem identifikovanih degradacionih proizvoda sulfanilamida sa degradacionim proizvodima koji nastaju Fentonovom katalizom sulfanilamida (El-Ghenymy i sar., 2014; Feng i sar., 2016; Khankhasaeva i sar., 2015), uočava se velika sličnost. Kako je glavni slobodni radikal koji nastaje u Fentonovim reakcijama $\bullet\text{OH}$ radikal, može se pretpostaviti da su degradacioni proizvodi sulfanilamida nastali nakon delovanja UV zračenja upravo posledica delovanja $\bullet\text{OH}$ radikala (Wang i sar., 2011). Formiranje sulfanilne kiseline i anilina rezultat je gubitka $-\text{NH}_2$, odnosno $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grupe, respektivno. U slučaju sulfanilne kiseline, $-\text{NH}_2$ grupa biva zamenjena $-\text{OH}$ grupom. Nastanak benzidina (1,1'-difetil-4,4'-diamina) se može objasniti rekombinacijama koje nastaju u reakcionoj smeši nakon delovanja UV zračenja. Naime, jednom formirani $\bullet\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ radikal je u stanju da interaguje sa drugim $\bullet\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ slobodnim radikalom, pri čemu nastaje benzidin.

5 ZAKLJUČAK

- ✓ Sulfanilamid je sintetisan konvencionalnim postupkom, direktnom reakcijom acetanilida i hlorsulfonske kiseline, a zatim prečišćen prekristalizacijom iz vodenog rastvora. Tako dobijeni sulfanilamid, visokog stepena čistoće, analiziran je primenom FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM metode, kako bi se izvršila njegova strukturna karakterizacija. Rezultati FTIR i XRD analize pokazali su da je sintetisani sulfanilamid u β-polimorfnom obliku.
- ✓ Inkluzioni kompleksi sulfanilamida sa β-ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom uspešno su pripremljeni koprecipitacionom metodom. Primenom FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM metode izvršena je strukturna karakterizacija dobijenih inkluzionih kompleksa, dokazano inkorporiranje sulfanilamida i pokazan način njegovog inkorporiranja u šupljine ciklodekstrina.
- ✓ Ispitivanjem fazne rastvorljivosti je pokazano da se inkorporiranjem u inkluzione komplekse sa β-ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom, rastvorljivost sulfanilamida u vodi povećava 4,09 puta, odnosno 4,47 puta, respektivno, kao i da je molski odnos sulfanilamida i odgovarajućeg ciklodekstrina u inkluzionom kompleksu 1:1.
- ✓ Ispitivanjem fotostabilnosti sulfanilamida i inkluzionih kompleksa pokazano je da se inkorporiranjem sulfanilamida u ciklodekstrinske šupljine molekula domaćina i formiranjem inkluzionih kompleksa smanjuje fotoosetljivost sulfanilamida i usporava njegova degradacija, pri čemu 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin ima veći zaštitni efekat.
- ✓ Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti pokazano je da sulfanilamid sprečava rast i razmnožavanje ispitivanih G-pozitivnih i G-negativnih bakterija, dok u većim dozama sprečava i rast gljivica (*Candida albicans*). Formiranjem inkluzionih kompleksa sulfanilamida sa ciklodekstrinima povećava se jačina njegovog antimikrobnog delovanja, što je posledica povećanja njegove rastvorljivosti u vodi.
- ✓ Homopolimerni hidrogelovi p(NIPAM)-a sintetisani su slobodno-radikalskom polimerizacijom na povišenoj temperaturi (75-85 °C) sa različitim molskim udelom umreživača EGDM-a (1; 1,5; 2 i 2,5 mol%). Strukturna karakterizacija sintetisane serije hidrogelova izvršena je primenom FTIR, XRD i SEM metode, koje su potvrdile nastanak novih, umreženih polimernih struktura.

- ✓ Ispitivanjem sadržaja zaostalih reaktanata HPLC metodom, pokazano je da se najveći deo (>98%) monomera i umreživača iskoristi tokom polimerizacije, odnosno da je količina rezidualnih reaktanata u sintetisanom hidrogelu u granicama tolerancije, što je jedan od osnovnih preduslova za njihovu primenu kao nosača farmakološki aktivnih supstanci.
- ✓ Stepem bubrenja sintetisanih hidrogelova zavisi od sadržaja umreživača, pri čemu sa porastom sadržaja EGDM-a opada stepen bubrenja hidrogelova, usled povećanja gustine umreženja i smanjenja pokretljivosti polimernih lanaca. Ispitivanjem bubrenja hidrogelova pri različitim uslovima temperature i pH, pokazano je da su hidrogelovi p(NIPAM)-a termoosetljivi i da ne reaguju na promenu pH sredine, što je očekivano s obzirom da ne sadrže funkcionalne grupe podložne jonizaciji. Sa povećanjem temperature opada stepen bubrenja sintetisanih hidrogelova, što hidrogelove p(NIPAM)-a svrstava u negativno temperaturno-osetljive hidrogelove, sa temperaturom zapreminskog faznog prelaza od 33-34 °C. Mehanizam transporta tečnosti u hidrogel je anomalan, odnosno odgovara ne-Fick-ovoj difuziji.
- ✓ Hidrogelovi sa uklopljenim sulfanilamidom strukturno su okarakterisani primenom FTIR, XRD i SEM metode. Ovim analizama je potvrđeno prisustvo sulfanilamida u strukturi hidrogelova.
- ✓ Postignuta je zadovoljavajuća efikasnost uklapanja sulfanilamida u p(NIPAM) hidrogelove (87,36-95,29%). Efikasnost uklapanja sulfanilamida raste sa povećanjem sadržaja umreživača u hidrogelu, što se može pripisati interakciji sulfanilamida sa EGDM-om. Oslobođanje sulfanilamida iz sintetisanih hidrogelova je u saglasnosti sa rezultatima bubrenja, odnosno sa smanjenjem stepena bubrenja. Usled povećanja sadržaja umreživača, smanjuje se i količina oslobođenog sulfanilamida. Nakon 24 sata iz hidrogelova se oslobodi 73,3-93,5% uklopljene količine sulfanilamida. Promena pH vrednosti sredine nema značajnijeg uticaja na brzinu i stepen oslobađanja sulfanilamida iz p(NIPAM) hidrogelova, što je u saglasnosti sa rezultatima bubrenja u sredinama različite pH vrednosti.
- ✓ Uzimajući u obzir termoosetljivost hidrogelova, VPTT blisku fiziološkoj temperaturi organizma, zadovoljavajuće postignute rezultate uklapanja i oslobađanja sulfanilamida, može se zaključiti da su hidrogelovi na bazi p(NIPAM)-a pogodni kao nosači za sulfanilamid.
- ✓ Metodom tankog filma pripremljeni su MLV liposomi sa sulfanilamidom. Ekstrudiranjem kroz polikarbonatne filtere promera pora 100 i 400 nm dobijeni su

unilamelarni liposomi odgovarajuće veličine i zadovoljavajuće stabilnosti, sa vrlo uskom raspodelom veličina čestica.

- ✓ Primenom tehnike sa dijaliznim vrećicama određena je brzina oslobađanja sulfanilamida iz liposoma, u odnosu na puferi rastvor, pri čemu je pokazano da se inkorporiranjem sulfanilamida u liposome dvostruko usporava njegovo oslobađanje. *In vitro* oslobađanje sulfanilamida iz liposoma odlikuje se dvofaznim profilom (inicijalno brzo i sporo oslobađanje sulfanilamida).
- ✓ Korsmeyer–Peppas-ov matematički model najbolje opisuje oslobađanje sulfanilamida iz liposoma, pri čemu je dominantan mehanizam oslobađanja Fick-ova difuzija.
- ✓ Ispitivanjem fotostabilnosti sulfanilamida u liposomima različite veličine i lamelarnosti pokazano je da se stabilnost sulfanilamida nakon inkorporiranja u lipidne vezikule povećava, pri čemu najveći zaštitni efekat pokazuju MLV liposomi, dok promena veličine liposoma od 100 do 400 nm nema značajniji uticaj na stabilnost sulfanilamida. Degradacija sulfanilamida u puferu i liposomima izazvana delovanjem UV zračenja prati kinetiku prvog reda (jednačina 15). Stabilnost sulfanilamida zavisi od vremena izlaganja zračenju, jačine primenjenog zračenja i veličine i lamelarnosti liposoma.
- ✓ Primenom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS metode identifikovani su degradacioni proizvodi sulfanilamida u rastvoru nakon delovanja UV zračenja različite talasne dužine (UV-A, UV-B i UV-C). Glavni fotodegradacioni proizvod sulfanilamida je sulfanilna kiselina u svim ozračivanim uzorcima. Nakon izlaganja vodenog rastvora sulfanilamida (10 ppm) delovanju UV-B i UV-C zračenja, u rastvoru su detektovani, kao degradacioni proizvodi, i anilin i benzidin. Fotodegradacija sulfanilamida je slobodno-radikalske prirode i dešava se pod uticajem •OH radikala.

6 LITERATURA

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
- Akhtar, M. F., Hanif, M., Ranjha, N. M. (2016). Methods of synthesis of hydrogels... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 554-559.
- Albini, A., Fasani, E. (2004). Rationalizing the photochemistry of drugs. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*, 67-101.
- Anand, N. (1975). Sulfonamides and sulfones. In: J. W. Corcoran, F. E. Hahn, J. F. Snell, K. L. Arora (Eds.), *Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents* (pp. 668-698). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319-1330.
- Araújo, P. H. H., Sayer, C., Giudici, R., Poco, J. G. (2002). Techniques for reducing residual monomer content in polymers: a review. *Polymer Engineering & Science*, 42(7), 1442-1468.
- Ashraf, S., Park, H. K., Park, H., Lee, S. H. (2016). Snapshot of phase transition in thermoresponsive hydrogel PNIPAM: Role in drug delivery and tissue engineering. *Macromolecular Research*, 24(4), 297-304.
- Bahrami, K., Khodaei, M. M., Soheilizad, M. (2009). Direct conversion of thiols to sulfonyl chlorides and sulfonamides. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(24), 9287-9291.
- Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S., Kankane, S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 33(11), 1088-1118.
- Bandyopadhyay, S., Sharma, A., Alvi, M. A. A., Raju, R., Glomm, W. R. (2017). A robust method to calculate the volume phase transition temperature (VPTT) for hydrogels and hybrids. *RSC Advances*, 7(84), 53192-53202.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-252.
- Baran, W., Sochacka, J., Wardas, W. (2006). Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere*, 65(8), 1295-1299.
- Barbucci, R., Spera, V., Armenia, E., Quagliariello, V. (2018). Microarchitecture of Water Confined in Hydrogels. In: T. R. R. Singh, G. Lavery, R. Donnelly

- (Eds.), *Hydrogels: Design, Synthesis and Application in Drug Delivery and Regenerative Medicine* (pp. 1-31). Boca Raton: CRC Press.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7.
- Bergstrand, N. (2003). *Liposomes for drug delivery: From physico-chemical studies to applications*. (Doctoral dissertation). Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.
- Berkani, Z., Lakehal, A., Roula, D. (2015). Trimethoprim/sulfamethoxazole and azithromycin combination in the treatment of presumed ocular toxoplasmosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(7), 1894-1894.
- Bhardwaj, U., Burgess, D.J. (2010). Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, 388, 181-189.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892-2923.
- Borba, A., Gómez-Zavaglia, A., Fausto, R. (2013). Conformational landscape, photochemistry, and infrared spectra of sulfanilamide. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(4), 704-717.
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., McNeill, K. (2004). Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. *Environmental Science & Technology*, 38(14), 3933-3940.
- Brackett, C. C., Singh, H., Block, J. H. (2004). Likelihood and mechanisms of cross-allergenicity between sulfonamide antibiotics and other drugs containing a sulfonamide functional group. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 24(7), 856-870.
- Brown, G. M. (1962). The biosynthesis of folic acid: II. Inhibition by sulfonamides. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 536-540.
- Budavari, S. (1989). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 11th edition, (p. 1409). Rahway, New Jersey: Merck.
- Cairns D. (2008). *Essentials of Pharmaceutical Chemistry*, 3rd edition, (p. 69). London, Chicago: Pharmaceutical Press.
- Cashin P. (2011). *Sulfonamide Partitioning to Aqueous Cationic Micellar Systems* (Unpublished Master's thesis). Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.

- Chen, J., Jo, S., Park, K. (1995). Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 69-76.
- Choo, E. S. G., Tang, X., Sheng, Y., Shuter, B., Xue, J. (2011). Controlled loading of superparamagnetic nanoparticles in fluorescent nanogels as effective T₂-weighted MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, 21(7), 2310-2319.
- Choquet-Kastylevsky, G., Vial, T., Descotes, J. (2002). Allergic adverse reactions to sulfonamides. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2(1), 16-25.
- Chrai, S. S., Murari, R., Ahmad, I. (2001). Liposomes (a review)-Part one: Manufacturing issues. *Biopharm-the Applied Technologies of Biopharmaceutical Development*, 14(11), 10-14.
- Coates, J. (2006). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*, (pp. 1-23). Chichester: John Wiley & Sons.
- Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R., Gil, M. H. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1(1), 164-209.
- Constantin, M., Cristea, M., Ascenzi, P., Fundueanu, G. (2011). Lower critical solution temperature versus volume phase transition temperature in thermoresponsive drug delivery systems. *Express Polymer Letters*, 5(10), 839-848.
- Costa, P., Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133.
- Council of Europe. (2018). *European Pharmacopoeia: supplement 9.4*. Strasbourg: Council of Europe.
- Das, D., Ghosh, P., Ghosh, A., Haldar, C., Dhara, S., Panda, A. B., Pal, S. (2015). Stimulus-responsive, biodegradable, biocompatible, covalently cross-linked hydrogel based on dextrin and poly (*N*-isopropylacrylamide) for *in vitro/in vivo* controlled drug release. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(26), 14338-14351.
- Davis, B. D. (1943). The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body. *The Journal of Clinical Investigation*, 22(5), 753-762.
- Deamer, D., Bangham, A. D. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 443(3), 629-634.

- Del Rosso, J. Q. (2009). The use of sodium sulfacetamide 10%-sulfur 5% emollient foam in the treatment of acne vulgaris. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 2(8), 26-29.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- de Oliveira, T. E., Mukherji, D., Kremer, K., Netz, P. A. (2017). Effects of stereochemistry and copolymerization on the LCST of PNIPAm. *The Journal of Chemical Physics*, 146(3), 034904.
- D'Souza, S. (2014). A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 304757.
- D'Souza, S. S., DeLuca, P. P. (2006). Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research*, 23(3), 460-474.
- Đorđević, S., Isailović, T., Cekić, N., Vuleta, G., Savić, S. (2016). Parenteralne nanoemulzije diazepama-fizičko-hemijska karakterizacija i *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja. *Arhiv za Farmaciju*, 66(1), 24-41.
- El-Ghenemy, A., Rodríguez, R. M., Brillas, E., Oturan, N., Oturan, M. A. (2014). Electro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide with Pt/carbon-felt and BDD/carbon-felt cells. Kinetics, reaction intermediates, and toxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(14), 8368-8378.
- Feng, Y., Liao, C., Shih, K. (2016). Copper-promoted circumneutral activation of H₂O₂ by magnetic CuFe₂O₄ spinel nanoparticles: mechanism, stoichiometric efficiency, and pathway of degrading sulfanilamide. *Chemosphere*, 154, 573-582.
- Fouts, J. R., Kamm, J. J., Brodie, B. B. (1957). Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 120(3), 291-300.
- Franks, P., Gleiner, J. A. (1984). The treatment of acute bronchitis with trimethoprim and sulfamethoxazole. *The Journal of Family Practice*, 19(2), 185-190.
- Friedel, R. A., Orchin, M. (1951). *Ultraviolet spectra of aromatic compounds* (Vol. 40). New York: Wiley.
- Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(5), 419-436.
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani S., Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iranian Polymer Journal*, 19, 375-398.

- García-Galán, M. J., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2008). Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 1008-1022.
- Garg, T., Singh, S., Goyal, A. K. (2013). Stimuli-sensitive hydrogels: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 30(5), 369-409.
- Gaspar, M. M., Cruz, A., Penha, A. F., Reymão, J., Sousa, A. C., Eleutério, C. V., Domingues, S. A., Fraga, A. G., Longatto Filho, A., Cruz, M. E. M., Pedrosa J. (2008). Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(1), 37-45.
- Gavriloaia, M. R., Budura, E. A., Toma, C. C., Mitu, M. A., Karampelas, O., Arama, C., Lupuleasa, D. (2012). *In vitro* evaluation of diffusion and rheological profiles for dexamethasone inclusion complexes with β -cyclodextrin, or hydroxypropyl β -cyclodextrin. *FARMACIA*, 60(6), 895-904.
- Gerber, M. A., Baltimore, R. S., Eaton, C. B., Gewitz, M., Rowley, A. H., Shulman, S. T., Taubert, K. A. (2009). Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*, 119(11), 1541-1551.
- Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*, 129, 175-186.
- Greenwood, D. (2010). Sulfonamides. In: R. Finch, D. Greenwood, S. R. Norrby, R. Whitley (Eds.), *Antibiotic and chemotherapy* (9th edition) (pp. 337-343). Edinburgh: Saunders Elsevier.
- Gruchalla, R. S. (1999). Diagnosis of allergic reactions to sulfonamides. *Allergy*, 54, 28-32.
- Guisseppi-Elie, A. (2010). Electroconductive hydrogels: synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials*, 31(10), 2701-2716.
- Gulati, M., Grover, M., Singh, S., Singh, M. (1998). Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 165(2), 129-168.

- Haq, M. A., Su, Y., Wang, D. (2017). Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 842-855.
- Henry, R. J. (1943). The mode of action of sulfonamides. *Bacteriological Reviews*, 7(4), 175-262.
- Higuchi, T., Connors, K. (1965). Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 7, 117-212.
- Hirai, M., Minematsu, H., Hiramatsu, Y., Kitagawa, H., Otani, T., Iwashita, S., Kudoh, T., Chen, L., Li, Y., Okada, M., Salomon, D. S., Igarashi, K., Chikuma, M., Seno, M. Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 391(1-2), 274-283.
- Hirayama, F., Yamamoto, M., Uekama, K. (1992). Acid-catalyzed hydrolysis of maltosyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(9), 913-916.
- Hofer, A., Legat, F. J., Gruber-Wackernagel, A., Quehenberger F., Wolf P. (2011). Topical liposomal DNA-repair enzymes in polymorphic light eruption. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(7), 1118-1128.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- Ilić-Stojanović, S., Mladenović-Ranisavljević, I., Nikolić, V., Takić, Lj., Stojiljković, D., Stojiljković, S., Nikolić, Lj. (2011). Thermo-responsive hydrogels for controlled release of paracetamol. *Proceedings of 43rd International October Conference on Mining and Metallurgy*, 707-710.
- Ilić-Stojanović, S. S., Nikolić, L. B., Nikolić, V. D., Milić, J. R., Petrović, S. D., Nikolić, G. M., Kapor, A. J. (2012). Potential application of thermo-sensitive hydrogels for controlled release of phenacetin. *Hemijska Industrija*, 66(6), 831-839.
- Ilić-Stojanović, S. S., Nikolić, L. B., Nikolić, V. D., Milić, J. R., Stamenković, J., Nikolić, G. M., Petrović, S. D. (2013). Synthesis and characterization of thermosensitive hydrogels and the investigation of modified release of ibuprofen. *Hemijska Industrija*, 67(6), 901-912.
- Immordino, M. L., Dosio, F., Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 297-315.
- International Organization for Standardization. (1999). *Dentistry – Denture base polymers (ISO No. 1567)*. Dostupno na: <https://www.sis.se/api/document/preview/611832/> [Pristupljeno 22.06.2019.].

- Irie, T., Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(2), 147-162.
- Jadhav, S. A., Brunella, V., Miletto, I., Berlier, G., Scalarone, D. (2016). Synthesis of poly (*N*-isopropylacrylamide) by distillation precipitation polymerization and quantitative grafting on mesoporous silica. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(44), 1-8.
- Jain, K. K. (2008). Drug delivery systems-an overview. In: K. K. Jain (Ed.), *Drug delivery systems. Methods in molecular biology* (pp. 1-50). Basel: Humana Press.
- James, C., Johnson, A. L., Jenkins, A. T. A. (2011). Antimicrobial surface grafted thermally responsive PNIPAM-co-ALA nano-gels. *Chemical Communications*, 47(48), 12777-12779.
- Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 272-284.
- Kalagasidis Krušić M. (2007). Hidrogelovi. In: M. Kalagasidis Krušić (Ed.), *Hidrogelovi i kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci* (pp.13-28). Beograd: Zadužbina Andrejević.
- Kalgutkar, A. S., Jones, R., Sawant, A. (2010). Sulfonamide as an essential functional group in drug design. In: D. A. Smith (Ed.), *Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of functional groups: impact of chemical building blocks on ADMET* (pp. 210-274). London: RSC Publishing.
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217-233.
- Kanásová, M., Nesměrák, K. (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148(9), 1581-1593.
- Kapor, A., Nikolić, V., Nikolić, L., Stanković, M., Cakić, M., Stanojević, L., Ilić, D. (2010). Inclusion complexes of amlodipine besylate and cyclodextrins. *Open Chemistry*, 8(4), 834-841.
- Katayama, K., Kato, Y., Onishi, H., Nagai, T., Machida, Y. (2003). Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(7), 725-731.
- Katsumoto, Y., Tanaka, T., Sato, H., Ozaki, Y. (2002). Conformational change of poly (*N*-isopropylacrylamide) during the coil-globule transition investigated by attenuated

- total reflection/infrared spectroscopy and density functional theory calculation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(14), 3429-3435.
- Khankhasaeva, S. T., Dambueva, D. V., Dashinamzhilova, E. T., Gil, A., Vicente, M. A., Timofeeva, M. N. (2015). Fenton degradation of sulfanilamide in the presence of Al, Fe-pillared clay: Catalytic behavior and identification of the intermediates. *Journal of Hazardous Materials*, 293, 21-29.
- Kim, S., Turker, M. S., Chi, E. Y., Sela, S., Martin, G. M. (1983). Preparation of multivesicular liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 728(3), 339-348.
- Kim, S. Y., Cho, S. M., Lee, Y. M., Kim, S. J. (2000). Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and *N*-isopropylacrylamide. *Journal of Applied Polymer Science*, 78(7), 1381-1391.
- Kirby, C. (1990). Delivery Systems for Enzymes. *Chemistry in Britain*, 26, 847-850.
- Klasen, H. J. (2000). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26(2), 131-138.
- Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D., Peppas, N. A. (2015). Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93, 1-49.
- Kołaczek, A., Fusiarcz, I., Ławecka, J., Branowska, D. (2014). Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. *Chemik*, 68(7), 620-628.
- Kopeček, J. (2009). Hydrogels: From soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(22), 5929-5946.
- Kostić, M., Krunić, N., Nikolić, L., Nikolić, V., Najman, S., Kocić, J. (2009). Residual monomer content determination in some acrylic denture base materials and possibilities of its reduction. *Vojnosanitetski Pregled*, 66(3), 223-227.
- Kurečić M., Sfiligoj-Smole M., Stana-Kleinschek K. (2012). UV polymerization of poly (*N*-isopropylacrylamide) hydrogel. *Materiali in tehnologije*, 46(1), 87-91.
- Kurzer, E., Kaplan, S. A. (2002). Cost effectiveness model comparing trimethoprim sulfamethoxazole and ciprofloxacin for the treatment of chronic bacterial prostatitis. *European Urology*, 42(2), 163-166.
- Lam, M. W., Mabury, S. A. (2005). Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, 67(2), 177-188.

- Lanzalaco, S., Armelin, E. (2017). Poly (*N*-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications. *Gels*, 3(36), 1-31.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H. (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147-168.
- Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M. (2003). Preparation of liposomes. In: R. R. C. New (Ed.), *Liposomes: a practical approach*, (pp. 3-29). Oxford: Oxford University Press.
- Lašić, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321.
- Lee, W. F., Yeh, Y. C. (2005). Studies on preparation and properties of NIPAAm/hydrophobic monomer copolymeric hydrogels. *European Polymer Journal*, 41(10), 2488-2495.
- Lee, W. F., Lee, S. C. (2007). Effect of gelatin on the drug release behaviors for the organic hybrid gels based on *N*-isopropylacrylamide and gelatin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(6), 1089-1096.
- Lee, W. F., Huang, C. T. (2008). Immobilization of trypsin by thermo-responsive hydrogel for the affinity separation of trypsin inhibitor. *Desalination*, 234(1-3), 195-203.
- Lee, W. F., Cheng, T. S. (2013). Effect of monomer composition on the properties of biodegradable poly (NIPAAm-AA-PCLdA) copolymeric hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(1), 230-238.
- Li, Z., Guan, J. (2011). Hydrogels for cardiac tissue engineering. *Polymers*, 3(2), 740-761.
- Li, J., Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 16071.
- Lian, T., Ho, R. J. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(6), 667-680.
- Lin, H. O., Guillory, J. K. (1970). Polymorphism in sulfanilamide-d4. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(7), 972-975.
- Lin, C. C., Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1379-1408.
- Liu, X. M., Pramoda, K. P., Yang, Y. Y., Chow, S. Y., He, C. (2004). Cholesteryl-grafted functional amphiphilic poly (*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-hydroxymethylacrylamide): synthesis, temperature-sensitivity, self-assembly and encapsulation of a hydrophobic agent. *Biomaterials*, 25(13), 2619-2628.

- Liu, R., He, P., Li, Z., Li, R. (2011). Simultaneous determination of 16 sulfonamides in animal feeds by UHPLC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 49(8), 640-646.
- Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., He, N. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research*, 5, 17014.
- Loftsson, T., Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 1-11.
- Loftsson, T., Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1607-1621.
- Loftsson, T., Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3019-3032.
- Loftsson, T., Moya-Ortega, M. D., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2016). Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(5), 544-555.
- Lopes, R., Eleutério, C. V., Gonçalves, L. M. D., Cruz, M. E. M., Almeida A. J. (2012). Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4), 442-450.
- Ma, X. M., Li, R., Ren, J., Lv, X. C., Zhao, X. H., Ji, Q., Xia, Y. Z. (2017). Restorable, high-strength poly (*N*-isopropylacrylamide) hydrogels constructed through chitosan-based dual macro-cross-linkers with rapid response to temperature jumps. *RSC Advances*, 7(75), 47767-47774.
- Mah, E., Ghosh, R. (2013). Thermo-responsive hydrogels for stimuli-responsive membranes. *Processes*, 1(3), 238-262.
- Mahinroosta, M., Farsangi, Z. J., Allahverdi, A., Shakoori, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, 8, 42-55.
- Manjula, B., Varaprasad, K., Sadiku, R., Ramam, K., Reddy, G. V. S., Raju, K. M. (2014). Development of microbial resistant thermosensitive Ag nanocomposite (gelatin) hydrogels via green process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(4), 928-934.

- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326.
- Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 44(9), 3039-3046.
- McCarty, J. M., Richard, G., Huck, W., Tucker, R. M., Tosiello, R. L., Shan, M., Heyd, A., Echols, R. M. (1999). A randomized trial of short-course ciprofloxacin, ofloxacin, or trimethoprim/sulfamethoxazole for the treatment of acute urinary tract infection in women. *The American Journal of Medicine*, 106(3), 292-299.
- Means, A. K., Ehrhardt, D. A., Whitney, L. V., Grunlan, M. A. (2017). Thermoresponsive Double Network Hydrogels with Exceptional Compressive Mechanical Properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 38(20), 1700351.
- Mihajlovic, L. (2006). Ciklodekstrini-struktura, prirodni izvori, primena. *Hemijski Pregled*, 47, 82-86.
- Milenković, S. M., Bărbînță-Pătrașcu, M. E., Baranga, G., Marković, D. Z., Tugulea, L. (2013). Comparative spectroscopic studies on liposomes containing chlorophyll a and chlorophyllide a. *General Physiology and Biophysics*, 32(4), 559-567.
- Miller-Hjelle, M. A., Somaraju, V., Hjelle, J. T. (2004). In: C. R. Craig, R. E. Stitzel (Eds.), *Modern Pharmacology with Clinical Applications* (pp. 515-525). Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
- Montoro, S. R., de Fátima Medeiros, S., Alves, G. M. (2014). Nanostructured hydrogels. In: S. Thomas, R. Shanks, S. Chandrasekharakurup (Eds.), *Nanostructured polymer blends* (pp. 325-355). Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: William Andrew Publishing.
- Moogooee, M., Ramezanzadeh, H., Jasoori, S., Omid, Y., Davaran, S. (2011). Synthesis and *in vitro* studies of cross-linked hydrogel nanoparticles containing amoxicillin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(3), 1057-1066.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711-719.
- Munro, I. C., Newberne, P. M., Young, V. R., Bär, A. (2004). Safety assessment of γ -cyclodextrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 3-13.

- Müller, R. H., Harden, D., Keck, C. M. (2012). Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38(4), 420-430.
- Nagaoka, N., Safrani, A., Yoshida, M., Omichi, H., Kubota, H., Katakai, R. (1993). Synthesis of poly (*N*-isopropylacrylamide) hydrogels by radiation polymerization and crosslinking. *Macromolecules*, 26(26), 7386-7388.
- Najafi, M., Hebels, E., Hennink, W. E., Vermonden, T. (2018). Poly (*N*-isopropylacrylamide): Physicochemical Properties and Biomedical Applications. In: V. V. Khutoryanskiy, T. K. Georgiou (Eds.), *Temperature-Responsive Polymers: Chemistry, Properties and Applications* (pp. 1-34). Chichester: John Wiley & Sons.
- Neu, H. C., Gootz, T. D. (1996). Antimicrobial chemotherapy. In: S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th edition). Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Nikolić, V., Stankovic, M., Kapor, A., Nikolić, Lj., Cvetkovic, D., Stamenković, J. (2004). Allylthiosulfinate:β-cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and microbiological activity. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(11), 845-848.
- Nikolić, V., Ilić, D., Nikolić, Lj., Stanković, M., Cakić, M., Stanojević, L., Kapor, A., Popsavin, M. (2010). The protection of nifedipin from photodegradation due to complex formation with β-cyclodextrin. *Open Chemistry*, 8(4), 744-749.
- Nikolić, V., Stanković, M., Nikolić, Lj., Nikolić, G., Ilić-Stojanović, S., Popsavin, M., Zlatković, S. Kundaković, T. (2012). Inclusion complexes with cyclodextrin and usnic acid. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 76(1-2), 173-182.
- Ogue, S., Takahashi, Y., Onishi, H., Machida, Y. (2006). Preparation of double liposomes and their efficiency as an oral vaccine carrier. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1223-1228.
- Panda, A., Manohar, S. B., Sabharwal, S., Bhardwaj, Y. K., Majali, A. B. (2000). Synthesis and swelling characteristics of poly (*N*-isopropylacrylamide) temperature sensitive hydrogels crosslinked by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 58(1), 101-110.
- Patrascu, M. E. B., Tugulea, L., Lacatusu, I., Meghea, A. (2010). Spectral characterization of model systems containing lipids and chlorophyll. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 522(1), 148-448.

- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Engel, R. G. (2011). Introduction to organic laboratory techniques: A smallscale approach, (pp. 363-370). Canada: Brooks Cole.
- Pemberton, M. A., Lohmann, B. S. (2014). Risk Assessment of residual monomer migrating from acrylic polymers and causing Allergic Contact Dermatitis during normal handling and use. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), 467-475.
- Peppas, N. A. (1991). Physiologically responsive hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 6(3), 241-246.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27-46.
- Periša, M., Babić, S., Škorić, I., Frömel, T., Knepper, T. P. (2013). Photodegradation of sulfonamides and their N4-acetylated metabolites in water by simulated sunlight irradiation: kinetics and identification of photoproducts. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(12), 8934-8946.
- Piacentini, E. (2016). Encapsulation Efficiency. In: E. Drioli, L. Giorno (Eds.), *Encyclopedia of Membranes* (pp. 706-707). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Popova, A. D., Georgieva, M. K., Petrov, O. I., Petrova, K. V., Velcheva, E. A. (2007). IR spectral and structural studies of 4-aminobenzenesulfonamide (sulfanilamide)-d₀, -d₄, and -¹⁵N, as well as their azanions: Combined DFT B3LYP/experimental approach. *International Journal of Quantum Chemistry*, 107(8), 1752-1764.
- Prabhu V., Chatson K. B., Lui H., Abrams G. D., King J. (1998). Effects of sulfanilamide and methotrexate on ¹³C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 116(1), 137-144.
- Qiu, Y., Park, K. (2012). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 49-60.
- Rantz, L. A., Kirby, W. M. (1942). The use of sulfaguanidine in the treatment of dysentery carriers. *Journal of the American Medical Association*, 118(15), 1268-1271.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S. (1976). *U.S. Patent No. 3,939,049*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Ribeiro, C. A., Martins, M. V. S., Bressiani, A. H., Bressiani, J. C., Leyva, M. E., de Queiroz, A. A. A. (2017). Electrochemical preparation and characterization of PNIPAM-HAp scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 156-166.

- Ronald, A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American Journal of Medicine*, 113(1), 14-19.
- Sági, G., Csay, T., Szabó, L., Pátzay, G., Csonka, E., Takács, E., Wojnárovits, L. (2015). Analytical approaches to the OH radical induced degradation of sulfonamide antibiotics in dilute aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 52-60.
- Saha, S., Roy, A., Roy, K., Roy, M. N. (2016). Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*, 6, 35764.
- Sahin, J., Ozdemir, N. (2018). Study on increasing the solubility and dissolution rate of sulfamethoxazole by cyclodextrins. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(24), 329-340.
- Sakiyama, Y., Kanda, N., Higuchi, Y., Yoshimura, M., Wakaguri, H., Takata, Y., Watanabe, O., Yuan, J., Tashiro, Y., Saigo, R., Nozuma, S., Yoshimura, A., Arishima, S., Ikeda, K., Shinohara, K., Arata, H., Michizono, K., Higashi, K., Hashiguchi, A., Okamoto, Y., Hirano, R., Shiraishi, T., Matsuura, E., Okubo, R., Higuchi, I., Goto, M., Hirano, H., Sano, A., Iwasaki, T., Matsuda, F., Izumo, S., Takashima, H. (2015). New type of encephalomyelitis responsive to trimethoprim/sulfamethoxazole treatment in Japan. *Neurology – Neuroimmunology Neuroinflammation*, 2(5), e143.
- Salústio, P. J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., Marques, H. M. C. (2011). Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1276-1292.
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, 23(5), 1161.
- Savić, I. M., Nikolić, V. D., Savić-Gajić, I., Nikolić, Lj. B., Radovanović, B. C., Mladenović, J. D. (2015). Investigation of properties and structural characterization of the quercetin inclusion complex with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 82(3-4), 383-394.
- Schild, H. G. (1992). Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, 17(2), 163-249.
- Seishima, R., Okabayashi, K., Nagano, O., Hasegawa, H., Tsuruta, M., Shimoda, M., Kameyama, K., Saya, H., Kitagawa, Y. (2016). Sulfasalazine, a therapeutic agent for ulcerative colitis, inhibits the growth of CD44^{v9+} cancer stem cells in ulcerative

- colitis-related cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 40(4), 487-493.
- Sensoy, D., Cevher, E., Sarıci, A., Yılmaz, M., Özdamar, A., Bergişadi, N. (2009). Bioadhesive sulfacetamide sodium microspheres: evaluation of their effectiveness in the treatment of bacterial keratitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(3), 487-495.
- Shaik, M. R., Korsapati, M., Panati, D. (2012). Polymers in controlled drug delivery systems. *International Journal of Pharma Sciences*, 2(4), 112-116.
- Sharma, A., Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123-140.
- Shazly, G., Nawroth, T., Langguth, P. (2008). Comparison of dialysis and dispersion methods for *in vitro* release determination of drugs from multilamellar liposomes. *Dissolution Technologies*, 15(2), 7-10.
- Shen, J., Burgess, D. J. (2013). *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(5), 409-415.
- Shibayama, M., Tanaka, T. (1993). Volume phase transition and related phenomena of polymer gels. In: K. Dušek (Ed.), *Responsive gels: volume transitions I*, (pp. 1-62). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., David, L. B. (2014). Spectrometric identification of organic compounds (8th edition). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Sköld, O. (2009). Sulfonamides and trimethoprim. In: D. L. Mayers (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 259-269). Basel: Humana Press.
- Snyder, R. W., Glasser, D. B. (1994). Antibiotic therapy for ocular infection. *Western Journal of Medicine*, 161(6), 579-584.
- Soheilian, M., Sadoughi, M. M., Ghajarnia, M., Dehghan, M. H., Yazdani, S., Behboudi, H., Anisian, A., Peyman, G. A. (2005). Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, 112(11), 1876-1882.
- Song, F., Li, X., Wang, Q., Liao, L., Zhang, C. (2015). Nanocomposite hydrogels and their applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(1), 40-52.

- Strauss, E., Lowell, F. C., Taylor, F. L., Finland, M. (1941). Observations on the absorption, excretion and distribution of sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole and sulfamethylthiazole. *Annals of Internal Medicine*, 14(8), 1360-1382.
- Struller, T. (1968). Long-acting and short-acting sulfonamides. Recent developments. In: O. Gsell (Ed.), *Antibiotics and Chemotherapy* (Vol. 14) (pp. 179-215). Basel: Karger Publishers.
- Sukul, P., Spiteller, M. (2006). Sulfonamides in the environment as veterinary drugs, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 187, 67-101.
- Swanson, M. A., Cori, C. F. (1948). Studies on the structure of polysaccharides I. Acid hydrolysis of starch-like polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 172(2), 797-804.
- Szejtli, J. (1987). The metabolism, toxicity and biological effects of cyclodextrins. In: D. Duchene (Ed.), *Cyclodextrins and Their Industry Use* (pp. 173-210). Paris: Editions de Santé.
- Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology* (pp. 1-66). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Szoka, F., Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 75(9), 4194-4198.
- Talsma, H., Jousma, H., Nicolay, K., Crommelin, D. J. A. (1987). Multilamellar or multivesicular vesicles? *International Journal of Pharmaceutics*, 37(1-2), 171-173.
- Tamirisa, P. A., Koskinen, J., Hess, D. W. (2006). Plasma polymerized hydrogel thin films. *Thin Solid Films*, 515(4), 2618-2624.
- Taşdelen, B., Kayaman-Apohan, N., Güven, O., Baysal, B. M. (2004). pH-thermoreversible hydrogels. I. Synthesis and characterization of poly (*N*-isopropylacrylamide/maleic acid) copolymeric hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 69(4), 303-310.
- Tavakoli, J., Tang, Y. (2017). Hydrogel based sensors for biomedical applications: An updated review. *Polymers*, 9(8), 364.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3-S10.
- Teo, B. M., Prescott, S. W., Price, G. J., Grieser, F., Ashokkumar, M. (2010). Synthesis of temperature responsive poly(*N*-isopropylacrylamide) using ultrasound irradiation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(9), 3178-3184.

- Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., Langer, R. (2016). Emerging frontiers in drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 704-717.
- Topaçli, C., Topaçli, A. (2003). *Ab initio* calculations and vibrational structure of sulfanilamide. *Journal of Molecular Structure*, 644(1-3), 145-150.
- Toscani, S., Thorén, S., Agafonov, V., Céolin, R., Dugué, J. (1995). Thermodynamic study of sulfanilamide polymorphism:(I) monotropy of the α -variety. *Pharmaceutical Research*, 12(10), 1453-1456.
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F., Agüera, A., Sirtori, C., Fernández-Alba, A. R. (2009). Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere*, 77(10), 1292-1298.
- Trumbore, M. W., Goldstein, J. A., Gurge, R. M. (2009). Treatment of papulopustular rosacea with sodium sulfacetamide 10%/sulfur 5% emollient foam. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, 8(3), 299-304.
- Tsao, J. Y., Tsai, H. H., Wu, C. P., Lin, P. Y., Su, S. Y., Chen, L. D., Tsai, F. J., Tsai, Y. (2010). Release of paeonol- β -CD complex from thermo-sensitive poly (*N*-isopropylacrylamide) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1-2), 123-128.
- Ulijn, R. V., Bibi, N., Jayawarna, V., Thornton, P. D., Todd, S. J., Mart, R. J., Smith, A. M., Gough, J. E. (2007). Bioresponsive hydrogels. *Materials Today*, 10(4), 40-48.
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414-433.
- United States Pharmacopeia 40 and National Formulary 35 (USP40-NF35), 2017. Betadex Sulfobutyl Ether Sodium. The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville, MD.
- U. S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. (2017). *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics classification system - guidance for industry*. Washington, DC: Author.
- U. S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. (2018). *Liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation - guidance for industry*. New Hampshire: Author.

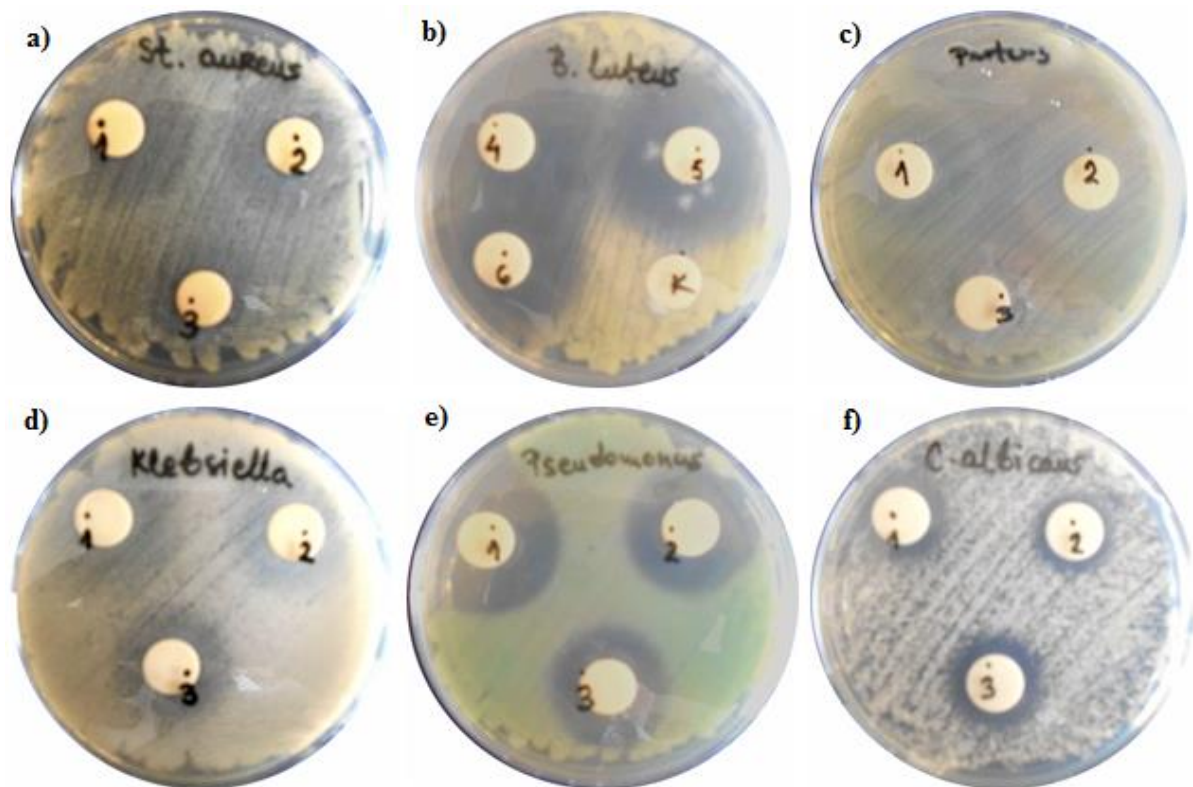
- U. S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Inactive ingredient search for approved drug products*. Dostupno na: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> [Pristupljeno 04.06.2019.].
- Vaitkus, R., Grincienė, G., Norkus, E. (2008). Peculiarities of β -cyclodextrin acid hydrolysis. *Chemija*, 19(3-4), 48-51.
- Van Meter, K. C., Hubert, R. J. (2015). *Microbiology for the healthcare professional*. St. Louis: Elsevier.
- Varagić, V. M., Milošević, M. P. (2009). Farmakologija (pp. 622-627). Beograd: Elitmedica.
- Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M., Sadiku, R. (2017). A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 958-971.
- Varghese, H. T., Panicker, C. Y., Philip, D. (2006). Vibrational spectroscopic studies and *ab initio* calculations of sulfanilamide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(1), 155-158.
- Veljković, R. S. (1969). Hemijska kinetika. Beograd: Gradjevinska knjiga.
- Vellekoop, M. J., Puchberger, D. (2018). Hydrogels for imaging, sensing and diagnostics. In: T. R. R. Singh, G. Laverty, R. Donnelly (Eds.), *Hydrogels* (pp. 148-161). Boca Raton: CRC Press.
- Vemuri, S., Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70(2), 95-111.
- Vena, A., Falcone, M., Comandini, E., Meledandri, M., Novelli, A., Campanile, F., Stefani, S., Venditti, M. (2013). Daptomycin plus trimethoprim/sulfamethoxazole combination therapy in post-neurosurgical meningitis caused by linezolid – resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(1), 99-102.
- Vree, T. B., Schoondermark-van de Ven, E., Verwey-van Wissen, C. P., Baars, A. M., Swolfs, A., van Galen, P. M., Amatdjais-Groenen, H. (1995). Isolation, identification and determination of sulfadiazine and its hydroxy metabolites and conjugates from man and rhesus monkey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 670(1), 111-123.
- Wang, J., Wu, W., Lin, Z. (2008). Kinetics and thermodynamics of the water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene copolymer hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(5), 3018-3023.

- Wang, P., Zhou, T., Wang, R., Lim, T. T. (2011). Carbon-sensitized and nitrogen-doped TiO₂ for photocatalytic degradation of sulfanilamide under visible-light irradiation. *Water Research*, 45(16), 5015-5026.
- Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., Porter, C. J. (2013). Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 315-499.
- Williamson, K. L., Masters, K. M. (2011). Macroscale and microscale organic experiments (pp. 565-588). Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Wittung, P., Kajanus, J., Kubista, M., Malmström, B. G. (1994). Absorption flattening in the optical spectra of liposome-entrapped substances. *FEBS Letters*, 352(1), 37-40.
- Xu X, Khan MA, Burgess DJ. (2012) A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 426(1-2), 211-218.
- Yamabe, K., Kato, Y., Onishi, H., & Machida, Y. (2003). *In vitro* characteristics of liposomes and double liposomes prepared using a novel glass beads method. *Journal of Controlled Release*, 90(1), 71-79.
- Yazici, A., Ozdal, P. Ç., Taskintuna, I., Kavuncu, S., Koklu, G. (2009). Trimethoprim/Sulfamethoxazole and azithromycin combination therapy for ocular toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 17(4), 289-291.
- Yergey, A. L., Blank, P. S., Cologna, S. M., Backlund, P. S., Porter, F. D., Darling, A. J. (2017). Characterization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrins used in the treatment of Niemann-Pick Disease type C1. *PloS One*, 12(4), e0175478.
- Yingchoncharoen, P., Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. (2016). Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacological Reviews*, 68(3), 701-787.
- Young, C. D., Wu, J. R., Tsou, T. L. (1998). Fabrication and characteristics of polyHEMA artificial skin with improved tensile properties. *Journal of Membrane Science*, 146(1), 83-93.
- Zafar, M., Shah, T., Rawal, A., Siores, E. (2014). Preparation and characterisation of thermoresponsive nanogels for smart antibacterial fabrics. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 135-141.
- Zhang, X. Z., Yang, Y. Y., Chung, T. S., Ma, K. X. (2001). Preparation and characterization of fast response macroporous poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels. *Langmuir*, 17(20), 6094-6099.

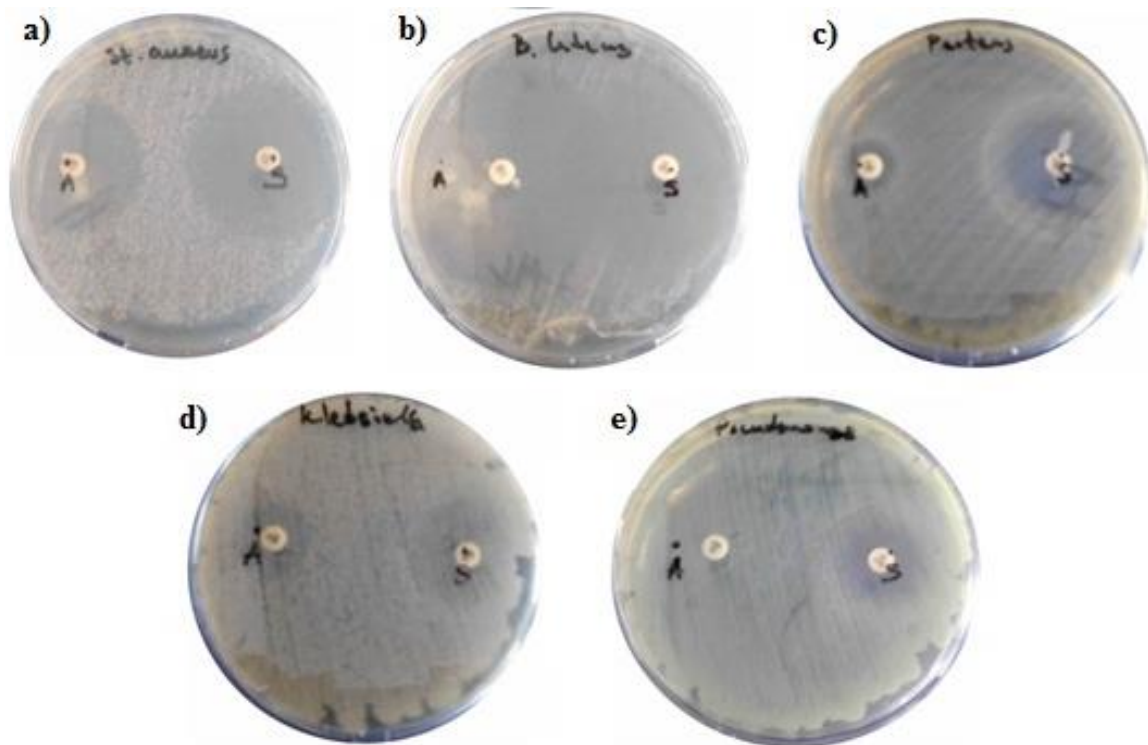
- Zhang, J. A., Anyarambhatla, G., Ma, L., Ugwu, S., Xuan, T., Sardone, T., Ahmad, I. (2005). Development and characterisation of a novel Cremophor EL free liposome based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(1), 177-187.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263-271.
- Zhao, Z., Li, Z., Xia, Q., Xi, H., Lin, Y. (2008). Fast synthesis of temperature-sensitive PNIPAAm hydrogels by microwave irradiation. *European Polymer Journal*, 44(4), 1217-1224.
- Zessel, K., Mohring, S., Hamscher, G., Kietzmann, M., Stahl, J. (2014). Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere*, 100, 167-174.
- Zumbuehl, O., Weder, H. G. (1981). Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 640(1), 252-262.

PRILOZI

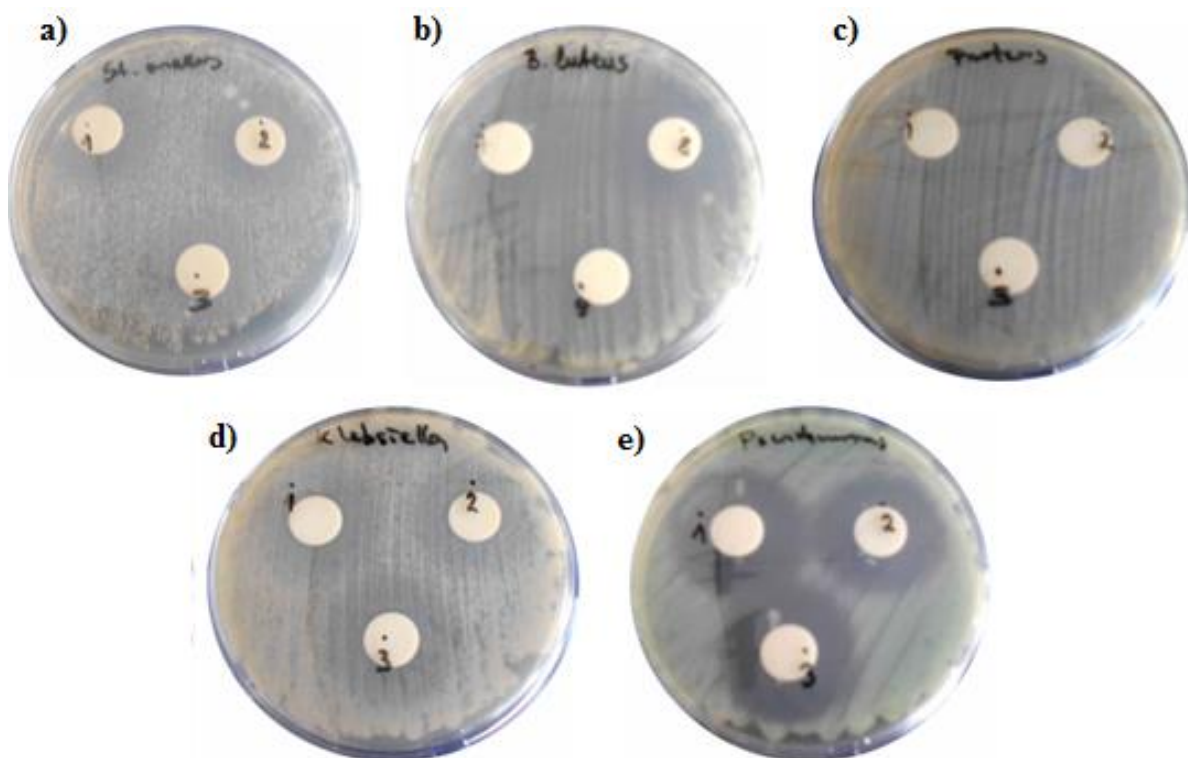
Prilog 1: Antimikrobna aktivnost čistog sulfanilamida i sulfanilamida u inkluzionim kompleksima



Slika 1.1. Antimikrobna aktivnost različitih koncentracija sulfanilamida (1–1000 μg , 2–500 μg , 3–250 μg , 4–125 μg , 5–62,5 μg , 6–31,25 μg , K–kontrola, DMSO) na: a) *Staphylococcus aureus*, b) *Bacillus luteus*, c) *Proteus vulgaris*, d) *Klebsiella pneumoniae*, e) *Pseudomonas aeruginosa*, i f) *Candida albicans*

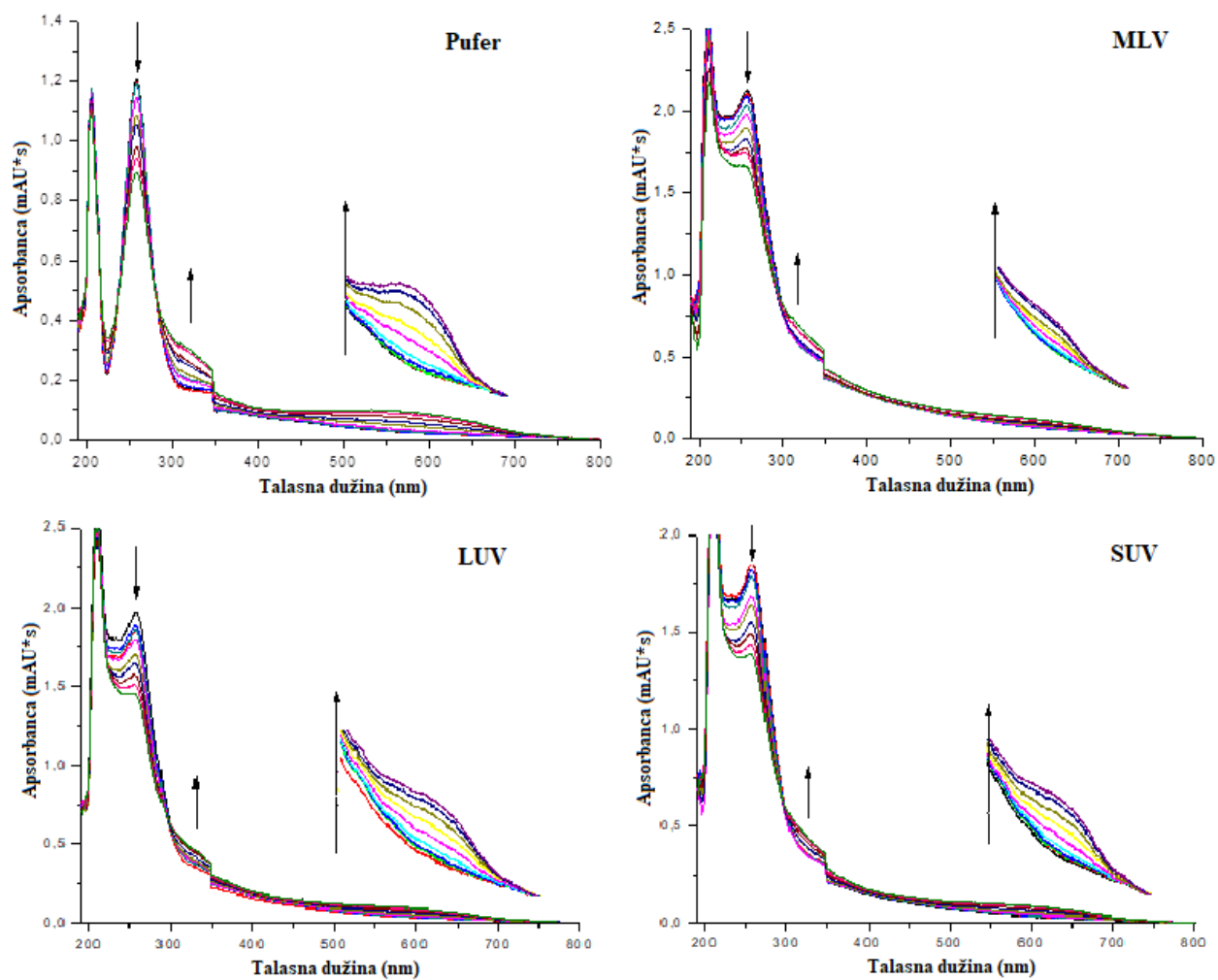


Slika 1.2. Antimikrobna aktivnost ampicilina (A) i kombinacije sulfametoksazol/trimetoprim (S) na: a) *Staphylococcus aureus*, b) *Bacillus luteus*, c) *Proteus vulgaris*, d) *Klebsiella pneumoniae*, i e) *Pseudomonas aeruginosa*

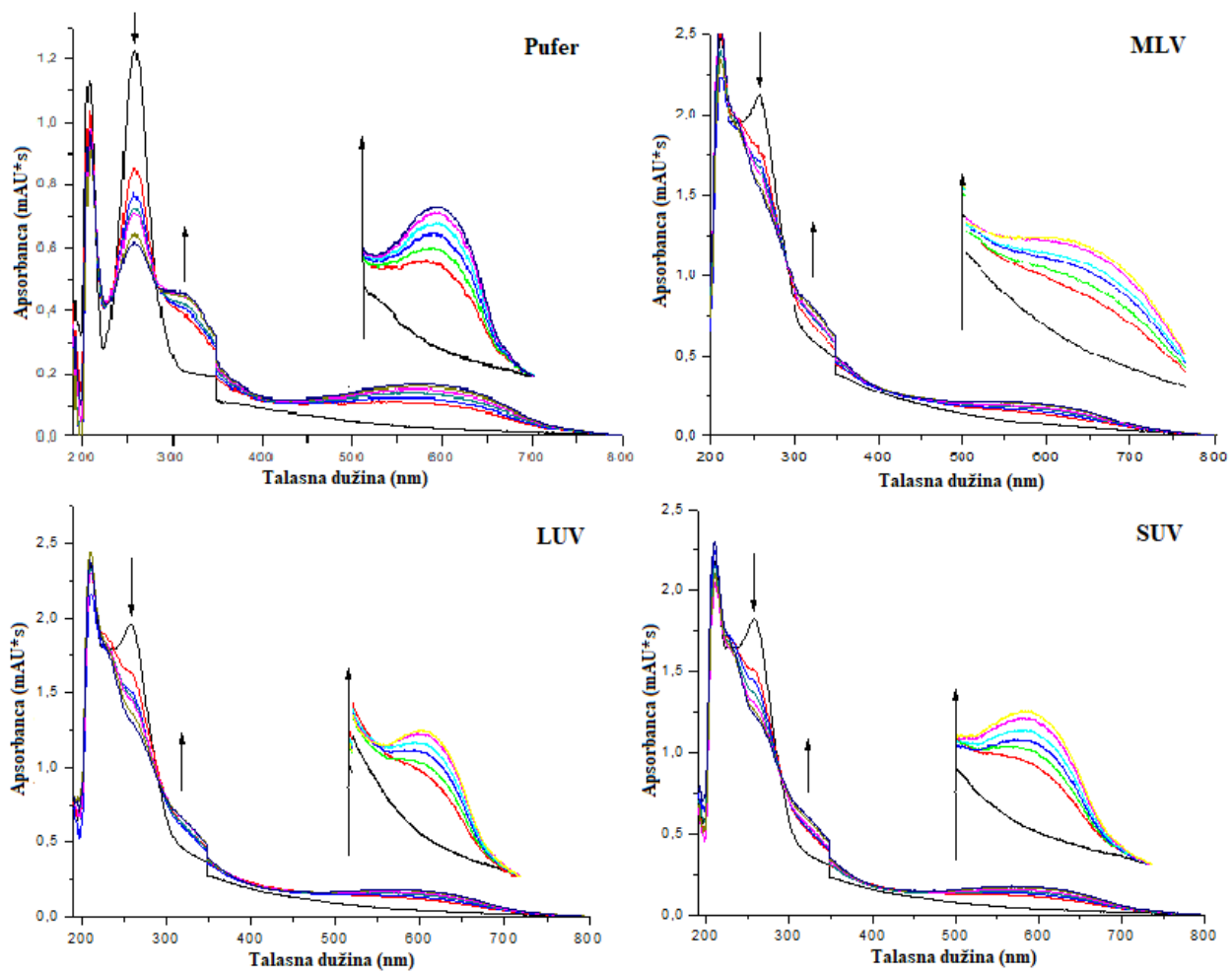


Slika 1.3. Antimikrobna aktivnost inkluzionog kompleksa sulfanilamid: β -ciklodekstrin (1–250 $\mu\text{g}/\text{disku}$; 7–15,5 $\mu\text{g}/\text{disku}$), sulfanilamida (2–250 $\mu\text{g}/\text{disku}$; 8–15,5 $\mu\text{g}/\text{disku}$) i inkluzionog kompleksa sulfanilamid:2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (3–250 $\mu\text{g}/\text{disku}$; 9–15,5 $\mu\text{g}/\text{disku}$) na: a) *Staphylococcus aureus*, b) *Bacillus luteus*, c) *Proteus vulgaris*, d) *Klebsiella pneumoniae*, i e) *Pseudomonas aeruginosa*

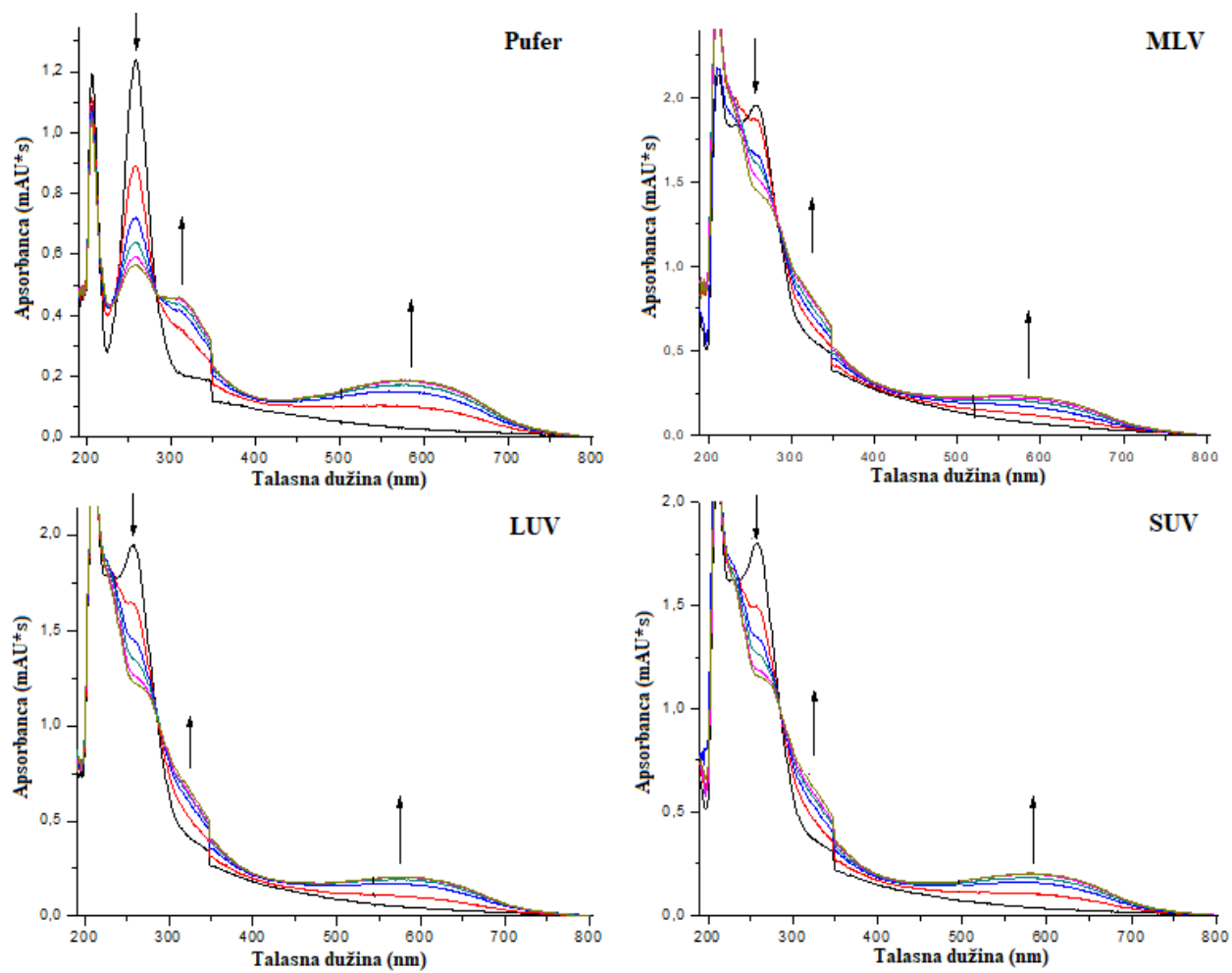
Prilog 2: UV-Vis spektri sulfanilamida u puferu i liposomima



Slika 2.1. Promena UV-Vis spektara sulfanilamida u puferu i liposomima usled delovanja UV-A zračenja tokom 150 min



Slika 2.2. Promena UV-Vis spektara sulfanilamida u puferu i liposomima usled delovanja UV-B zračenja tokom 3 min



Slika 2.3. Promena UV-Vis spektara sulfanilamida u puferu i liposomima usled delovanja UV-C zračenja tokom 0,5 min

BIOGRAFIJA

Ana D. Tačić je rođena 29.08.1988. godine u Nišu. Osnovnu školu „Branko Radičević“ završila je u Brestovcu, sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom, kao učenik generacije. Srednju Medicinsku školu u Leskovcu, smer farmaceutski tehničar, završila je sa odličnim uspehom i Vukovom diplomom. Godine 2007. upisala je integrisane akademske studije farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu. Fakultet je završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,71. Diplomski rad pod nazivom „Derivati celuloze u formulacijama oralnih gela sa glukozom i saharozom“ odbranila je 27.09.2012. godine, sa ocenom 10, i stekla zvanje Magistar farmacije. Za vreme trajanja studija bila je korisnik stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a na završnoj godini studija stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije.

Doktorske akademske studije upisala je školske 2012/2013. godine na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, smer Tehnološko inženjerstvo. Položila je sve ispite predviđene planom i programom, sa prosečnom ocenom 10. Angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR-34012 "Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije" od 2013. godine kao stipendista, a od 2017. godine kao istraživač-saradnik. Počev od školske 2014/2015. godine, bila je angažovana u izvođenju praktične nastave na osnovnim i master studijama na predmetima: Tehnologija prirodnih organskih proizvoda, Tehnologija lekovitog i začinskog bilja, Fitofarmaceutski preparati i Nosači lekovitih supstanci.

Kandidat se kontinuirano bavi naučno-istraživačkim radom. Autor je i koautor 3 poglavlja, 5 radova objavljenih u međunarodnim časopisima, 4 rada u nacionalnim časopisima, 10 radova saopštenih na međunarodnim skupovima i 26 radova saopštenih na skupovima nacionalnog značaja štampanih u izvodu, 10 tehničkih rešenja i jednog patenta.

Aktivno se služi engleskim jezikom.

BIBLIOGRAFIJA

Monografska studija/poglavlje u knjizi M11 ili rad u tematskom zborniku vodećeg međunarodnog značaja M13

1. Vesna Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Sanja Petrović, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić (2019). Administration routes for nano drugs and characterization of nano drug loading. In: S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, S. Thomas (Eds). Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery, Elsevier Book. pp. 587-625.

Monografska studija/poglavlje u knjizi M12 ili rad u tematskom zborniku međunarodnog značaja M14

1. Sanja Petrović, Snežana Ilić-Stojanović, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić (2018). Vesicular drug carriers as delivery systems, In: R. K. Keservani, A. K. Sharma, (Eds). Nanoconjugate Nanocarriers for Drug Delivery, Apple Academic Press. pp. 167-200.
2. Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Dušica Ilić, Ivan S. Ristić, Ana Tačić (2017). Polymeric matrix systems for drug delivery. In: R.K. Keservani, A.K. Sharma, R.K. Kesharwani, (Eds). Drug Delivery Approaches and Nanosystems, Vol.1: Novel Drug Carriers. Apple Academic Press. pp. 95-131.

Rad u vodećem međunarodnom časopisu M22

1. Sanja Petrović, Ana Tačić, Saša Savić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Sanela Savić (2017). Sulfanilamide in solution and liposome vesicles; *in vitro* release and UV-stability studies, Saudi Pharmaceutical Journal, 25(8):1194-1200.
2. Marina Kolundžić, Tatjana Stanojković, Jelena Radović, Ana Tačić, Margarita Dodevska, Marina Milenković, Francesca Sisto, Carla Masia, Giampietro Farronato, Vesna Nikolić, Tatjana Kundaković (2017). Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Cantharellus cibarius* Fr. (Cantarellaceae), Journal of Medicinal Food, 20(8):790-796.
3. Ana Tačić, Ivan Savić, Vesna Nikolić, Ivana Savić, Snežana Ilić-Stojanović, Dušica Ilić, Slobodan D. Petrović, Mirjana Popsavin, Agneš Kapor (2014). Inclusion complexes of sulfanilamide with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 80:113-124.

Rad u međunarodnom časopisu M23

1. Dušica P. Ilić, Sanja Stojanović, Stevo Najman, Vesna D. Nikolić, Ljiljana P. Stanojević, Ana D. Tačić, Ljubiša B. Nikolić (2015). Biological evaluation of synthesized allicin and its transformation products obtained by microwaves in methanol: antioxidant activity and effect on cell growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1):189-194.

Rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom M24

1. Marina Kolundžić, Jelena Radović, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Tatjana Kundaković (2018). Elemental composition and nutritional value of three edible mushrooms from Serbia, *Zaštita Materijala*, 59(1):45-50.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u izvodu M34

1. Ivana Nikolić, Sanja Petrović, Ana Tačić, Tatjana Mihajlov-Krstev, Zorica Stojanović-Radić (2018). Antimicrobial activity of biochanin A against *Helicobacter pylori*, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, November 02-03, Teslić, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 66.
2. Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Sanja Petrović, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić (2018). Antioxidative activity of biochanin A and its inclusion complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, November 02-03, Teslić, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 67.
3. Ana Tačić, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Vesna Nikolić, Ivana Nikolić (2018). The chemical composition and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, November 02-03, Teslić, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 68.
4. Ana Tačić, Sanja Petrović, Saša Savić, Sanela Savić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić (2018). UV-stability studies of sulfanilamide in liposome vesicles, Sixth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, June 18-22, Ohrid, Macedonia, Book of Abstracts, p. 369.
5. Ana Tačić, Sanja Petrović, Vesna Nikolić, Saša Savić, Ljubiša Nikolić, Ivana Nikolić (2018). Identification of sulfanilamide degradation products after UV irradiation,

Sixth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, June 18-22, Ohrid, Macedonia, Book of Abstracts, p. 370.

6. Marina Kolundžić, Jelena Radović, Ana Tačić, Margarita Dodevska, Marina Milenković, Vesna Nikolić, Tatjana Kundaković (2017). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial activity of *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers., Cantharellaceae, The 9th International Medicinal Mushrooms Conference, September 24-28, Palermo, Italy, Book of Abstracts, p. 156.
7. Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivana Nikolić, Saša Savić, Sanja Milenković (2016). The macro and microelements content in the nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seed and antioxidant activity of nutmeg seeds essential oil, 13th Congress of Nutrition, October 26-28, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, pp. 179-180.
8. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Saša Savić, Ivan Savić, Sanja Milenković (2016). The content of macro and microelements in seed and dry extract of chickpea (*Cicer arietinum* L.), 13th Congress of Nutrition, October 26-28, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 210.
9. Ivan Savić, Ana Tačić, Miljana Randelović, Vesna Nikolić, Dušica Ilić, Agneš Kapor, Mirjana Popsavin (2013). Inclusion Complexes of Sulfonamides with Cyclodextrines, 3rd European Conference on Cyclodextrins, October 2-4, Antalia, Turkey, Book of Abstracts.
10. Emilija Jocić, Vesna Milosavljević, Ana Tačić, Emilija Gazikalović, Marija Toskić-Radojičić (2012). Effect of excipients on pharmaceutical and technological properties of uncoated tablets lithii carbonas, 72nd International Congress of FIP, October 3-8, Amsterdam, the Netherlands, Book of Abstracts.

Rad u časopisu nacionalnog značaja M52

1. Ivana Lj. Nikolić, Ivana M. Savić-Gajić, Ana D. Tačić, Ivan M. Savić (2017). Classification and biological activity of phytoestrogens: a review, *Advanced Technologies*, 6(2):96-106.
2. Ana Tačić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivan Savić (2017). Antimicrobial sulfonamide drugs, *Advanced Technologies*, 6(1):58-71.
3. Nikola Gligorijević, Milena Kostić, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić (2017). Antimicrobial properties of acrylic resins for dentures impregnated with silver nanoparticles, *Acta Stomatologica Naissi*, 33(75):1696-1702.

4. Vesna D. Nikolić, Dušica P. Ilić, Ljubiša B. Nikolić, Ljiljana P. Stanojević, Milorad Cakić, Ana Tačić, Snežana Ilić-Stojanović (2014). The synthesis and characterization of iron(II) gluconate, *Savremene tehnologije*, 3(2):16-24.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u izvodu M64

1. Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Vesna Lj. Savić, Jelena Zvezdanović (2018). Antioxidant activity of Osage orange (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.) fruit extracts, XXV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 19-23, Ohrid, Book of abstracts, p. 55.
2. Marina Kolundžić, Jelena Radović, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Tatjana Kundaković (2017). Micro- and macroelements of four edible mushrooms from Serbia, 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, Leskovac, Book of abstracts, p. 60.
3. Marijana Stojković, Vesna Nikolić, Slobodan Petrović, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Ljiljana Takić, Saša Savić (2017). Analysis of macro and microelements in birch sap (*Betula pendula*), 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, Leskovac, Book of abstracts, p. 66.
4. Vesna Nikolić, Ana Tačić, Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Ivan Savić, Aleksandar Zdravković, Ana Ćirić (2017). Swelling of synthesized poly(*N*-isopropylacrylamide) homopolymer hydrogels in different media, 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, Leskovac, Book of abstracts, p. 99.
5. Ana Tačić, Sanja Petrović, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivana Savić-Gajić, Ivan Savić (2017). Sulfanilamide UV-irradiation stability; kinetic studies, 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, Leskovac, Book of abstracts, p. 101.
6. Sanja Petrović, Ana Tačić, Saša Savić, Sanela Savić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić (2017). Sulfanilamide in liposome vesicles: *in vitro* release studies, 12th Symposium „Novel technologies and economic development“, October 20-21, Leskovac, Book of abstracts, p. 102.
7. Ivan Savić, Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ivana Savić-Gajić, Ana Tačić (2016). Modeling total flavonoids extraction from chickpea (*Cicer arietinum* L.), XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 11-14, Ohrid, Book of abstracts, p. 206.

8. Ana Tačić, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić, Dušica Ilić (2016). Modified release of sulfanilamide from poly(*N*-isopropylacrylamide) based hydrogels, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 11-14, Ohrid, Book of abstracts, p. 221.
9. Ana Tačić, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Aleksandar Zdravković, Stevo Najman, Sanja Stojanović (2016). The synthesis and characterization of poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogels and residual reactants analysis, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 11-14, Ohrid, Book of abstracts, p. 288.
10. Ljubiša Nikolić, Aleksandar Zdravković, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ana Tačić, Saša Savić (2016). Influence of pH and temperature on swelling capacity of copolymeric poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-methacrylic acid) hydrogels, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 11-14, Ohrid, Book of abstracts, p. 289.
11. Ana Tačić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić, Bojana Danilović (2016). The chemical composition and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seeds essential oil, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, June 16-19, Kopaonik, Book of abstracts, pp. 108-109.
12. Marijana Stojković, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Bojana Danilović (2016). The chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from birch buds, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, June 16-19, Kopaonik, Book of abstracts, pp. 99-100.
13. Nikola Gligorijević, Ana Tačić, Milena Kostić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić (2016). Antimikrobna aktivnost akrilatnih polimera impregniranih nanočesticama srebra, Simpozijum stomatologa i saradnika sa međunarodnim učešćem, May 17-19, Novi Sad, Zbornik radova, p. 163.
14. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić (2015). The antioxidant activity of the chickpea seed extract (*Cicer arietinum* L.), Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 42.
15. Ljiljana Stanojević, Mihajlo Stanković, Jelena Zvezdanović, Dušica Ilić, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić (2015). The antioxidant activity of *Fumaria officinalis*

- L. aqueous extract, Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 47.
16. Ana Tačić, Vesna Nikolić, Bojana Danilović, Ljubiša Nikolić, Ivan Savić, Aleksandar Zdravković, Dušica Ilić (2015). Antimicrobial activity of synthesized sulfanilamide and its inclusion complexes with cyclodextrins, Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 56.
 17. Dušica Ilić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić (2015). The chemical composition of the essential oil from disintegrated and non-disintegrated fennel fruit (*Foeniculi fructus*), Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 58.
 18. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić (2015). The optimization of the isoflavones extraction from chickpea (*Cicer arietinum* L.), Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 71.
 19. Vesna Savić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivana Arsić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Sanja Stojanović (2015). Characterization of semisolid cream basis with the aqueous extract of comfrey root and allantoin by polarization microscopy, Zbornik izvoda radova XI simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", October 23-24, Leskovac, Book of abstracts, p. 113.
 20. Ana Tačić, Dušica Ilić, Aleksandar Zdravković, Vesna Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivan Savić (2014). Synthesis and characterization of anesthesin and the inclusion complex anesthesin: β -cyclodextrin, XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, October 8-11, Ohrid, Book of abstracts, p. 172.
 21. Ana Tačić, Snežana Ilić-Stojanović, Aleksandar Zdravković, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Dušica Ilić, Agneš Kapor (2014). The potential application of the hydrogel poly(N-isopropylacrylamide) for modified release of aspirin, XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, October 8-11, Ohrid, Book of abstracts, p. 173.
 22. Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Aleksandar Zdravković, Agneš Kapor, Slobodan D. Petrović, Ana Tačić (2014). The inclusion complex of naproxen:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and photostability, 21st Conference of the

Serbian Crystallographic Society, June 13-14, Užice, Serbia, Book of Abstracts, pp. 60-61.

23. Ljiljana Stanojević, Biljana Stanković, Vesna Nikolić, Milorad Cakić, Dragan Cvetković, Dušica Ilić, Ana Tačić (2013). Antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta semena mirođije (*Anethum graveolens* L.) dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom, Četvrti kongres o dijetetskim suplementima sa međunarodnim učešćem, Oktobar 24-25, Beograd, Program i knjiga sažetaka, str. 129-130.
24. Ana Tačić, Emilija Jocić, Marija Toskić-Radojičić, Vesna Savić, Stevo Najman, Vesna Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović (2013). Derivati celuloze u formulacijama oralnih gela sa glukozom i saharozom, Zbornik izvoda radova X simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Oktobar 22-23, Leskovac, Knjiga sažetaka str. 101.
25. Vesna Savić, Ivana Arsić, Milica Stanković, Ana Tačić, Vesna Nikolić (2013). Dugotrajna *in vivo* studija o uticaju gela sa ekstraktom gaveza (*Symphythum officinalae*) na vlažnost kože, Zbornik izvoda radova X simpozijuma "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Oktobar 22-23, Leskovac, Knjiga sažetaka, str. 102.
26. Emilija Jocić, Ana Tačić, Maja Koraćević (2012). Uticaj pomoćnih materija na farmaceutskotehnološke osobine tableta, 53. Kongres studenata biomedicinskih nauka Srbije sa međunarodnim učešćem, April 26-30, Kopaonik, Knjiga sažetaka, str. 77.

Bitno poboljšano tehničko rešenje na nacionalnom nivou M84

1. Vesna Nikolić, Ana Tačić, Sanja Petrović, Ljubiša Nikolić, Saša Savić, Sanela Savić, Fotostabilnost sulfanilamida u liposomskim disperzijama, Ev. br. 04-2360/1. od 21.12.2017. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 04 br. 2360/1 od 21.12.2017. i 04 br. 2360/2 od 21.12.2017. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2017). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
2. Ana Tačić, Sanja Petrović, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Saša Savić, Sanela Savić, Ivan Savić, Laboratorijski tehnološki postupak za izradu liposoma sa inkorporisanim sulfanilamidom, Ev. br. 06-1076/1, od 23.06.2016. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 1098/1 od 27.06.2016. i 06 br. 1099/1 od 27.06.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2016). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
3. Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Jakov Stamenković, Ana Tačić, Aleksandar Zdravković, Laboratorijski tehnološki postupak sinteze

- hidrogelova na bazi umrežene poli(metakrilne kiseline). Ev. br. 06-2442/1, od 19.11.2015. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2468/1 od 20.11.2015. i 06 br. 2460/1 od 20.11.2015. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2015). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
4. Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Jakov Stamenković, Ana Tačić, Aleksandar Zdravković, Laboratorijski tehnološki postupak sinteze pH-osekljivih hidrogelova na bazi akrilne i metakrilne kiseline. Ev. br. 06-2443/1, od 19.11.2015. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2469/1 od 20.11.2015. i 06 br. 2461/1 od 20.11.2015. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2015). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
 5. Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Aleksandar Zdravković, Dušica Ilić, Ivana Savić-Gajić, Ivan Savić, Ana Tačić, Laboratorijski tehnološki postupak izrade inkluzionih kompleksa anestezina sa ciklodekstrinima, Ev. br. 06-2498/1, od 11.12.2014. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2529/1 od 15.12.2014. i 04 br. 2581/1 od 17.12.2014. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2014). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
 6. Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Aleksandar Zdravković, Ana Tačić, Slobodan Petrović, Laboratorijski tehnološki postupak izrade formulacija aspirina sa hidrogelovima na bazi *N*-izopropilakrilamida, Ev. br. 06-2499/1, od 11.12.2014. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2530/1 od 15.12.2014. i 06 br. 2527/1 od 15.12.2014. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2014). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
 7. Vesna Nikolić, Ivan Savić, Ana Tačić, Ivana Savić, Dušica Ilić, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Laboratorijski tehnološki postupak za pripremu inkluzionih kompleksa sulfanilamida sa ciklodekstrinima, Ev. br. 06-2373/1, od 20.12.2013. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2400/1 od 23.12.2011. i 06 br. 2401/1 od 23.12.2013. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2013). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.

Novo tehničko rešenje (nije komercijalizovano) M85

1. Sanja Petrović, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Sanela Savić, Saša Savić, Metoda za praćenje *in vitro* oslobađanja sulfanilamida iz lipozoma, Ev. br. 06-135/1, od 30.01.2017. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 145/1

- od 01.02.2017. i 06 br. 146/1 od 01.02.2017. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2017). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
2. Ana Tačić, Saša Savić, Sanja Petrović, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivan Savić, LC-MS metoda za identifikaciju sulfanilamida u vodenom rastvoru, Ev. br. 06-2249/1, od 19.12.2016. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 06 br. 2253/1 od 20.12.2016. i 06 br. 2254/1 od 20.12.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2016). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.
 3. Ljubiša Nikolić, Ana Tačić, Nikola Gligorijević, Milena Kostić, Nebojša Krunić, Jelena Stanojević, Vesna Nikolić, Razvoj MHE-GC-MS i GC-FID metode za određivanje monomera metilmetakrilata u hladno-polimerizujućem i toplo-polimerizujućem poli(metil metakrilatu), Ev. br. 04-1161/1, od 08.07.2016. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac (recenzije: 04 br. 1183/1 od 11.07.2016. i 06 br. 1184/1 od 11.07.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2016). Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.

Objavljen patent na nacionalnom nivou M94

1. Ljubiša Nikolić, Aleksandar Zdravković, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Ana Tačić, Saša Savić, Sanja Petrović, Hidrogelovi poli(*N*-izopropilakrilamida) za uklanjanje jona teških metala iz rastvora i postupak adsorpcije, **RS-P-2017/0106 A1**, datum prijave patenta 27.01.2017., objava prijave 30.11.2017. Glasnik intelektualne svojine 11/2017.



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

РАЗВОЈ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НАПРЕДНИХ ФАРМАЦЕУТСКИХ СИСТЕМА СА СУЛФАНИЛАМИДОМ

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Ана Д. Тачић



**ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**РАЗВОЈ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НАПРЕДНИХ ФАРМАЦЕУТСКИХ
СИСТЕМА СА СУЛФАНИЛАМИДОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Ана Д. Тачић



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

РАЗВОЈ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НАПРЕДНИХ ФАРМАЦЕУТСКИХ СИСТЕМА СА СУЛФАНИЛАМИДОМ

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Ана Д. Тачић