

Nanokompleksi polimera i površinski aktivne tvari u terapijskim sustavima

Marko Vinceković*, Marija Bujan

Zavod za kemiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

*Autor za dopisivanje:

Marko Vinceković, Zavod za kemiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska, Tel: + 385 (1) 23 93 952
Email: mvincekovic@agr.hr

Originalni znanstveni članak
UDK 678.83:544.344.016.5:615
Prispjelo: srpanj 2010.

Istraženi su nanokompleksi anionskoga biopolimera, karagena i kationske površinski aktivne tvari za primjenu u terapijskim sustavima. Struktura i veličina kompleksa od nano- do mikrodimenzija ovise o koncentraciji i omjeru koncentracija pojedinih komponenata, te linearnoj gustoći naboja na lancu karagena. Faktori o kojima ovisi kompleksiranje jesu elektrostatska i hidrofobna međudjelovanja, te konformacija karagena. Porastom koncentracije karagena, unutar-makromolekulski kompleksi prelaze u među-makromolekulске, koji se postupno reorganiziraju u uređenije strukture, divovske vezikule, talog - dodecila-monijev karagenat i gel. Nastajanje divovskih vezikula i strukturna svojstva netopljivih kompleksa i urušenoga gela pokazuju da je lamelno uređenje strukturna značajka kompleksa karagena i kationske površinski aktivne tvari.

Ključne riječi: Polimeri; Površinski aktivne tvari; Kompleksi; Terapijski sustavi; Vezikule

UVOD

Eksplozivan razvoj nanotehnologije i primjena nanočestica u različitim područjima ljudske djelatnosti u proteklih 30-tak godina znatno utječe i na razvoj terapijskih i dijagnostičkih sustava u medicini (1-4). Temeljna karakteristika nanočestica, osim što imaju nanodimenziju, su posebna svojstva i/ili naglašenija od istih u odnosu na čestice istog materijala, ali većih dimenzija. Nanočestice, odnosno, nanosustavi koriste se u terapijske svrhe za „dostavu“ lijeka (*engl.* drug delivery) u tijelo na kontroliran način od mjesta primjene do terapijskoga cilja. To podrazumijeva prolaz molekula lijeka (aktivna komponenta) kroz različite fiziološke barijere, što predstavlja veliki izazov u nalaženju nanočestica prihvatljivih za ciljanu terapiju.

Aktivne komponente koje se koriste u terapijskim sustavima jesu male molekule, koje se šire kroz tijelo preko krvotoka, dolaze do svih organa u različitim količinama. Za sigurnu i efikasnu terapiju poželjno je da koncentracija aktivne komponente bude približno konstantna za vrijeme trajanja terapije te da njezina koncentracija bude visoka na mjestu djelovanja, ali ne i previsoka, kako ne bi došlo da nepoželjnih nuspojava. Terapijski sustav mora biti pripremljen na način da unaprijedi nakupljanje i otpuštanje aktivne komponente na mjestu njezinoga djelovanja, dok je koncentracija u drugim područjima mala, što je naročito važno kod terapijskih sustava za kancerogena oboljenja. Važno je i da aktivna komponenta ostane stabilna tijekom pohrane, kako ne bi došlo do njenog raspada.

Prema tome temeljna uloga nanonosača lijekova je da (i)

zaštititi lijek od raspadanja, (ii) poboljša apsorpciju lijeka lakšom difuzijom, (iii) kontrolira kinetiku i raspodjelu u tkivu i (iv) olakša prodiranje i raspodjelu u stanici. Veličina nanočestica, koje se koriste u terapijskim sustavima, najčešće je između 50 i 200 nm, što omogućuje da se aktivna komponenta zadrži unutar krvotoka, ali i da se suvišak lako ukloni. Na taj način omogućuje se dostava aktivne komponente do bolesnoga dijela, a da se ne ošteti zdravo tkivo. Pravilnim izborom nanočestica za terapijski sustav postiže se poboljšanje farmakoloških svojstava lijeka, npr. stabilnost u vodi, farmakokinetika, biodistribucija, profili oslobađanja lijeka itd. Korištenje nanočestica u terapijskim sustavima snižuje i potrebnu dozu jer se aktivna komponenta ciljano dovodi do točno određenih stanica i tkiva kontroliranjem brzine otpuštanja (5).

Od prve upotrebe liposoma do danas, u dijagnostici i terapijskim sustavima koriste se različite polimerne i metalne nanočestice, ugljikove tubice, supramolekule površinski aktivnih tvari (micele, vezikule, tekući kristali), dendrimeri, lipoproteini itd. U terapijskim sustavima najzastupljenije su vezikule fosfolipida (liposomi), ali imaju nedostataka kao što su: (i) mala efikasnost enkapsulacije lijeka, (ii) brzo istjecanje topljivih lijekova kada se nalaze u krvotoku i (iii) mala stabilnost. U odnosu na liposome polimerne su nanočestice (i) stabilnije, (ii) pružaju mogućnost kontroliranoga otpuštanja lijekova, (iii) imaju veliku efikasnost enkapsulacije lijeka bez kemijske reakcije, što je važan faktor u sačuvanju djelotvornosti aktivne tvari, (iv) ugradnjom funkcionalnih skupina na površinu čestice (koje „prepoznaju“ bolesno mjesto) postiže se ciljana terapija i (v) mogu se primijeniti na različite načine

– oralno, nazalno, parenteralno, intra-okularno itd. Unatoč tih prednosti polimerne nanočestice imaju i neka ograničenja, koja se prvenstveno odnose na veliku mogućnost agregacije, bilo u tekućem ili suhom stanju. Taj problem se smanjuje dodatkom površinski aktivne tvari (PAT), odnosno korištenjem kompleksa polimera i PAT (5).

Zbog velike raznolikosti struktura molekula polimera i PAT, njihove smjese u vodi imaju brojne mogućnosti stvaranja novih struktura s potpuno novim svojstvima (6-8). Uobičajena klasifikacija sustava polimera i PAT temelji se na tome jesu li polimer i PAT ionski ili neionski. Zbog velikoga broja podataka u znanstvenoj i stručnoj literaturi u radu će se opisati smjese ionskih homopolimera (polielektrolita) i PAT suprotnog naboja.

Međudjelovanja u smjesi polielektrolita i suprotno nabijene ionske PAT su vrlo kompleksna, te ovisno o vrsti, koncentraciji i omjeru koncentracija komponenata mogu nastati nestehiometrijski i stehiometrijski kompleksi od nano- do mikrodimenzija; micidele na lancu polielektrolita, vezikule, mezomorfne faze i gelovi (9, 10-12).

Velik broj aktivnih komponenata jesu amfifilne molekule koje utječu na međupovršine, strukturu i stabilnost koloidnih i samoorganizirajućih sustava, a time i na stabilnost strukture kompleksa polimer/PAT. To je svakako potrebno uzeti u obzir kod dizajniranja nosioca aktivne komponente neovisno o tome je li nosilac otopina micela, vezikula ili faza tekućih kristala. Isto tako je jako važno da svaka od odabranih struktura mora biti „sigurna“ za pacijenta, tj. da ne uzrokuje nikakve štetne popratne pojave.

U ovom radu dat će se pregled primjene kompleksa polimera i površinski aktivnih tvari koji se najčešće koriste u terapijskim sustavima (micidele na lancu polielektrolita, vezikule, tekući kristali) kao i naša istraživanja potencijalnih terapijskih sustava: nano- i mikrokompleksi koji nastaju u smjesi anionskoga biopolimera, karagena i modelne kationske PAT (9-12). Karageni su biopolimeri, odnosno anionski polielektroliti različite gustoće naboja: κ -karagen (jedna sulfatna skupina po monomeru), ι -karagen (dvije) i λ -karagen (tri), te su kao takvi dobar sustav za istraživanje utjecaja gustoće naboja lanaca polielektrolita na strukturu kompleksa s PAT. U zadnjih nekoliko desetljeća, kompleksi biopolimera i suprotno nabijene PAT istražuju se intenzivno kao modelni sustavi za oponašanje brojnih prirodnih i ljudskom aktivnošću stvorenih složenih sustava (npr. prehrambeni, farmaceutski i kozmetički pripravci).

Micidele u terapijskim sustavima

Međudjelovanja polielektrolita i PAT suprotnoga naboja jest proces, prvenstveno određen jakim elektrostatskim privlačenjima između suprotno nabijenih ionskih vrsta i hidrofobnim privlačenjima alkilnih lanaca PAT. Kooperativno vezanje PAT na polielektrolit znači da afinitet prema vezanju raste s koncentracijom dodane PAT. U vodenim otopinama će zbog jakih elektrostatskih međudjelovanja nastati kompleksi

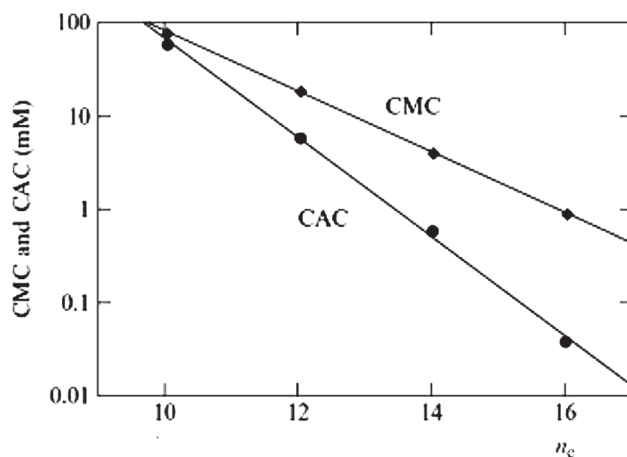
već kod vrlo niskih koncentracija (9, 10). Nakon neutralizacije naboja, a pri određenoj koncentraciji (kritična agregacijska koncentracija, cac) na polielektrolitnom lancu nastaju, hidrofobnim djelovanjem alkilnih lanaca, agregati monomera PAT nalik micelama, ali manjega agregacijskog broja od micela korištene PAT. Za smjese hidrofilnih polielektrolita i suprotno nabijene PAT općenito je prihvaćen model PAT agregata kao uniformne kugle definirane veličine bez obzira na stupanj vezanja (6, 7). Taj model uključuje stvaranje agregata PAT u obliku micela na polimernom lancu kao niz kuglica na vrpici - model biserne ogrlice. Elektrostatski vezane molekule PAT postaju centri agregata nalik micelama.

Nastale micidele koriste se u terapijskim sustavima, jer sadrže hidrofobne domene koje otapaju hidrofobnu aktivnu komponentu na isti način kao i slobodne micidele bez polimera. Otapanje aktivne komponente u polimerno vezanim micelama može se kontrolirati na sličan način kao i kod slobodnih micela npr. putem hidrofobnosti i naboja aktivne komponente, uz pomoć polarne skupine PAT itd. (13). Hidrofobna jezgra služi kao rezervoar iz kojeg se polako oslobađa aktivna komponenta u određenom vremenskom razdoblju. Jedan od najvažnijih razloga za korištenje micela u terapijskim sustavima jest hidrofobnost velikoga broja lijekova, tj. netopljivost u vodi. Otapanjem u miceli i porastom koncentracije micela raste i topljivost hidrofobne aktivne komponente. Opseg otapanja ovisi o (i) koncentraciji PAT i strukturi polielektrolita, (ii) veličini micidele i agregacijskom broju, te (iii) prirodi aktivne komponente.

U ovisnosti o terapijskom sustavu, može se odabrati veličina, naboj i površinska svojstva nosioca aktivnih komponenata kontrolom pripreme i/ili dodatkom novih komponenata u smjesu amfifilnih čestica prije pripreme micela. Jedno od najvažnijih svojstava micela je njihova mala veličina (10-30 nm). Micidele kao nosioci aktivne komponente imaju nekoliko važnih prednosti: (i) fizički hvataju u „klopku“ netopljive aktivne komponente te ih u potrebnoj koncentraciji dovode do željenoga mjesta djelovanja, (ii) stabilnost aktivne komponente se povećava uklapanjem u micelu, (iii) smanjuju se neželjene nuspojave jer se smanjuje međudjelovanje aktivne komponente s neaktivnim komponentama prisutnim u biološkim tekućinama (npr. enzimima) i (iv) mogu se reproducibilno pripremiti u velikim količinama (5).

Kritična micelizacijska koncentracija, cmc, koncentracija je iznad koje nastaju micidele pa je njena veličina vrlo bitna u farmakološkoj primjeni jer niže vrijednosti odgovaraju stabilnijim micelama. Prilikom visokih razrjeđenja, npr. kada se micidele nađu u krvotoku, one s visokom vrijednosti cmc-a disociraju na monomere, te gube svoj sadržaj, tj. aktivnu komponentu, dok one s nižom vrijednosti cmc-a ostaju nepromijenjene.

Na slici 1. prikazan je utjecaj broja C-atoma u alkilnom lancu PAT na dvije karakteristične koncentracije, cmc otopina PAT, i cac u smjesi polielektrolit/PAT. Porastom duljine lanca cmc se snižuje, te je izbor duljine alkilnoga lanca jedan od kriterija izbora PAT za terapijske sustave (13). Dodatak polielektro-



SLIKA 1.

Utjecaj broja ugljikovih atoma u alkilnom lancu, n_c , na kritičnu micelizacijsku, cmc , alkilamonijevih bromida i kritičnu agregacijsku koncentraciju, cac , alkiltrimetilamonijevoga bromida uz dodatak anionskoga polisaharida, natrijevoga hialuronata (konstruirano prema ref. 13)

FIGURE 1.

Effect of the number of carbon atoms in the alkyl chain, n_c , on the critical micelle concentration, cmc , of alkyltrimethylammonium bromides, and the critical aggregation concentration, cac , of alkyltrimethylammonium bromides in the presence of an anionic polysaccharide, sodium hyaluronate (from ref. 13).

lita potiče nastajanje micela pri nižim koncentracijama ($cac < cmc$). Utjecaj duljine alkilnoga lanca na cac je isti kao i na cmc , tj. porastom duljine alkilnoga lanca cac se snizuje. Povoljnim izborom vrste polielektrolita i PAT moguće je postići vrlo niske cac vrijednosti i visoku stabilnost micela nakon razrjeđenja pa se takvi sustavi koriste za kontrolu brzine otpuštanja aktivne komponente (u točno određenim vremenskim intervalima). Osim na stabilnost micela duljina alkilnoga lanca PAT utječe i na topljivost aktivne komponente u miceli. U svom radu Barry i suradnici su pokazali veću topljivost progesterona i hidrokortizona u micelama s većim brojem C-atoma u alkilnom lancu (14).

Kabanov i suradnici (15) predložili su komplekse poli(etilenoksid)–polietilenamin i bioloških površinski aktivnih tvari kao nove nosioce aktivne komponente u terapijskim sustavima. Takvi kompleksi stvaraju „micelarne mikrokontejnere“ s retionskom kiselinom koja je površinski aktivna tvar.

Nužno je svojstvo neaktivnih komponenata terapijskoga sustava neotrovnost, odnosno bioprihvatljivost te su novija istraživanja usmjerena na korištenje biopolimera. Primjer je terapijski sustav ciklosporina A s polisaharidima. Slična istraživanja provedena su na polikapraltonu, polietilen glikolu i derivatima kitozana (16). Pepić i suradnici (17-19) proveli su opsežna istraživanja sustava biopolimera, kitozana i neionske PAT kao mogućih nosilaca pilokarpina. Preliminarna *in vivo* testiranja pokazala su bolje rezultate u odnosu na tradicionalne terapijske sustave za oftalmološku primjenu.

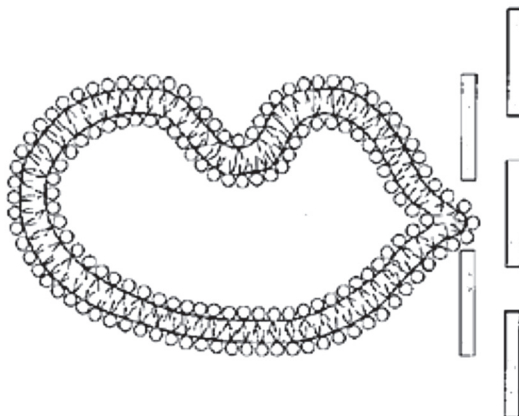
Vezikule u terapijskim sustavima

Vezikule su sferoidne dvoslojne strukture koje sadrže vodeni odjeljak zatvoren dvoslojem/višeslojem molekula PAT. U

strukturi vezikule hidrofilne skupine PAT su okrenute prema vodi, dok hidrofobni dijelovi stvaraju dvosloj. Fosfolipidi su dvolančane molekule PAT, a za vezikule koje grade koristi se termin liposomi. Uporaba liposoma vrlo je raširena u terapijskim sustavima za obje, u vodi topljive i netopljive aktivne komponente (20). Hidrofobna aktivna komponenta smješta se u hidrofoban dvosloj vezikule, dok će se hidrofilna smjestiti u vodeni odjeljak. Uklapanje aktivne komponente koja je topljiva u vodi i drugih čestica u unutarnji vodeni dio vezikule izuzetno je složen proces, te ovisi o načinu pripreme vezikula. Efikasnost ugradnje u vezikule ovisi o brojnim faktorima, npr. manje vezikule imaju manji unutarnji volumen pa će efikasnost ugradnje biti manja.

Bangham i suradnici (21) prvi su prepoznali nedostatak zbog razgradnje liposoma u krvotoku uslijed adsorpcije proteina plazme na fosfolipidne membrane. Liposomi nastaju u disperzijama lamelarnih tekućih kristala lipida (npr. fosfatidilkolin, fosfatidilglicerol, kolesterol itd.) djelovanjem različitih mehaničkih ili kemijskih metoda koje narušavaju smektičnu slagalinu dvosloja te uzrokuju nastajanje otvorenih dvosloja (22). Ti procesi ovisi o specifičnim postupcima koji stvaraju nestabilne mikrostrukture. Kao i mnogi koloidni sustavi, liposomi i drugi lipidni agregati vraćaju se u ravnotežu, što vodi do stvaranja lamelarnih disperzija tekućih kristala. Tijekom toga procesa dolazi do otpuštanja enkapsuliranoga sadržaja i narušavanja strukture vezikule.

Na stabilnost vezikula, a time i na mogućnost kontrole enkapsulirane aktivne tvari utječu i procesi njihove agregacije i fuzije. Dodatkom polielektrolita vezikule PAT se stabiliziraju, a kombiniranjem ukupne koncentracije i omjera komponenata kontrolira se agregacija i/ili fuzija. U sustavu polielektrolit/PAT na agregaciju vezikula utječe nekoliko faktora. Npr. do agregacije će doći smanjenjem hidratacijskoga odbijanja



SLIKA 2.
Shematski prikaz početne faze prolaska vezikule kroz sloj pora kože (konstruirano prema ref. 25)
FIGURE 2.

Schematic illustration of the early stage of liposome passage through a pore in the stratum corneum (redrawn from ref. 25).

između vezikula, a sterička i/ili elektrostatska odbijanja smanjuju mogućnost agregacije. Ti su faktori važni za stabilnost vezikula, ali i za njihovu primjenu u terapijskim sustavima kao nosiocima aktivne komponente (23). Međudjelovanja koja potiču ili smanjuju agregaciju mogu se relativno jednostavno kontrolirati u sustavu polielektrolit/PAT odabirom vrste i koncentracijskoga omjera komponenata. U novijim terapijskim sustavima koriste se vezikule stabilizirane polietilen-oksidnim derivatima (tzv. Stealth vezikule).

Općenito, vezikule su pogodne za direktnu intravenoznu primjenu do određenih tkiva i organa (jetra, slezena, moždina) kada se pacijent nalazi u nesvjesnom stanju. Koriste se i u mnogim terapijskim sustavima kod liječenja kancerogenih oboljenja (pluća, mekoga tkiva, očiju, kože) kao i u terapijskim sustavima s antibioticima, antifungicidima, steroidima, analgeticima itd. Na tržištu je danas prisutno nekoliko lijekova koji kao nosioci aktivne komponente koriste vezikule polielektrolit/PAT (lijek za tretiranje karcinoma jajnika, grudi, te gljivičnih infekcija i ne-Hodgkinovog limfoma) (24).

Vezikule se često primijenjuju u terapijskim sustavima koji se apliciraju kroz kožu. Brže prodiranje aktivne komponente kroz kožu postiže se korištenjem vezikula s elastičnim svojstvima dvosloja. To je slikovito prikazano na slici 2. Cevc i suradnici (25) pripravili su novu generaciju vezikula s elastičnim svojstvima dvosloja, nazvanih transferosomi. Na elastičnost dvosloja vezikule, kao i na ostala svojstva (npr. veličina, naboj, broj dvosloja) utječe njen sastav. Od prvih transferosoma, građenih od fosfolipida i jednolančanih PAT, pripravljane su različite elastične vezikule. Dodatkom polimera u lipidni dvosloj mogu se dizajnirati svojstva vezikula kao što su stabilnost, fluidnost i elastičnost dvosloja (26).

Tekući kristali u terapijskim sustavima

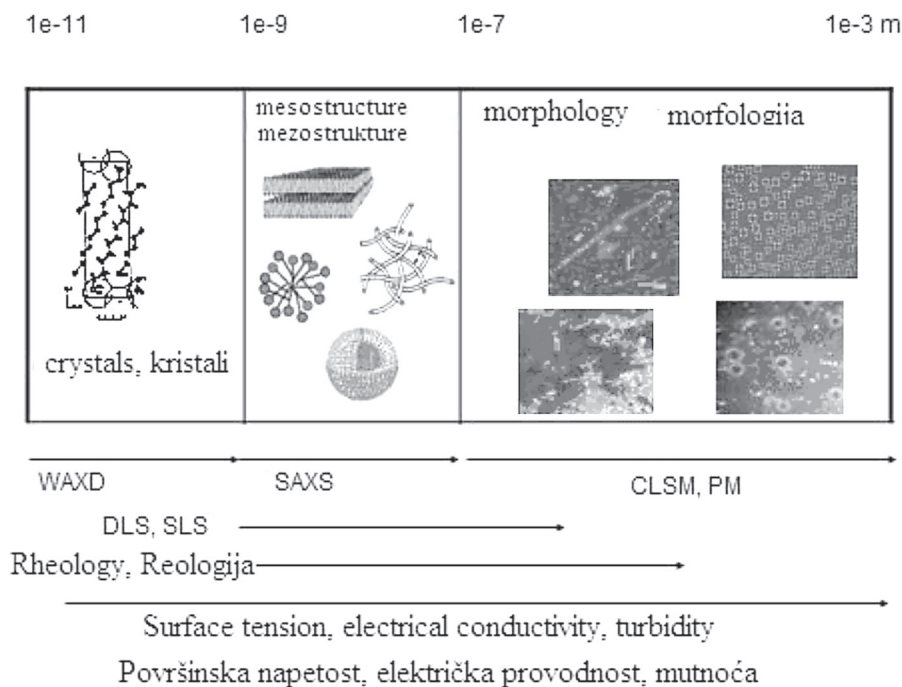
Tekući kristali mogu se smatrati kao četvrto stanje materije, koje kombinira stanje reda i pokretljivosti na molekularnoj i

supramolekularnoj razini. Faza tekućih kristala ima svojstva tekuće i krute faze, tj. svojstvo tekuće faze je povezano sa svojstvom tečenja, a svojstvo krutine je povezano s uređenom kristalnom strukturom (27). Uvjet za stvaranje faze tekućih kristala je određen oblik molekule koji je povezan s anizotropijom polarizabilnosti, te sadržaj otapala za liotropne tekuće kristale ili temperatura za termotropne tekuće kristale. U liotropnim mezofazama sadržaj otapala utječe na uređenje i pokretljivost, dok su u termotropnim mezofazama uređenje i pokretljivost određeni temperaturom. Amfotropne molekule su molekule koje se zahvaljujući svojoj strukturi mogu organizirati na oba principa; brojne PAT molekule imaju amfotropna svojstva.

Tekući kristali su termodinamički stabilne mezofaze koje imaju dobro svojstvo otapanja aktivnih komponenata i dugo vremensko razdoblje otpuštanja lijeka, bilo zbog slabije difuzije ili zbog povišenoga vremena otapanja (28). Otapanje aktivne komponente u tekućim kristalima ima prednosti koje su uočene i kod terapijskih sustava s micelama. Brzina oslobađanja aktivne komponente iz tekućih kristala ovisi o mjestu u kojem se nalazi aktivna komponenta unutar samoorganizirajuće strukture, tj. nalazi li se unutar hidrofobnoga ili hidrofilnoga dijela. Najvažnija prednost tih sustava je svojstvo uklapanja velikoga broja molekula (hidrofilnih i/ili hidrofobnih) koje štiti od mogućega raspada. Npr. to je prednost pri oralnom uvođenju aktivne komponente osjetljive na kiselo-kataliziranu hidrolizu.

Dobro svojstvo tekućih kristala je i mogućnost vezanja s aktivnom komponentom, tj. njezinim uklapanjem u strukturu tekućega kristala. Primjer je vezanje negativno nabijene i u vodi topljive aktivne komponente, ketoprofena (djelotvoran pri upali mišićnoga tkiva), ako se u strukturi polimernoga tekućeg kristala nalazi kationska PAT (28).

Kubično strukturirane mezofaze tekućih kristala koriste se često u terapijskim sustavima. Za polietilen/PAT sustav opisana



SLIKA 3.

Sistematizacija metoda: rentgenska difrakcija pri velikim (WAXD) i malim (SAXS) kutevima; raspršenje svjetlosti – dinamičko (DLS) i statičko (SLS); mikroskopija – polarizacijski mikroskop (PM) i konfokalni laserski pretražni mikroskop (CLSM); reološka mjerenja, mjerenja površinske napetosti, električne provodnosti i mutnoća.

FIGURE 3.

Systematization of methods: X-ray diffraction at wide (WAXD) and small (SAXS) angle; light scattering – dynamic (DLS) and static (SLS); microscopy – polarization microscope (PM) and confocal laser scanning microscope (CSLM); rheological, surface tension, conductivity and turbidity measurements.

su dva sustava tekućih kristala: a) kubična faza koja je stvorena s gusto pakiranim micelama PAT (sadrži malu količinu PAT), koja dodatkom vode vrlo brzo prelazi u micelarni sustav i b) kubične faza koja nastaje pri visokim koncentracijama PAT, a dodatkom vode prelazi u vrlo viskoznu heksagonsku fazu (29).

U zadnjih nekoliko godina istražuju se intenzivno bikontinuirane kubične faze tekućih kristala za primjenu u terapijskim sustavima (29). Bikontinuirane faze tekućih kristala grade prirodni lipidi, neke ionske PAT i polimerni sustavi. Prednost im je jedinstvena struktura interpenetriranih kanala vode i lipida koji omogućuju njihovu kompatibilnost s aktivnim komponentama topljivim u vodi i lipidima.

Polielektrolit/PAT kompleksi u fazi tekućih kristala koriste se za različite terapijske primjene npr. od liječenja zubnoga mesa (paradentoza) i usne šupljine, kože, nosne šupljine i parenteralne primjene. Dobar primjer su tekući kristali polietilena i masnih kiselina, koji imaju veliku moć enkapsulacije vitamina A i analoga, a koriste se u liječenju kožnih oboljenja (psorijaza itd.).

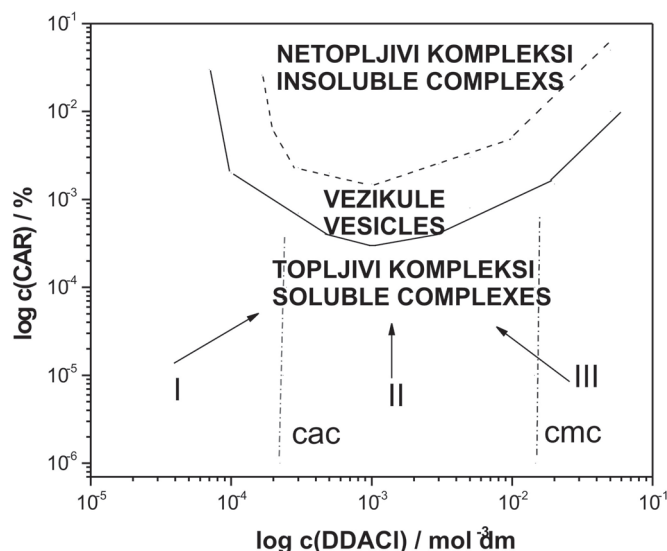
MATERIJALI I METODE

Materijali

U radu su korištena tri su osnovna tipa karagena κ -, ι - i λ -karagen koji se razlikuju po broju i lokaciji sulfatnih skupina po disaharidnoj jedinici (jedna, dvije i tri), odnosno gustoći naboja na lancu. Korišteni karageni (označeni kao CAR) jesu komercijalni spojevi (Fluka), a modelna kationska PAT, dodecilamonijev klorid (označeno kao DDACl) pripravljena je neutralizacijom dodecilamina (Merck) kloridnom kiselinom. Sustavi za mjerenje pripravljeni su uz konstantnu koncentraciju CAR i varirajuću koncentraciju DDACl i obrnuto. Prije mjerenja stareni su 24 h na 303 K da bi se postiglo ravnotežno stanje.

Metode identifikacije i strukturalna analiza nano- i mikrokompleksa

Složena međudjelovanja u smjesama karagena i dodecilamonijevoga klorida rezultiraju u nastajanju kompleksa promjenjivoga sastava i strukture, te asocijativnom odvajanju faza već pri vrlo niskim koncentracijama. Područje postojanja različitih faza (nano- i mikrokompleksa, taloga i gela) određeno je pripremom velikog broja uzoraka različitog sastava. Korištene su razne tehnike i metode za identifi-



SLIKA 4.

Djelomičan fazni dijagram za smjese CAR/DDACl pri 303 K (puna linija – granica bistro/mutno; crtkana linija – taloženje). I, II i III označuju područja nastajanja topljivih kompleksa. Crvena crtkana linija - kritična agregacijska koncentracija, cac, i plava crtkana linija - kritična micelizacijska koncentracija, cmc.

FIGURE 4.

Schematic presentation of partial phase diagram of the DDACl/CAR mixtures at 303 K. The heavy full line corresponds to the clear/turbid boundary; the dashed line corresponds to the coexistence regions of precipitated insoluble PSC and vesicles. I, II and III denote region of soluble PSC formation. Red line denotes the critical aggregation concentration, cac, and blue line denotes the critical micelle concentration, cmc.

kaciju i strukturnu karakterizaciju faza vrlo različitih fizikalno-kemijskih svojstva. Korištene metode sistematizirane su na slici 3.

REZULTATI I DISKUSIJA

Na slici 4. shematski je prikaz djelomičnoga faznog dijagrama smjese CAR/DDACl. Ovisno o koncentraciji i množinskom omjeru komponenata smjese su bile bistre, mutne ili slabo mutne s istaloženim flokulama. U bistrom području su mjerenjem električne provodnosti određene kritične koncentracije, cac i cmc (10). Porast gustoće naboja na lancima karagena pomiče cac prema višim koncentracijama DDACl, ali ne utječe znatno na vrijednost cmc-a.

Pri niskoj koncentraciji karagena razlikujemo tri glavna koncentracijska područja: I – nastajanje negativnih kompleksa uslijed elektrostatskoga vezanja amonijevih skupina PAT i sulfatnih skupina karagena do cac; II – nastajanje pozitivnih kompleksa, odnosno micela na lancu polielektrolita adsorpcijom monomera iz otopine na monomere PAT elektrostatski vezane na lancu polimera do cmc; III - iznad cmc pojedinačni lanci karagena djeluju na micelle DDACl kao protuion.

Usporedba dijagrama za tri karagena pokazuje da s porastom gustoće naboja na karagenima dolazi do pomicanja granica bistro-mutno prema višim koncentracijama karagena. Razlike između ponašanja κ - i ι -karagena su male, dok je za λ -karagen taj pomak veći.

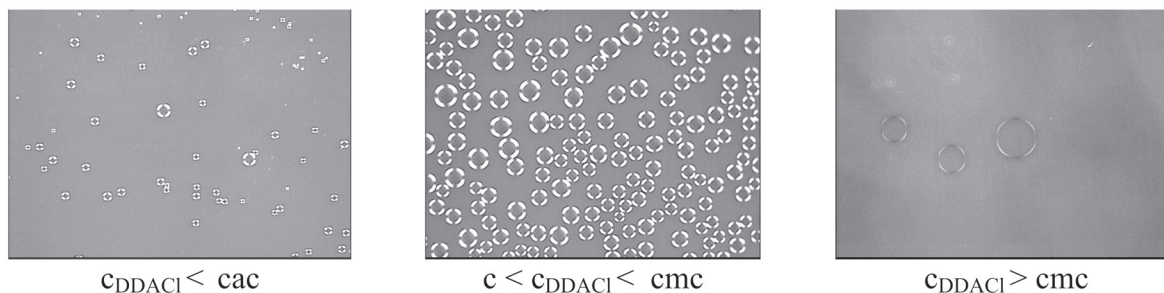
Pregledom mutnih i područja taloženja pomoću svjetlosnoga mikroskopa ustanovljeno je da u mutnom području nastaju di-

vovske vezikule, dok u području taloženja uz flokule u slabo mutnoj otopini koegzistira manji broj divovskih i oligovezikularnih vezikula.

Polarizacijske mikrofotografije uzoraka iz mutnoga područja pokazane su na slici 5. U svim sustavima u polariziranom svjetlu pojavila se tekstura „malteških križeva“ karakteristična za višeslojnu lamelarnu koncentričnu strukturu, tj. strukturu višeslojne vezikule. U micelarnom području nastaju mikrometerske prstenaste stukture, nalik zatvorenim tubicama.

Pri niskim koncentracijama karagena nastaju kompleksi na jednom lancu, a pri koncentraciji karagena višoj od prijelazne, c^* , nastaju kompleksi između više lanaca karagena, tj. porastom koncentracije unutar-makromolekulski kompleksi prelaze u među-makromolekulske komplekse koji agregiranjem talože. Pojava vezikula u otopini, tj. organiziranih struktura od kompleksa i agregata vezikula u talogu, te promjenjivost sastava kompleksa ukazuje da su promjene kontinuirane i da teku prema uređenijim strukturama, odnosno odvajanju faza na makrorazini prethodi restrukturiranje faza na mikrorazini (9).

Na slici 6. shematski je prikazano nastajanje kompleksa pri koncentracijama karagena nižim ($c(\text{CAR}) < c^*$) i višim ($c(\text{CAR}) > c^*$) od prijelazne koncentracije u ovisnosti o koncentraciji DDACl do cmc. Pri $c(\text{CAR}) < c^*$ nema međudjelovanja lanaca karagena pa monomeri reagiraju s neovisnim lancima i nastaju agregati koji se poput perli raspodjeljuju na lancu (slika 6. b). Pri $c(\text{CAR}) > c^*$ dolaze do izražaja međudjelovanja lanaca karagena i reorganizacije agregata u vezikule (slika 6. d).



SLIKA 5.

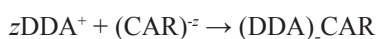
Mikrofotografije (polarizirano svjetlo) vezikula u smjesama CAR/DDACL s promjenjivom koncentracijom DDACL i konstantnom koncentracijom CAR pri temperaturi 303 K. Povećanje je 500x.

FIGURE 5.

Microphotographs (crossed polarizers) of vesicles in CAR/DDACL mixtures with variable concentration of DDACL and constant CAR concentration. Temperature is 303 K. Magnification 500x.

Ovisno o koncentraciji monomera PAT topljivi kompleksi se mogu općenito svrstati u dvije skupine - kompleksi koji nastaju međudjelovanjem monomera DDACL i karagena: (i) elektrostatskim ($c(\text{DDACL}) < c_{ac}$) i (ii) hidrofobnim ($c_{ac} < c(\text{DDACL}) < c_{mc}$) međudjelovanjima, te kompleksi s micelama. U micelarnom području prevladavaju elektrostatska međudjelovanja, tj. karageni djeluju na micelle kao protuioni. Pri nižoj koncentraciji karagena uz komplekse koegzistiraju i slobodne micelle, dok se pri višim koncentracijama karagena koncentracija slobodnih micela smanjuje, a koncentracija kompleksa raste.

Elementna analiza istaloženih kompleksa u sustavima karagena i dodecilamonijevoga klorida pokazala je da su nastali novi spojevi, dodecilamonijevi karagenati, $(\text{DDA})_z\text{CAR}$, tj. stehiometrijski spojevi s obzirom na naboj po disaharidnoj jedinici prema općenitoj jednadžbi



gdje z iznosi 1, 2 i 3 za κCAR , ιCAR i λCAR .

Difraktogrami $(\text{DDA})_z\text{CAR}$ na slici 7. (krivulje A, B i C) s dva oštra difrakcijska maksimuma pri malim kutevima i sa širokim difrakcijskim maksimumom (tipičan za amorfnu fazu) pri većim kutevima upućuju na mezostrukturu. Izračunati odnos njihovih recipročnih d vrijednosti refleksa pri malom kutu karakteristični su za lamelarnu ili smektičku mezofazu. Intenzivan amorfni maksimum pri $2\theta \sim 20^\circ$ ($d \sim 4,5 \text{ \AA}$), karakterističan za neuređenu konformaciju tekućih parafina (32), upućuje na neuređenost alkilnih lanaca unutar lamela.

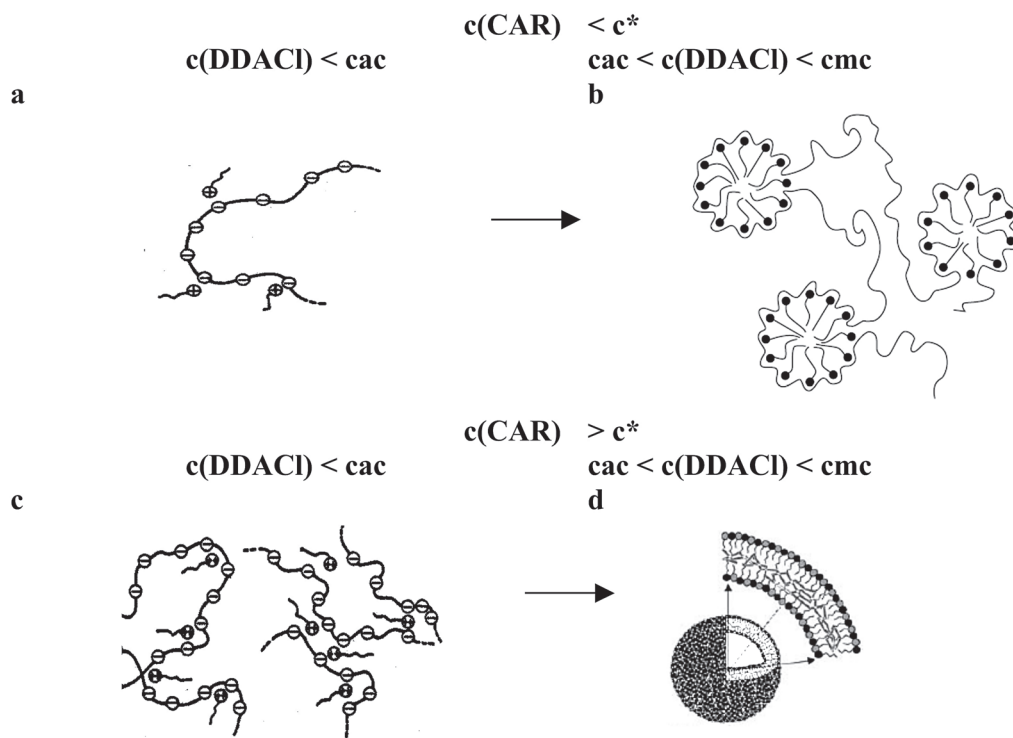
Alkilni su lanci elektrostatski vezani amonijevim skupinama PAT lateralno na sulfatne skupine karagenskih makromolekula. Relativno slaba i široka druga difrakcijska linija ($I_2/I_1 \sim 5$) upućuje na neizraženu granicu među slojevima dodecilnih lanaca i nejasnih obrisa kostura asociiranih makromolekula karagena. DDACL difraktogram (slika 7., krivulja D) sa serijom intenzivnih difrakcijskih pikova bez difuznih difrakcijskih maksimuma amorfne faze upućuju na potpuno kristaliziran DDACL.

Struktura dodecilamonijevih karagenata je lamelarna, sastoji se od nepolarne i polarne subdomene (slika 8.). U nepolarnoj subdomeni smješteni su dodecilni lanci, a u polarnoj se nalaze asociirane molekule karagena sa sulfatnim skupinama na koje su elektrostatski vezane amonijeve skupine. Na sobnoj temperaturi uređenost lamelarne strukture je mala, a ovisi o broju i položaju sulfatnih skupina. Uređenost raste s porastom gustoće naboja na lancu karagena. Na strukturu novih spojeva utječe struktura DDACL, dok su termička svojstva određena svojstvima karagena (12).

Pri koncentracijama višim od 0,5 % κ - i ι -karagen geliraju, dok λ -karagen stvara vrlo viskozne otopine. Dodatak DDACL na gelirajuće karagene mijenja strukturu gela od nano- do makrorazine. Na makroskopskoj razini, razlikuju se dva područja koncentracija DDACL, jedno ispod c_{mc} u kojem nastaju mutni gelovi i drugo iznad c_{mc} u kojem gel nestaje i odvaja se talog. Pri $c(\text{DDACL}) < c_{mc}$ zadržale su se osnovne značajke geliranja karagena, tako da mreža gela nastaje prijelazom statističko klupko \rightarrow dvostruka zavojnica \rightarrow gel (33). Gelovi s DDACL pokazuju pseudoplastična svojstva kao i gelovi bez DDACL, ali se konzistencija gela mijenja i raste otpor prema tečenju. Reološka svojstva mogu se dobro objasniti potencijalnim modelom (11).

Mehanizmi međudjelovanja DDACL i gela karagena slični su onima kao i u razrijeđenim otopinama. Pri $c(\text{DDACL}) < c_{ac}$, DDA^+ ioni se s NH_3^+ -skupinom elektrostatski vežu na sulfatne skupine karagena i zamjenjuju protuione karagena, koji odlaze u otopinu. Pretraživanje unutar uzoraka gela označenih bojom Rhodamine B i pripremljenih s $c(\text{DDACL}) < c_{ac}$ pokazalo je jednoličnu fluorescenciju na svim dubinama. Raspodjela amfifilne boje je homogena, tj. struktura gela se ne mijenja na makrorazini (slika 9a).

Hidrofobnim međudjelovanjima alkilnih lanaca iznad c_{ac} nastaju agregati DDACL na lancima karagena, struktura gela postaje nehomogena (slika 9. b) i smanjuje se povezanost lanaca karagena. Porastom koncentracije DDACL postupno rastu agregati PAT i uređenost alkilnih lanaca u slagaline lamela (slika 9. c). Promjene u strukturi gela događaju se od

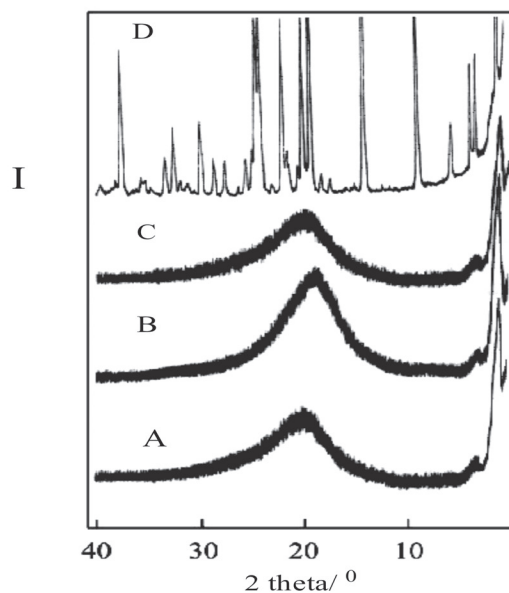


SLIKA 6.

Shematski prikaz međudjelovanja monomera DDACL pri $c(\text{CAR}) < c^*$ i $c(\text{CAR}) > c^*$ do kritične micelarne koncentracije DDACL, c_{mc} .

FIGURE 6.

Schematic presentation of interactions between DDACL monomers at $(c(\text{CAR}) < c^*)$ up to the critical micelle concentration of DDACL, c_{mc} .

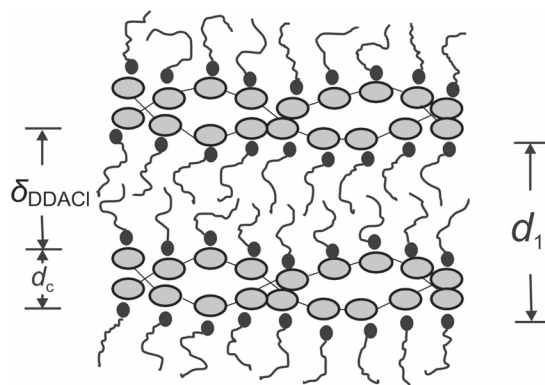


SLIKA 7.

Difraktogrami dodecylamonijevih karagenata $((\text{DDA})_2 \text{CAR})$; (A) $\text{DDA}\kappa\text{CAR}$, (B) $(\text{DDA})_2\text{I}\text{CAR}$, (C) $(\text{DDA})_3\lambda\text{CAR}$ i (D) DDACL.

FIGURE 7.

Diffractograms of dodecylammonium carrageenates $((\text{DDA})_2 \text{CAR})$; (A) $\text{DDA}\kappa\text{CAR}$, (B) $(\text{DDA})_2\text{I}\text{CAR}$, (C) $(\text{DDA})_3\lambda\text{CAR}$ i (D) DDACL.

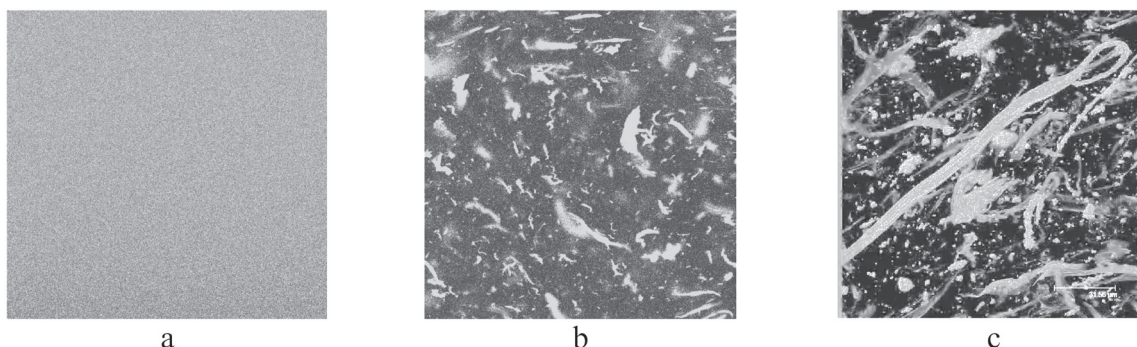


SLIKA 8.

Shematski prikaz mezomorfne faze dodecilamonijevih karagenata, d_1 je debljina lamele, δ_{DDACL} je debljina dvosloja alkilnih lanaca, a d_c je debljina okosnice lanaca karagena.

FIGURE 8.

Schematic presentation of dodecylammonium carrageenates mesomorphic phase, d_1 - lamellar thickness, δ_{DDACL} - thickness of alkyl chains, d_c - thickness of carrageenan backbones.



SLIKA 9.

Mikrofotografije gelova karagena obilježenih s Rhodamine B uz rastuću koncentraciju DDACL i konstantnu koncentraciju karagena ($c(\text{CAR}) = 15 \text{ g dm}^{-3}$); (a) gel pri $c(\text{DDACL}) < c_{ac}$; (b) i (c) gelovi pri $c_{ac} < c(\text{DDACL}) < c_{mc}$. Mjerilo povećanja označeno je na slici c ($3,3 \mu\text{m}$).

FIGURE 9.

Microphotographs of carrageenan gels with Rhodamine B with increasing DDACL concentration and constant concentration of carrageenans ($c(\text{CAR}) = 15 \text{ g dm}^{-3}$); (a) gel at $c(\text{DDACL}) < c_{ac}$; (b) and (c) gels at $c_{ac} < c(\text{DDACL}) < c_{mc}$. Bar is denoted on figure c ($3.3 \mu\text{m}$).

nano- do mikrorazine uz vidljivi porast mutnoće gela, a iznad c_{mc} dolazi do makroskopskih promjena, tj. odvajanja faza. Rentgenska analiza taloga potvrdila je nastajanje lamelarnih struktura, koje su uređenije kod viših koncentracija DDACL. Zbog jačih elektrostatskih međudjelovanja, ι -karagen s većim brojem sulfatnih skupina izgrađuje uređeniju strukturu lamele i slagaline lamela od κ -karagena.

ZAKLJUČCI

U uvodnom dijelu rada dan je pregled kompleksa koji nastaju u smjesi polimera i PAT, njihovo korištenje u terapijskim sustavima i prednosti u odnosu na tradicionalne terapijske sustave. Međudjelovanja su polimera i površinski aktivne tvari složena te ovisno o vrsti polimera i PAT, koncentracijskom omjeru i ukupnoj koncentraciji nastaju različiti nano- i mikrokompleksi. Micele na lancima polielektrolita, vezikule i

mezomorfne strukture su kompleksi polimera i PAT koji se najčešće primjenjuju u terapijskim sustavima.

Micele na lancu polimera nastaju pri nižim koncentracijama od micela PAT te su zato stabilnije u krvotoku. One dobro otapaju u vodi slabo topljive aktivne komponente te povećavaju njihovu biodostupnost. Ta svojstva su dokazana za veliki broj različitih aktivnih komponenta npr. najčešće kod slabo topljivih lijekova koji se koriste u liječenju malignih oboljenja. Zbog male veličine micela dolazi do spontane akumulacije aktivne komponente. Variranjem sastava micela, te veličine hidrofobnoga i hidrofilnoga dijela, može se vrlo lako kontrolirati svojstva micela kao što je npr. veličina, kapacitet uklapanja aktivne komponente itd. Micele se mogu jednostavno pripremiti i ispuniti aktivnom komponentom, što omogućuje vrlo uspješnu primjenu micela kao nosioca aktivne komponente u terapijskim sustavima.

Vezikule kao nosioci aktivne komponente imaju važnu ulogu u terapijskim sustavima. Višegodišnja istraživanja rezultirala su primjenom terapijskih sustava koji kao nosilac aktivne komponente koriste vezikule s polimerima čime se povećava stabilnost vezikule i kapacitet enkapsulacije, kontrolira se brzina otpuštanja aktivne komponente iz vezikule itd. Dodatak polimera mijenja se sastav i svojstva vezikula te je moguće dizajnirati vezikule ciljanih svojstava.

Tekući kristali se sve češće primjenjuju kao nosioci aktivnih komponenata u terapijskim sustavima jer se aktivna komponenta oslobađa kontrolom difuzije. Promjenom sastava tekućih kristala, odnosno povoljnim odabirom koncentracijskoga omjera polimera i PAT moguće je kontrolirati brzinu otpuštanja aktivne komponente.

Budućnost terapijskih sustava ne ovisi toliko o pronalasku novih materijala koji će se koristiti kao nosioci aktivne komponente, već u modifikaciji postojećih sustava. Novija istraživanja su usmjerena na korištenje biopolimera, koji zbog svoje neotrovnosti i specifičnih svojstava predstavljaju skoro idealne komponente za različite terapijske sustave. Priprema i ispitivanje novih nosilaca aktivnih komponenata je izuzetno dug i skup, ali dugoročno gledano isplativ proces.

Karageni su biopolimeri koji se već dugi niz godina koriste, prvenstveno u proizvodnji hrane. Istraživanje međudjelovanja karagena i kationske modelne PAT pokazala su da opseg i jačina molekularnih međudjelovanja koja uzrokuju nastajanje kompleksa od nano- do mikrodimenzija, taloga ili gela, ovisi o koncentraciji i omjeru koncentracija pojedinih komponenata, te linearnoj gustoći naboja na lancu karagena. Ovisno o ukupnoj koncentraciji i omjeru koncentracija u sustavu CAR/DDACl nastaju kompleksi različitih struktura i uređenosti. Od interesa za terapijske sustave jesu kompleksi koji nastaju u koncentracijskom području DDACl iznad c^* , tj. micela na lancu karagena kao i micela s polielektrolitom kao protuionom. Uređenje lamelarne strukture nastaju pri višim koncentracijama karagena, tj. iznad c^* . Lamelarne strukture, a naročito divovske vezikule koje su stabilne u matičnoj otopini dulje vremenski razdoblje predstavljaju dobru osnovu za daljnja istraživanja i moguću primjenu u terapijskim sustavima.

LITERATURA

1. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res.* 2006;23(7):1417-50.
2. Sahho SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today.* 2003;8:1112-20.
3. LaVan DA, Lynn DM, Langer R. Moving smaller in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:77-84.
4. West JL, Halas NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology commentary. *Curr Opin Biotechnol.* 2000;11:215-7.
5. Malmsten M. Surfactants and polymers in drug delivery. New York: Marcel Dekker; 2002.
6. Holmberg K, Shah DO, Schwuger MJ. Handbook of applied surface and colloid chemistry. Chichester: John & Wiley Sons; 2002.
7. Holmberg K, Jönsson B, Kronberg B, Lindman B. Surfactants and polymers in aqueous solution, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2002.
8. Thünemann AF. Polyelectrolyte-surfactant complexes (synthesis, structure and material aspects). *Progr Polym Sci.* 2002;27:1473-85.
9. Vinceković M. Nano- i mikrokompleksi biopolimera karagena i površinski aktivne tvari (doktorska disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagebu; 2009.
10. Vinceković M, Bujan M, Šmit I, Filipović-Vinceković N. Phase behavior in mixtures of cationic surfactant and anionic polyelectrolytes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2005;255:181-91.
11. Vinceković M, Bujan M, Šmit I, Tušek-Božić Lj, Tsiourvas D, Dutour Sikirić M. Influence of dodecylammonium chloride on the properties of carrageenan gels. *J Dispers Sci Technol.* 2008;29:966-74.
12. Vinceković M, Pustak A, Tušek-Božić Lj, Liu F, Ungar G, Bujan M, Šmit I, Filipović-Vinceković N. Structural and thermal study of mesomorphic dodecylammonium carragenates. *J Colloid Interface Sci.* 2010;341:117-23.
13. Torchilin, VP. Structure and design of polymeric-surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release.* 2001;73:137-72.
14. Barry BW, El Eini DI. Solubilization of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone by long chain polyoxyethylene surfactants. *J Pharm Pharmacol.* 1976;28(3):210-8.
15. Bronich TK, Nehls A, Eisenberg A, Kabanov VA. Novel drug delivery systems based on the complexes of block ionomers and surfactant of opposite charge. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1999;16:243-51.
16. Deepak T, Michel D, Yashwant P. Nanoparticulate drug delivery systems. New York: Informa Health Care; 2007.
17. Pečić I, Filipović-Grčić J, Jalšenjak I. Interactions in nonionic surfactants and chitosan mixtures. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2008;327:95-102.
18. Pečić I, Filipović-Grčić J, Jalšenjak I. Bulk properties of nonionic surfactants and chitosan mixtures. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2009;336:135-41.
19. Pečić I. Nanosustavi poloksamera 407 i kitozana za otalmičku primjenu (doktorska disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2009.
20. Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York: Marcel Dekker; 2001.
21. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13:238-52.
22. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles liposomes. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1980;9:467-508.
23. Yao Y, Fenga Y, Zhao, Y, Li Z, Huang J, Fu H. Vesicle aggregation in aqueous mixtures of negatively charged polyelectrolyte and conventional cationic surfactant. *J Colloid Interface Sci.* 2007;314:523-8.
24. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* 2004; 303:1818-22.
25. Cevc G. Transfersomes, liposomes and other lipid suspension on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996;13:257-388.
26. Discher DE, Eisenberg A. Polymer vesicles. *Science.* 2002;297:562-6.
27. Keller H, Hatz R. Handbook of liquid crystals. Weinheim: Verlag Chemie; 1980.
28. Swarbrick J, Boylan, JC. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York: Marcel Dekker; 2001. str. 20.
29. Lynch ML, Ofori-Boateng A, Hippe A, Kochvar K, Spicer PT. Enhanced loading of water-soluble actives into bicontinuous cubic phase liquid crystals using cationic surfactants. *J Colloid Interface Sci.* 2003;260:404-13.
30. Osborne DW, Amann AH. Topical drug delivery formulations. New York: Marcel Dekker; 1990.
31. Schmidt M. Polyelectrolytes with defined molecular architecture II. Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag; 2004.

32. Luzzati V. X-ray diffraction studies of lipid-water systems. U: Biological membranes; physical fact and function. Chapman D, urednik. London, New York: Academic Press; 1986. str. 71-123.
33. Rees DA. Polysaccharide shapes and their interaction – some recent advances, Pure Appl Chem. 1981;53:1-14.
34. Chronakis IS, Doublier J-L, Piculell L. Viscoelastic properties for kappa- and jota-carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behaviour. Int J Biol Macromol. 2000;28:1-14.

NANOCOMPLEXES OF POLYMERS AND SURFACTANT IN DRUG DELIVERY

Marko Vinceković, Marija Bujan

Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Croatia

*Corresponding author

Marko Vinceković, Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Svetošimunska 25, Zagreb, Croatia

Tel: + 385 (1) 23 93 952 / Email: mvincekovic@agr.hr

Original scientific paper

ABSTRACT

Nanocomplexes formed from anionic biopolymers, carrageenans, and cationic surfactant have been investigated for their applicability in drug delivery. Structure and complex size from nano- to microdimension strongly depends on concentration and concentration ratio of both components and linear charge density on carrageenan chains. Factors governing the complex formation are electrostatic and hydrophobic interactions as well as conformation of the carrageenan chains. With increasing carrageenan concentration, the intra-macromolecular complexes change to inter-macromolecular, which subsequently reorganize into better ordered structures, giant vesicles, precipitate - dodecylammonium carrageenate and gels. Formation of giant vesicles and structural properties of insoluble complexes and collapsed gels revealed lamellar ordering as an important feature of the carrageenan and an oppositely charged surfactant complexes.

Key words: Polymers; Surface-active agents; Complexes; Drug delivery systems; Vesicles