

In vitro ispitivanje 3D-tiskanih kapsula

Geršak, Inga

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:131455>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Inga Geršak

***IN VITRO* ISPITIVANJE 3D-TISKANIH KAPSULA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Gordana Matijašić
prof. dr. sc. Irena Škorić
izv. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

Zagreb, rujan 2020.

*Završni rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta
kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

Hvala mojim roditeljima i dečku na neizmjernoj potpori.

Hvala Mikićima i Tigricama, a posebno hvala mentorici i asistentu bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć. #samoopušteno

SAŽETAK

3D-tiskani oralni dozirni oblici nalaze sve veću primjenu u farmaceutskoj industriji zbog male cijene i mogućnosti personaliziranja lijekova. Da bi se kruti dozirni oblici mogli staviti u upotrebu potrebno je provesti *in vitro* ispitivanje oslobađanja kako bi se osigurala kvaliteta konačnog proizvoda.

U radu je ispitano *in vitro* ponašanje 3D-tiskanih kapsula. Mijenjana je debljina stijenke čepa kapsule te je ispitano kako ona utječe na vrijeme oslobađanja sadržaja. Test je proveden s bojilima u uvjetima koji simuliraju *in vitro* uvjete. Odabrana je kapsula debljine stijenke 1 mm te su provedena *in vitro* ispitivanja oslobađanja biljnih ekstrakata origana, kadulje, timijana i ružmarina. Profili oslobađanja izraženi su promjenom antioksidacijskog kapaciteta, antioksidacijske aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola. Korištene su metode FRAP, DPPH i UF te su dobiveni profili oslobađanja za svaki ekstrakt.

Prema rezultatima dobivenima FRAP metodom oslobađanje ekstrakata iz 3D-tiskanih kapsula može se opisati kao odgođeno oslobađanje. Profili oslobađanja ekstrakata, odnosno antioksidacijskog kapaciteta, opisani su novim modelom izvedenim modificiranjem Higuchijevog kinetičkog modela

Ključne riječi: 3D-tisak, biljni ekstrakti, Higuchijev model, odgođeno oslobađanje

ABSTRACT

***In vitro* study of 3D-printed capsules**

3D-printed oral dosage forms are increasingly used in the pharmaceutical industry due to their low cost and suitability for drug personalization. *In vitro* release test must be performed to ensure the quality of the final product before commercialization.

The *in vitro* behavior of 3D-printed capsules was investigated. The influence of wall thickness of the capsule cap on the lag time was examined. The test was performed by using dyes under simulation of *in vitro* conditions. A 1 mm thick wall capsule cap was selected and *in vitro* release studies of herbal extracts of oregano, sage, thyme and rosemary were performed. Release profiles are expressed by changes in antioxidant capacity, antioxidant activity and total phenolic content. FRAP, DPPH and UF methods were used and release profiles were obtained for each extract.

According to the results obtained by the FRAP method, the release of extracts from 3D-printed capsules can be described as delayed release. A new model derived from the Higuchi kinetic model was used to describe extract release profiles, i.e. antioxidant capacity.

Key words: 3D print, herbal extracts, Higuchi model, delayed release

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Aditivna proizvodnja.....	2
2.1.1. Podjela aditivnih tehnologija	2
2.1.2. 3D-tisak doziranih oblika.....	6
2.2. Oslobođanje djelatne tvari	7
2.2.1. Vrste oslobođanja djelatne tvari.....	7
2.2.2. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobođanja prema Europskoj farmakopeji.....	8
2.2.3. Kinetika oslobođanja.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Polivinilni alkohol.....	13
3.1.2. Biljni ekstrakti	13
3.2. 3D-tiskane kapsule	14
3.2.1. Dizajn kapsula	14
3.2.2. 3D-tisak kapsula	16
3.3. Ispitivanje oslobođanja <i>in vitro</i>	17
3.4. Test s bojilima.....	18
3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta, aktivnosti i ukupnih fenola.....	18
3.5.1. FRAP metoda	19
3.5.2. DPPH metoda	21
3.5.3. Metoda UF.....	23
4. REZULTATI.....	26
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČAK	37
7. LITERATURA.....	38

1. UVOD

Aditivna proizvodnja relativno je nova tehnologija izrade predmeta nanošenjem čestica u tankim slojevima jedan na drugi i ima široku primjenu u industriji zbog mogućnosti izrade predmeta koji variraju u veličini i obliku. Ova tehnologija sve više nalazi svoje mjesto u farmaceutskoj industriji jer omogućuje proizvodnju dozirnih oblika načinjenih prema potrebama pacijenta. *In vitro* testiranje oslobađanja prepoznato je kao bitan dio razvoja lijeka i potrebno ga je provesti u fiziološkim uvjetima pomoću testa oslobađanja kako bi se moglo omogućiti uspostavljanje *in vitro*–*in vivo* korelacije. Vrste oslobađanja lijeka iz dozirnog oblika su trenutno, modificirano, odgođeno, produljeno, kontrolirano i impulsno oslobađanje. Profili oslobađanja mogu se opisati kinetičkim modelima nultog reda, prvog reda ili nekim drugim matematičkim modelom.

Cilj ovog rada je ispitivanje oslobađanja biljnih ekstrakata iz 3D-tiskanih kapsula te opis oslobađanja kinetičkim modelom.

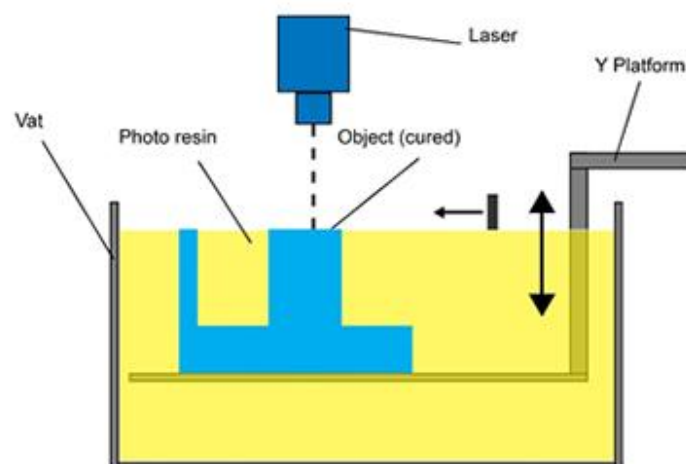
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Aditivna proizvodnja

2.1.1. Podjela aditivnih tehnologija

Aditivna proizvodnja je dio proizvodnog strojarstva koja se bavi izradom predmeta nanošenjem čestica u tankim slojevima jedan na drugi. Započinje konstruiranjem 3D-modela u CAD programu koji se potom šalje na 3D-printer. Prema načinu dobivanja slojeva aditivne tehnologije mogu se podijeliti na laserski bazirane procese, procese ekstrudiranja, izbijanja materijala, prianjanja materijala i procesi u kojima se koristi zraka elektrona. Prema tipu tehnologije postupci aditivne proizvodnje dijele se na fotopolimerizaciju, raspršivanje veziva, raspršivanje materijala, ekstrudiranje, laminiranje, stapanje praha i izravno taloženje metala. [1, 2]

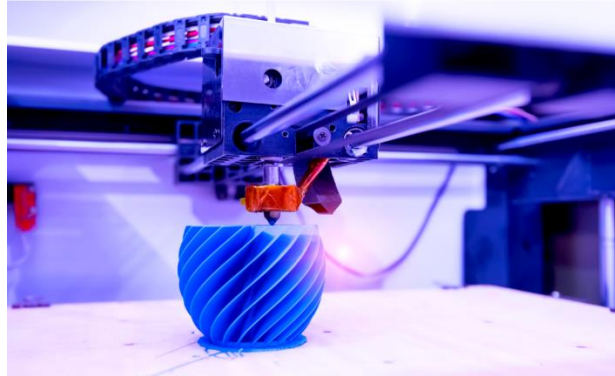
Kod fotopolimerizacije (stereolitografije) ultraljubičasta svjetlost osvjetljava sloj tekućeg polimera koji se skrućuje iznad podloge u zadanom obliku presjeka (Slika 1). Podloga se spušta za debljinu sloja, laser prati presjek 3D-objekta, a novi sloj polimera se skrućuje i povezuje s dijelom ispod njega. Predmet se vadi iz tekućeg polimera, a višak polimera se ispiru u otapalu.



Slika 1. Mehanizam fotopolimerizacije

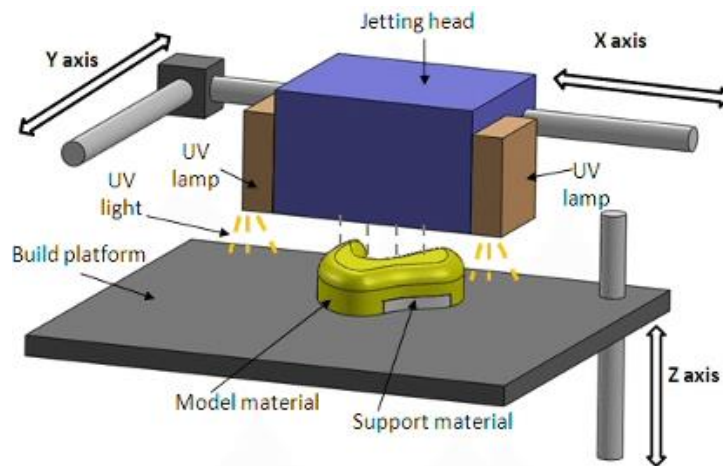
Raspršivanje veziva (engl. *3D-printing*) temelji se na tehnologiji tintnih pisaača, ali se umjesto tinte ispušta vezivo u zadanom presjeku po sloju praha koji formira zadani oblik (Slika 2).

Podloga se spušta za debljinu sloja kako bi se novi sloj praha mogao nataložiti. Nakon završetka izrade predmeta on se ostavlja u komori s prahom da se postigne potrebna čvrstoća.



Slika 2. Raspršivanje veziva

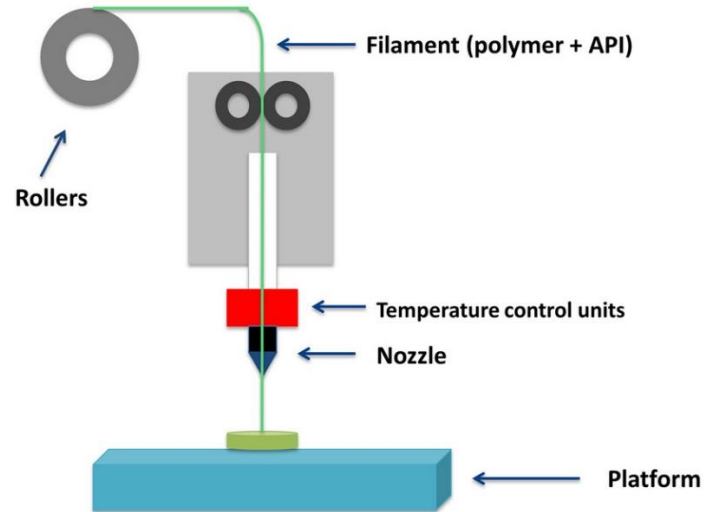
Raspršivanje materijala (*PolyJet* potupak) hibridni je postupak fotopolimerizacije i 3D-tiskanja gdje sapnica raspršuje sloj polimernog materijala na podlogu, a on se skrućuje pod djelovanjem ultraljubičastog zračenja i veže za prethodni sloj (Slika 3).



Slika 3. Raspršivanje materijala

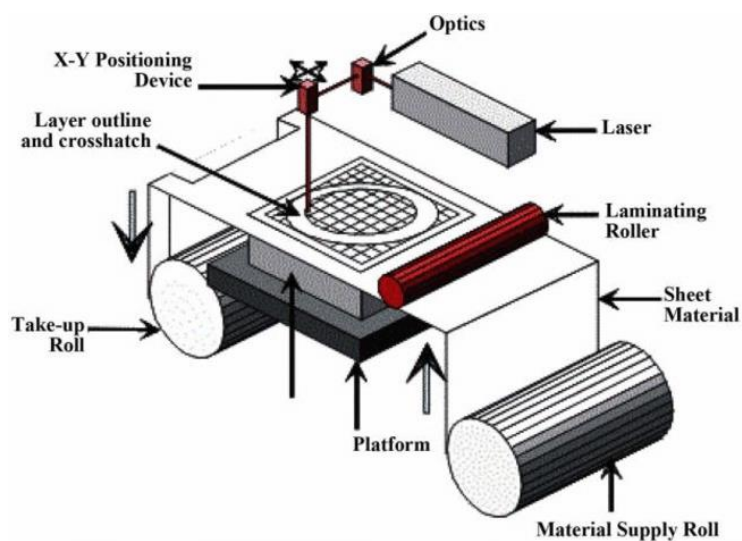
Ekstrudiranje (taložno srašćivanje, engl. *Fused Deposition Modeling, FDM*) se zasniva na omekšavanju korištenog polimera koji u obliku niti (filamenta) prolazi kroz mlaznicu smještenu na glavi ekstrudera (Slika 4). Izrađeni slojevi hlade se i skrućuju te tako vežu na prethodni sloj.

Radi stabilnosti strukture ponekad se izrađuje potporna struktura. Ovaj način aditivne proizvodnje danas je najzastupljeniji zbog svoje jednostavnosti.



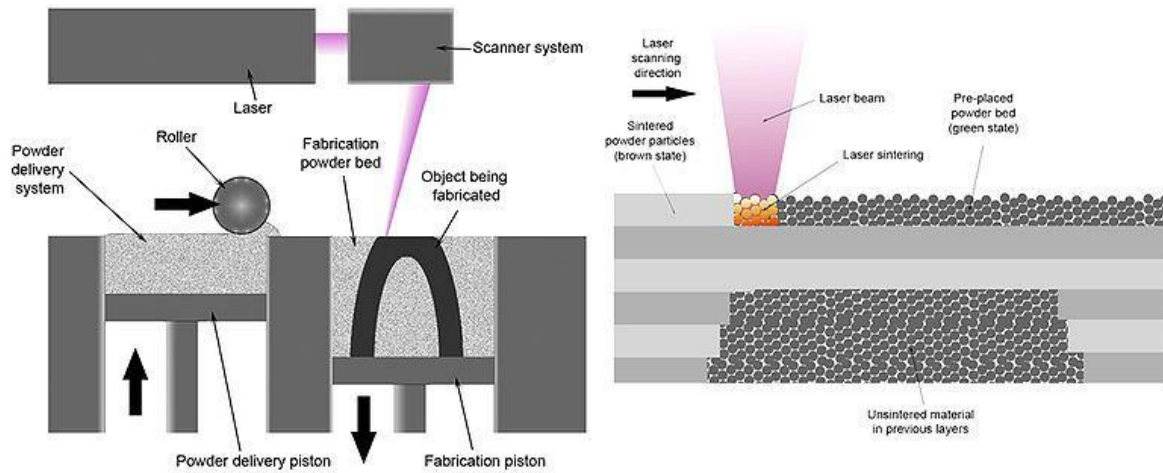
Slika 4. Ekstrudiranje

Kod laminiranja (engl. *Laminated Object Manufacturing*) laserski snop izrezuje konturu objekta iz posebne folije preko koje prelazi zagrijani valjak koji pokreće vezivno sredstvo s njezine donje strane, čime se izrezani sloj povezuje s prethodnim (Slika 5).



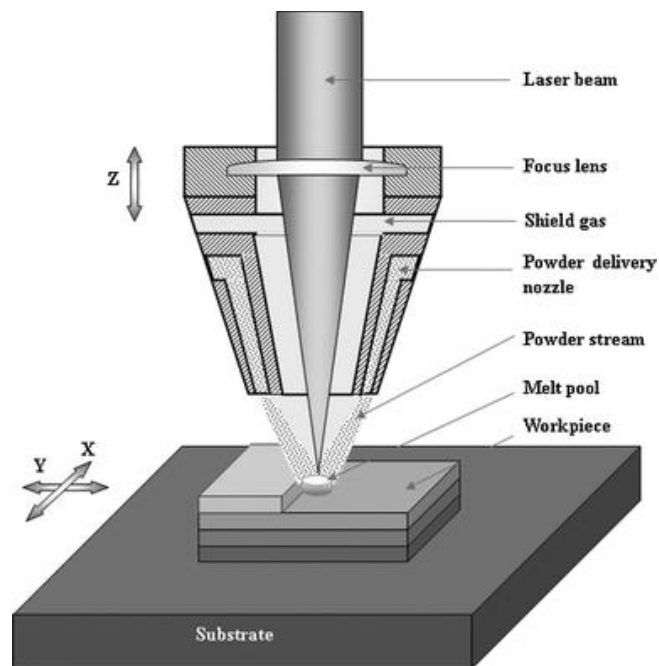
Slika 5. Laminiranje

Stapanje praha (selektivno lasersko srašćivanje) provodi se na način da se nanosi sloj praha na radnu podlogu koji se zatim pomoću visoke temperature lasera tali u zadanom obliku. Radna podloga se spušta za debljinu sloja, nanosi se novi sloj praha i ponavlja se postupak (Slika 6).



Slika 6. Stapanje praha

Izravno taloženje metala je postupak sličan stapanju praha, samo što se koristi prah metala umjesto polimernog praha.[1]



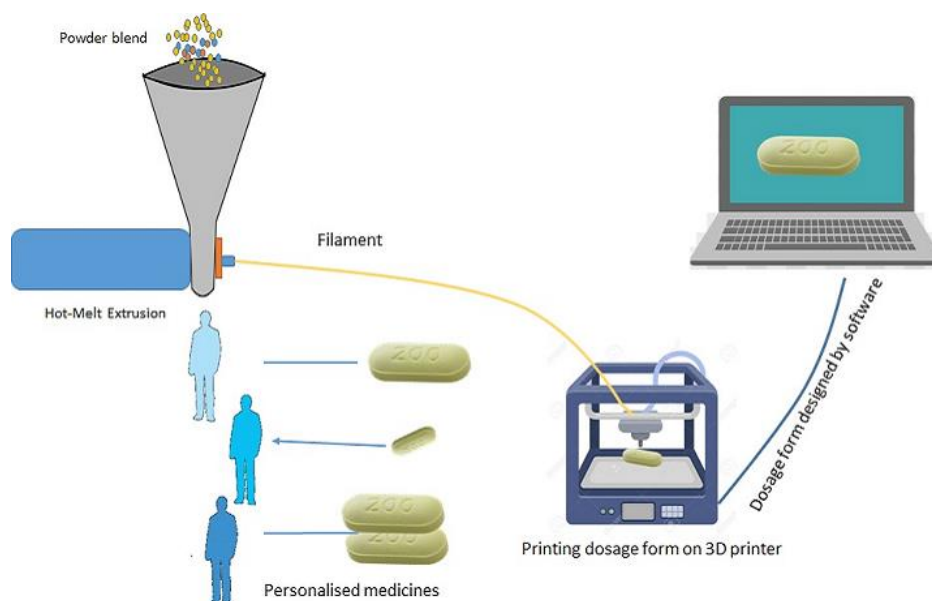
Slika 7. Izravno taloženje metala

Najveću primjenu u farmaceutskoj industriji ima tehnologija taložnog srašćivanja. Veliki nedostatak je visoka temperatura na kojoj se obrađuju polimeri jer djelatna tvar, kada je ugrađena u polimernu matricu, zbog izloženosti visokoj temperaturi može degradirati.

2.1.2. 3D-tisak dozirnih oblika

Konvencionalne metode proizvodnje farmaceutika postoje već preko 200 godina i, unatoč napretku tehnologije u 21. stoljeću, mnoge se i dalje koriste. Iako su takve metode ekonomski isplative za proizvodnju velikih šarži, same po sebi su dugotrajne i zahtijevaju puno radne snage. Međutim, najveći problem je u tome što se dozirni oblici ne mogu prilagoditi pojedinačnim zahtjevima. Rješenje tih problema pronalazi se u 3D-tiskanju farmaceutika. [3]

3D-tisak je inovativan proces proizvodnje predmeta u kojem se materijal nanosi slojevito na podlogu po uzoru na 3D računalni model. Nudi različite tehnologije izrade predmeta te se koriste i materijali poput plastike, keramike i metala, od jednog materijala ili kombinacije materijala gdje se tada svaki materijal nanosi u slojevima pomoću posebnih mlaznica. Ova tehnologija nalazi veliku primjenu u mnogim industrijama zbog jednostavnosti izrade te velike raznolikosti oblika i veličina predmeta. Svaki sloj predstavlja presjek predmeta izvedenog prema virtualnom modelu i tiska se na prethodni sloj. Što je tanji sloj to će biti bolja rezolucija i veća kvaliteta predmeta koji se izrađuje.



Slika 8. 3D-tiskani dozirni oblici [4]

U zadnje vrijeme sve se više razvija interes za 3D-tiskanje zbog povećane potrebe za personalizacijom medicine. Uz 3D-tiskane implantate naveliko se razvilo i korištenje 3D-tiskanih dozirnih oblika (Slika 8). Čvrsti oralni dozirni oblici najzastupljeniji su u farmaceutskoj industriji i najbolje su primljeni kod pacijenata, no postoje razne poteškoće vezane za njihov razvoj, proizvodnju i primjenu. 3D-tisak zbog svoje fleksibilnosti i mogućnosti da se izrade male količine kapsula omogućuje jednostavnu modifikaciju doza prilagođenih potrebama pacijenta. [2, 5, 6]

2.2. Oslobađanje djelatne tvari

2.2.1. Vrste oslobađanja djelatne tvari

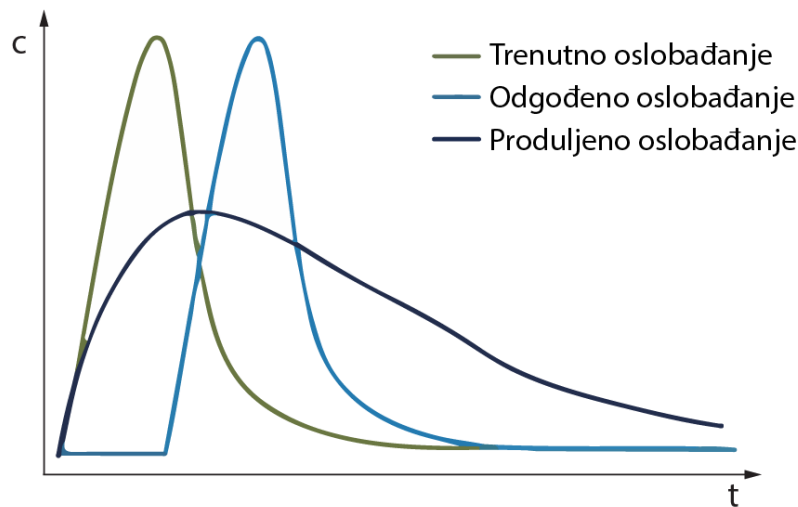
Oralni dozirni oblici ciljaju na poboljšanje bioraspoloživosti molekula lijeka ili modificiranje brzine, vremena ili mjesta njihovog oslobađanja. Često su dizajnirani kao jezgra načinjena od lijeka prekrivena slojevima polimera koji imaju ulogu kontrole oslobađanja lijeka jer služe kao prepreka. Oni mogu biti topljivi filmovi koji odgađaju početak oslobađanja lijeka ili produljuju vrijeme oslobađanja lijeka u organizmu. Apsorpcija lijeka nakon konzumacije temelji se na mogućnosti oslobađanja lijeka iz dozirnog oblika, mogućnosti otapanja lijeka u organizmu i permeabilnosti probavnog trakta. [5, 7]

Oslobađanje djelatne tvari iz dozirnog oblika može se opisati na nekoliko načina:

- trenutno (engl. *Immediate release*)
- modificirano (engl. *Modified release*)
- odgođeno (engl. *Delayed release*)
- produljeno (engl. *Extended release*)
- kontrolirano (engl. *Controlled release*)
- impulsno (engl. *Pulsatile release*)

Trenutno oslobađanje odnosi se na otapanje djelatne tvari u kratkom vremenskom razdoblju bez odgađanja ili produljenja oslobađanja ili apsorpcije lijeka. Odgođeno oslobađanje je ono u

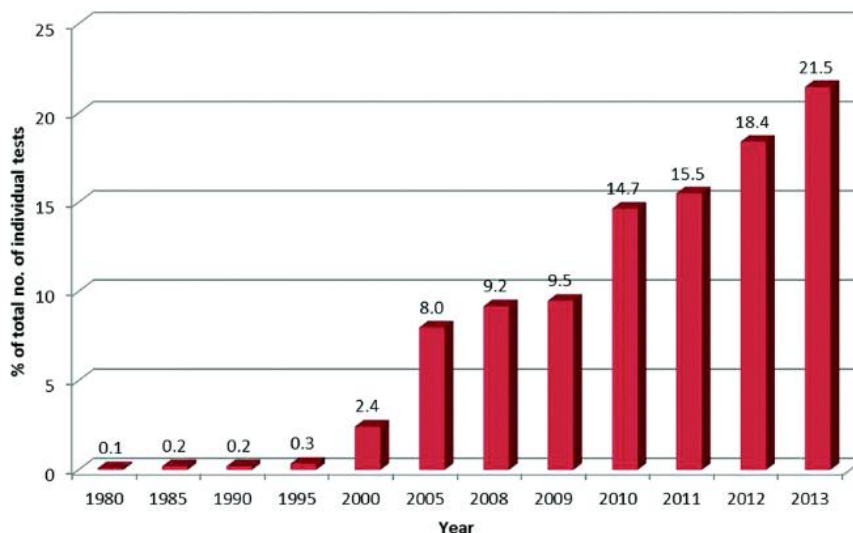
kojem se oslobađanje lijeka ne događa dok tableta ne izađe iz želuca čime se sprječava uništavanje lijeka djelovanjem želučane kiseline i enzima. Produljeno oslobađanje je vrsta oslobađanja gdje je lijek na raspolaganju tijekom dužeg vremenskog perioda. Modificirano oslobađanje uključuje odgođeno i produljeno oslobađanje (Slika 9). Impulsno oslobađanje uključuje otpuštanje djelatne tvari u točno određenim vremenskim intervalima nakon konzumiranja lijeka. Kontrolirano oslobađanje uključuje produljeno i impulsno oslobađanje. [8-12]



Slika 9. Usporedba trenutnog, odgođenog i produljenog oslobađanja

2.2.2. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja prema Europskoj farmakopeji

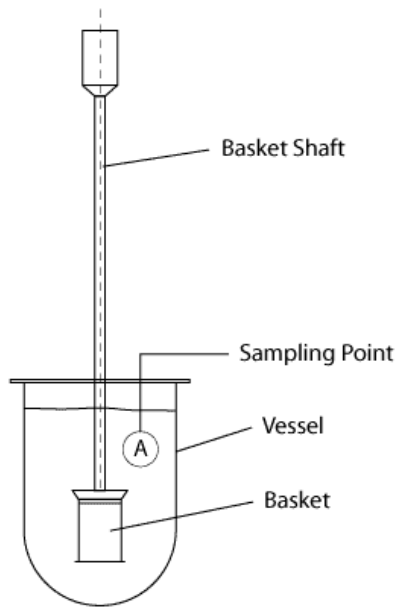
Sigurnosno testiranje lijeka prije ljudske upotrebe je kritičan korak u razvoju lijekova u farmaceutskoj industriji. Do prije petnaestak godina glavni način testiranja lijeka bilo je *in vivo* testiranje na životinjama, dok je već početkom 21. stoljeća porastao broj testiranja *in vitro* (Slika 10). *In vitro* testiranje koristi se za aproksimaciju zbog opasnosti koja je prisutna pri testiranju ponašanja lijeka *in vivo*.



Slika 10. Povećanje *in vitro* testova kroz godine [13]

Kako proces oslobađanja djelatne tvari iz ljekovitog oblika u organizmu nije direktno mjerljiv, do njega se dolazi matematičkim putem, na osnovu eksperimentalnih rezultata dobivenih ispitivanjima *in vitro*. *In vitro* testiranja moraju se provoditi u fiziološkim uvjetima kako bi se moglo prikazati kontrolirano oslobađanje. Da bi se mogao okarakterizirati proces oslobađanja i apsorpcije djelatne tvari u organizmu uspostavlja se *in vitro*–*in vivo* korelacija. To podrazumijeva uspostavljanje odnosa između biološkog svojstva i fizikalno-kemijskih karakteristika lijeka. *In vitro* ispitivanja obuhvaćaju ispitivanje eksperimentalnih uvjeta koji će biti najbližiji rezultatima dobivenima *in vivo*. To je dovelo do znatnog razvoja testa oslobađanja. [14]

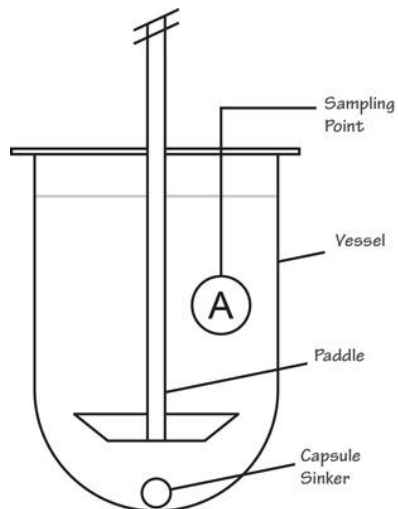
Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari (engl. *Dissolution test*) standardizirana je *in vitro* metoda mjerenja brzine oslobađanja djelatne tvari iz čvrstog dozirnog oblika, a rezultati ispitivanja, ako su pravilno provedena, ukazuju na učinkovitost *in vivo* oslobađanja. Standardne industrijske metode testiranja čvrstih dozirnih oblika su prema Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*) naprava s košaricom (Aparatura 1) (Slike 11 i 12) i naprava s lopaticom (Aparatura 2) (Slika 13). Dimenzije košarice i lopatica, kao i brzina vrtnje i veličina posude su strogo kontrolirane kako se ne bi narušila reproducibilnost testova. U napravi s košaricom ispituju se kapsule i tablete koje bi plutale u otopini dok se u napravi s lopaticom najčešće ispituju tablete s trenutnim, modificiranim ili produljenim oslobađanjem. [8, 12, 15-16]



Slika 11. Aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari, naprava s košaricom [17]



Slika 12. Mrežasta košarica [17]



Slika 13. Aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari, naprava s lopaticom [18]

2.2.3. Kinetika oslobađanja

Oslobađanje djelatne tvari iz čvrstog dozirnog oblika opisano je kinetičkim modelima u kojima je oslobođena količina lijeka (Q) funkcija vremena provedbe testiranja (t), $Q = f(t)$.

Postoji veliki broj kinetičkih modela koji opisuju cjelokupno oslobađanje lijeka iz dozirnog oblika, a metode pristupa istraživanju kinetike oslobađanja lijeka mogu se svrstati u 3 kategorije:

- statističke metode
- metode ovisne o modelu
- metode neovisne o modelu

Neke od statističkih metoda su MANOVA (engl. *Multivariate analysis of variance*), ANOVA (engl. *Univariate analysis of variance*) te istraživačke metode analize podataka. Metode neovisne o modelu su faktor razlike f_1 i faktor sličnosti f_2 . Ove dvije skupine metoda su razvijene statističkim i numeričkim postupcima izrade modela. Metode ovisne o modelu su Higuchijev model, Hixon-Crowellov model, Weibullov model, model nultog i prvog reda te mnoge druge, a dobivene su iz empirijskih korelacija s provedenim eksperimentima.

Kinetički modeli koji se najčešće upotrebljavaju za opis oslobađanja djelatne tvari navedeni su dalje u Tablici 1. [7, 12, 14]

Q_t je količina lijeka otopljena u vremenu t , Q_0 je početna količina lijeka u otopini (uglavnom je to $Q_0 = 0$) i k je odgovarajuća konstanta brzine oslobađanja.

Tablica 1. Metode ovisne o modelu te njihova primjena

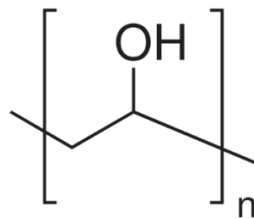
KINETIČKI MODEL	JEDNADŽBA	PRIMJENA
Model nultog reda	$Q_t = Q_0 + K_0t$	Dozirni oblici koji se na raspadaju i sporo oslobađaju lijek
Model prvog reda	$Q_t = Q_0 \exp(-kt)$	Apsorpcija i/ili eliminacija nekih lijekova
Higuchijev model	$Q_t = K_H t^{1/2}$	Dozirni oblici s modificiranim oslobađanjem (npr. tablete s vodotopljivim djelatnim tvarima, transdermalni sustavi)
Hixon – Crowellov model	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC}t$	Sustavi kod kojih postoje promjene u površini i promjeru čestica ili tableta
Weibullov model	$M = M_0 \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right]$	Različiti profili oslobađanja djelatne tvari; za usporedbu oslobađanja lijeka iz matrica
Korsmeyer – Peppasov model	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^{n_K}$	Oslobađanje kod polimernih sustava
Hopfenbergov model	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0} \right]^{n_{HP}}$	Opis heterogene erozije pločastih, sferičnih i cilindričnih dozirnih oblika

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Polivinilni alkohol

Polivinilni alkohol (PVA, PVOH ili PVAL) sintetski je polimer koji je lako razgradljiv, netoksičan i bezopasan živom organizmu. Najčešće se dobiva hidrolizom polivinilnog acetata i koristi se u području industrije, medicine, proizvodnje hrane i komercijalno u vidu lakova, smola, ljepila, kirurških konaca, pakiranja za hranu i slično. Svojstvo biodegradacije PVA izraženo je u vodenim otopinama zbog hidroksilnih skupina na ugljikovim atomima, također je hidrofilan i topljiv u vodi. [19]



Slika 14. Struktura polivinilnog alkohola [20]

U radu je korišten PVA-filament proizvođača Formfutura za 3D-tiskanje kapsula te PVA-filament proizvođača Technology Outlet kao podloga za postizanje boljeg prianjanja.

3.1.2. Biljni ekstrakti

Za analizu su korišteni usitnjeni biljni ekstrakti origana, kadulje, ružmarina i timijana dobiveni s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak.

Origano je aromatična zeljasta biljka. Ima protuupalno, antibakterijsko, antivirusno i antioksidativno djelovanje. Također ima pozitivan utjecaj na zdravlje probavnog trakta. [21]

Kadulja je zimzelena polugrmovita biljka. Uzgaja se zbog eteričnog ulja koje se koristi u medicinske i kozmetičke svrhe. Ima antibakterijsko, antiseptičko i protuupalno djelovanje.

Koristi se kod mnogih lijekova za ispiranje usta i grla kod upala i infekcija zbog mogućnosti podržavanja obnove sluznice. [22]

Ružmarin je biljka mediteranskog područja kultivirana po cijelom svijetu. Ima terapijska svojstva poput protuupalnog, antiseptičkog, antioksidativnog i zaštitnog djelovanja, a osim u medicini koristi se i kao začim te za čuvanje hrane. [23]

Timijan je aromatska, zimzelena biljka s mnogo podvrsta i varijacija. Osim kao začim koristi se i u medicinske svrhe kao sredstvo protiv kašlja, nadimanja i kao diuretik. [24]

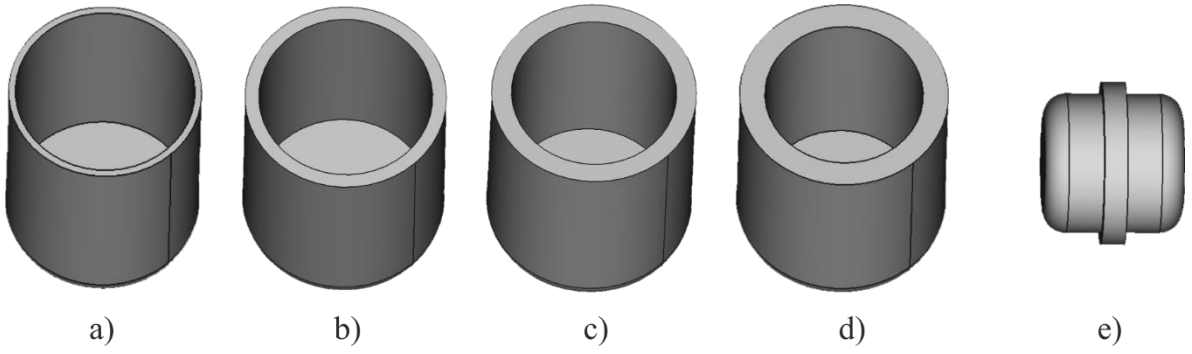
3.2. 3D-tiskane kapsule

3.2.1. Dizajn kapsula

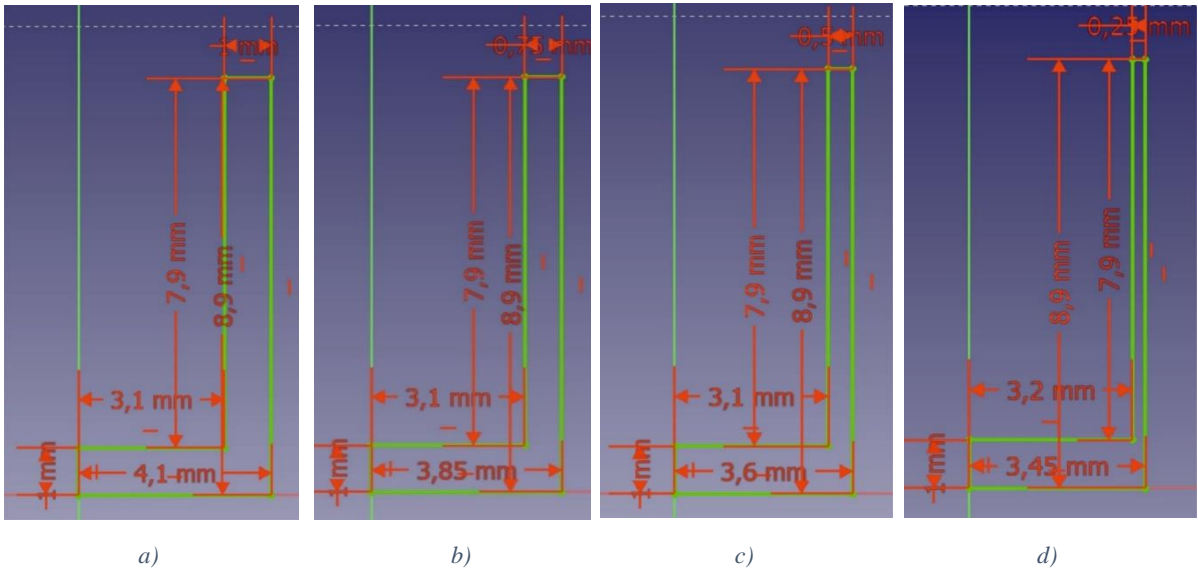
Za dizajn kapsula korišten je program Free CAD. Konačan izgled kapsula određen je mogućnošću zatvaranja. Sama kapsula izrađena je od polivinilnog alkohola bez implementirane djelatne tvari. Kapsula se tiska u 3 dijela; kao 2 čepa i središnji dio (spojnica) na koji se oni spajaju (Slika 15). Tiskane kapsule pune se usitnjenim biljem. Zamisljene su na način da se na središnji dio mogu staviti čepovi različitih debljina stijenki. Prema tome možemo dobiti višenamjenske kapsule koje oslobađaju aktivnu tvar u različito vrijeme.

Debljine stijenki su 1 mm, 0,75 mm, 0,50 mm i 0,25 mm. Unutarnji polumjer isti je kod kapsula debljine stijenki 1 mm, 0,75 mm i 0,5 mm (3,1 mm), a veći je kod kapsule debljine stijenki 0,25 mm (3,2 mm) (Slika 16d). Razlog tome je što je kod manjeg unutarnjeg polumjera čep kapsule pucao pri montiranju na središnji dio jer je sama debljina stijenke premala.

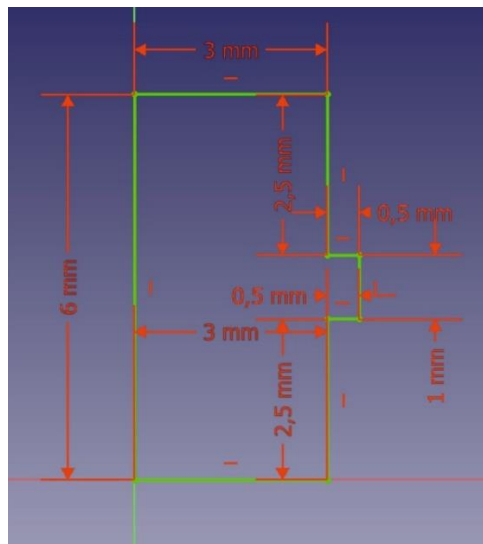
Kapsule nemaju poseban mehanizam zatvaranja jer je na već tako tankoj stijenci vrlo teško isprintati dodatne utore zbog ograničene razlučivosti printera i nesavršenosti procesa tiskanja. Budući da kapsule pri tiskanju nemaju savršeno ravnu površinu već su slojevite to je iskorišteno na način da se kapsule zatvaraju na dosjed, a zatvorenima ih drži sila trenja između slojeva na čepu i središnjem dijelu. Dimenzije spojnice prikazane su na slici 17.



Slika 15. Trodimenzionalni prikaz čepa debljine stijenke a) 0,25 mm; b) 0,50 mm; c) 0,75 mm; d) 1 mm i e) spojnice



Slika 16. Prikaz dimenzija čepa debljine stijenke: a) 1 mm; b) 0,75 mm; c) 0,50 mm i d) 0,25 mm



Slika 17. Prikaz dimenzija središnjeg dijela, spojnice

3.2.2. 3D-tisak kapsula

Za potrebe istraživanja korišten je 3D-printer Inventor tvrtke Flashforge (Slika 18). Printer koristi FDM (engl. *Fused deposition modeling*) tehniku tiskanja. Ima dva ekstrudera te izrazito visoku razlučivost od 50 mikrometara. Postolje se tiska od PVA-filamenta proizvođača Technology Outlet, a sama kapsula od PVA-filamenta proizvođača Formfutura.



Slika 18. 3D-printer Flashforge Inventor

Uvjeti tiskanja kapsula dani su u *Tablici 2.*

Tablica 2. Uvjeti tiskanja

	Središnji dio	Čep kapsule
Rezolucija	visoka	visoka
Visina sloja / mm	0,12	0,05
Visina prvog sloja / mm	0,20	0,10
Gustoća ispune / %	20	100
Oblik ispune	heksagon	heksagon
Brzina tiskanja / mm s ⁻¹	30	10
Brzina pomicanja mlaznice / mm s ⁻¹	50	50
Temperatura desnog ekstrudera / °C	185	185
Temperatura lijevog ekstrudera / °C	185	185
Temperatura platforme / °C	50	50

3.3. Ispitivanje oslobađanja *in vitro*

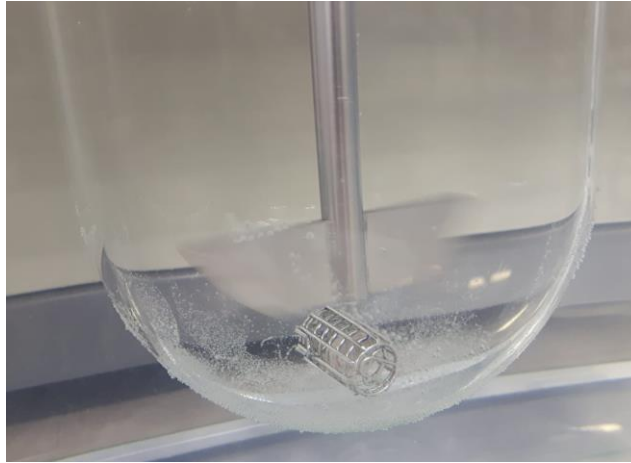
Profili oslobađanja određeni su iz podataka dobivenih *in vitro* metodom pomoću uređaja RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument (Slika 19). Korištena je metoda Aparatura 2 (naprava s lopaticom) (Slika 21). Kao medij je korištena klorovodična kiselina volumena 1000 mL, pH vrijednosti od 1,5, koja simulira uvjete u želucu. Temperatura medija podešena je na $37 \pm 0,5$ °C. Dimenzije miješalica (lopatica) propisane su normom FDA, promjer lopatica je 74 mm. Brzina rotacije je 75 o/min. Uzorkovanje je provedeno u vremenima 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 180 min. Pri izvedbi eksperimenta korištene su košarice za potapanje kapsula (Slika 20). Korištenje košarica omogućava potapanje dozirnog oblika i pomaže u ponovljivosti mjerenja.



Slika 19. Dissolution tester RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument



Slika 20. Košarica za potapanje



Slika 21. Aparatura 2 (naprava s lopaticama) i košarica za potapanje

3.4. Test s bojilima

Vizualan test s bojilima proveden je u uređaju za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari RC-6D (Slika 19). Testom se pokušalo vizualno utvrditi trenutak oslobađanja bojila iz čepova 3D-kapsula različitih debljina. Kao medij korištena je 0,1 M vodena otopina klorovodične kiseline, pH 1,2. Svaka kapsula imala je čepove iste debljine te je jedna strana punjena bojom BEZAKTIV blau P-3R, a druga strana bojom BEZAKTIV brilliantrot P-B. Volumen medija bio je 1000 mL. Kapsule se fotografirane pomoću Nikon D5300 fotoaparata svaku minutu te je naknadnom analizom fotografija zabilježeno vrijeme u kojem je došlo do oslobađanja bojila iz kapsule.

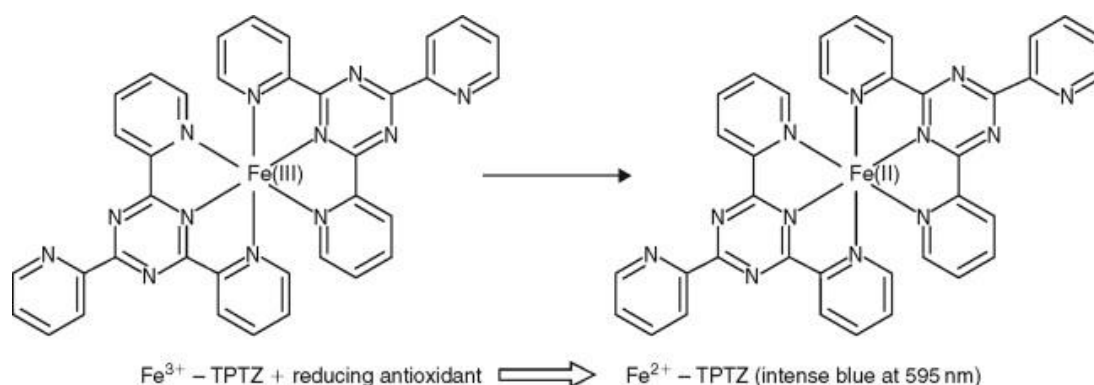
3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta, aktivnosti i ukupnih fenola

Antioksidacijski kapacitet, antioksidacijska aktivnost i ukupni fenoli određeni su prema metodama opisanim u nastavku. Uzorcima uzetim u *in vitro* ispitivanjima dodani su određeni reagensi te su nakon toga mjerene apsorbancije pri odgovarajućim valnim duljinama upotrebom UV/Vis spektrofotometrije. Korišten je UV/Vis spektrofotometar UV-1280 (*Shimadzu, Japan*). Uzorci su prije mjerenja filtrirani pomoću filtra *Chromafil Xtra H-PTFE-45/25* veličine pora od 0,45 μm . Na temelju izmjerene apsorbancije i prethodno konstruiranih baždarnih pravaca, izračunati su antioksidacijski kapacitet, antioksidacijska aktivnost i ukupni fenoli za sve ispitane ekstrakte.

3.5.1. FRAP metoda

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing and Antioxidant Power*) se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH = 3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe³⁺ ione u Fe²⁺ ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH (Slika 22). Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancije pri 595 nm. [25]



Slika 22. Redukcija Fe-kompleksa

Priprema uzoraka

Reagensi:

1. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl
2. 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6
3. 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl₃
4. 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ
5. Standard željezov(II)-sulfat septahidrat (FeSO₄×7H₂O)
6. FRAP reagens (50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl₃, omjer 10:1:1).

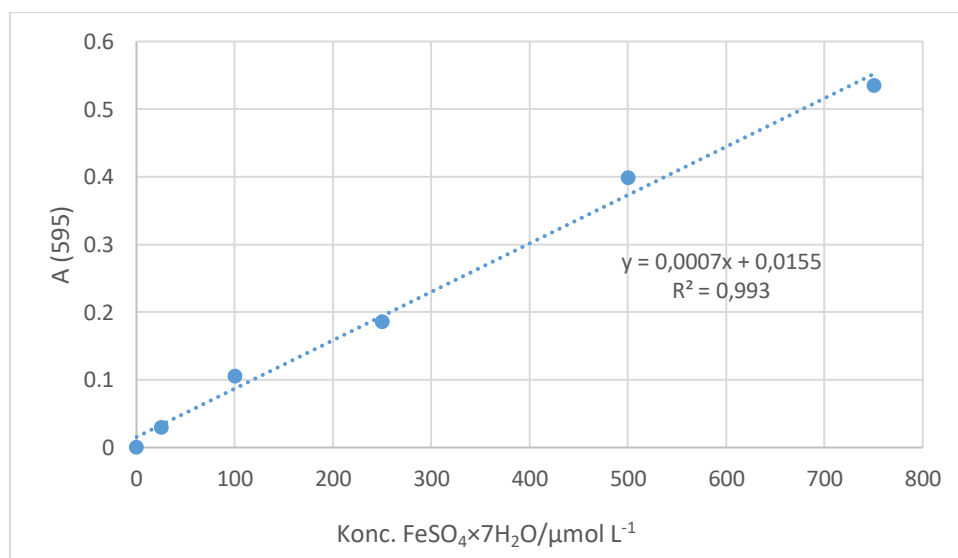
U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka (prethodno adekvatno razrijeđenog) i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 5 minuta termostatira pri temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran.

Baždarni dijagram

Za pripremu baždarnog pravca (Slika 23) pripremi se 500 mL 1mM otopine željezo (II)-sulfata septahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0; 0,25; 1; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvot otopine željezo (II)-sulfata septahidrata te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda i 2080 μL FRAP reagensa, kratko promiješa te 5 minuta termostatira pri 37 °C u kupelji rotavapora. Zatim se mjeri apsorbancija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

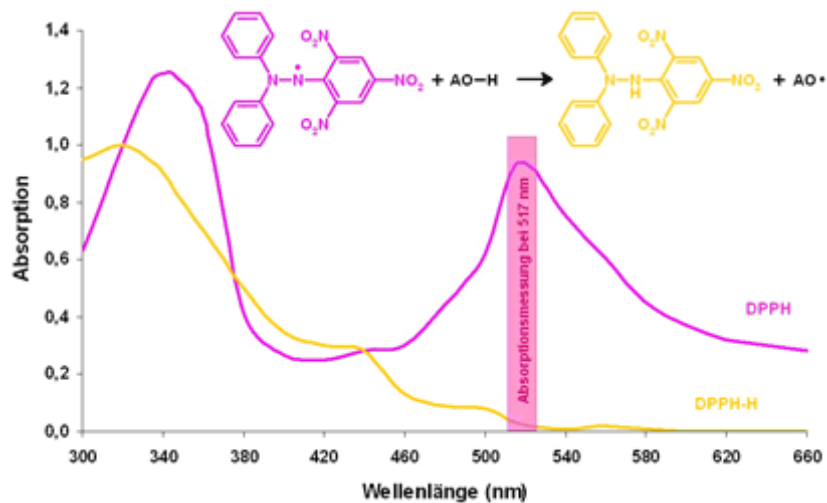
Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtana se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.



Slika 23. Baždarni dijagram FRAP metode u kojem se iz apsorbancije određuje ekvivalent Fe^{2+} ($\mu\text{mol/L}$)

3.5.2. DPPH metoda

DPPH metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H (Slika 24). Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona. [26-27]



Slika 24 Promjena boje DPPH reakcijom s antioksidansom

Priprema uzoraka

Reagensi:

1. 100 %-tni metanol
2. 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

3. Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) 1 mM

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorpcije kontrole potrebno je oduzeti apsorpciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100% metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

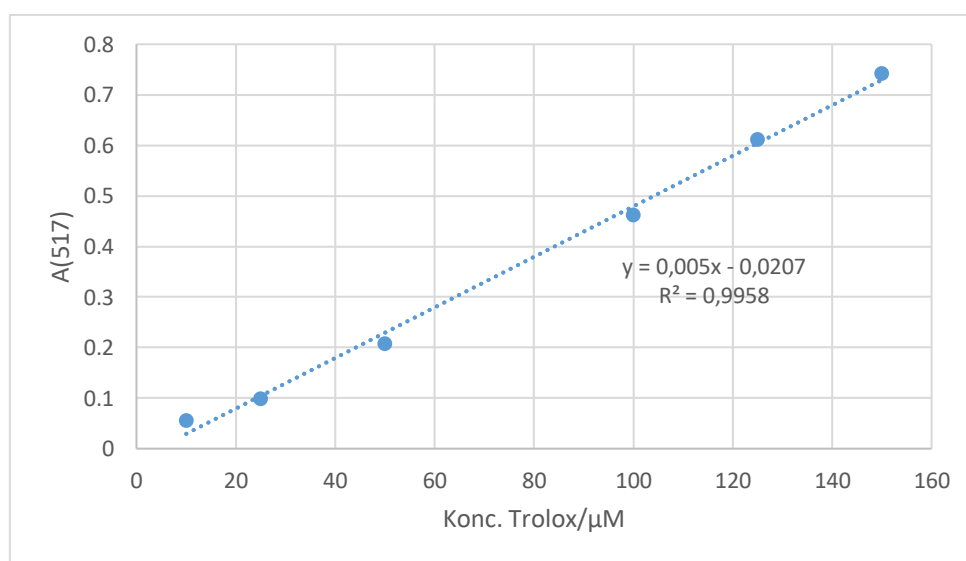
Baždarni dijagram

Za pripremu baždarnog pravca (Slika 25) pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μM na način da se redom otpipetira: 100, 250, 500, 1000, 1250 i 1500 μL u odmjerne tikvice od 10 mL te se iste do oznake nadopune 100%-tnim metanolom.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100% metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtana se baždarni pravac pri čemu je na apscisi nanesen ekvivalent Troloxa u μM , a na ordinati razlika kontrole i apsorbanacije uzorka pri 517 nm. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost uzoraka određena DPPH metodom.

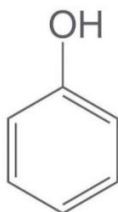


Slika 25. Baždarni dijagram DPPH metode u kojem se iz apsorbanacije određuje ekvivalent Troloxa (μM)

3.5.3. Metoda UF

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm.

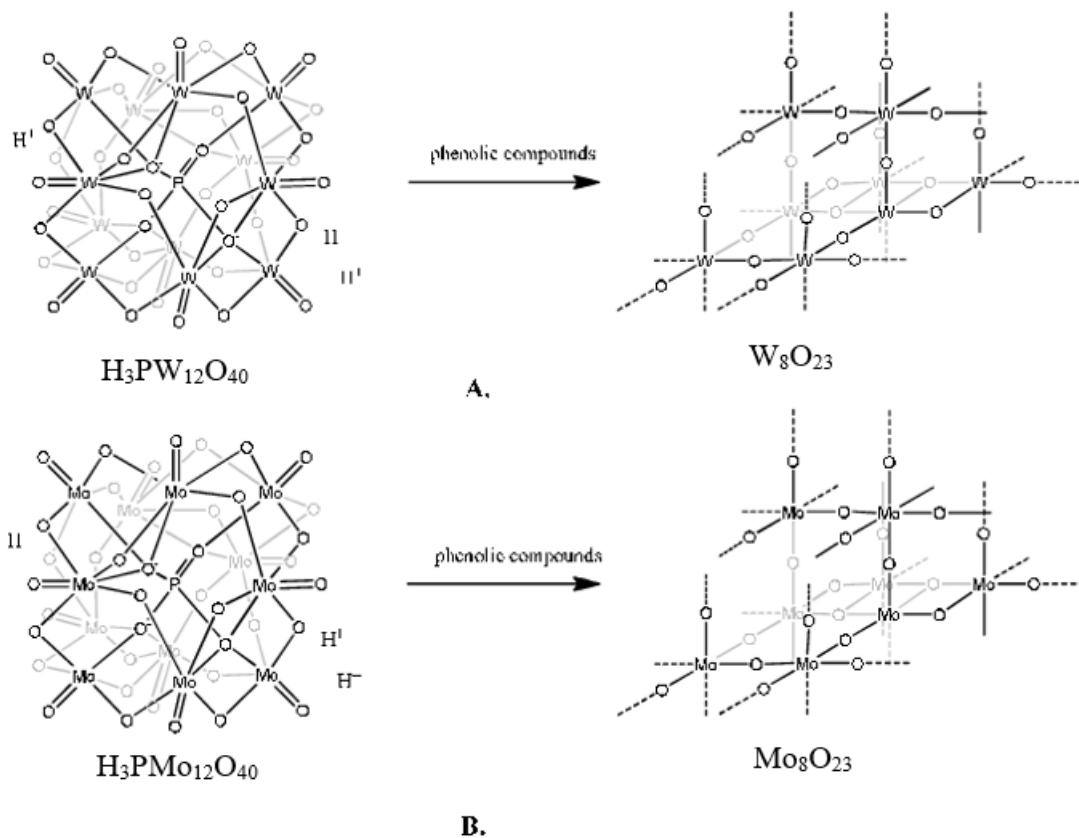
Fenolni spojevi se ubrajaju u specifične pigmente i sekundarni su biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljaka u značajnim količinama. Sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima, a u samim biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno i kao fotoreceptori. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu parametri okoliša (svijetlost, temperatura, uvjeti dozrijevanja...). Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Slika 26). [28]



Slika 26. Struktura fenola

Fenolni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih, koje su jednostavnije, i kromatografskih metoda, a najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni (Slika 27).

Redukcija ovih kiselina, odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm.



Slika 27. Redukcija fosfovolframske (A) i fosfomolibdenske (B) kiseline

Priprema uzoraka

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
3. Standard galne kiseline

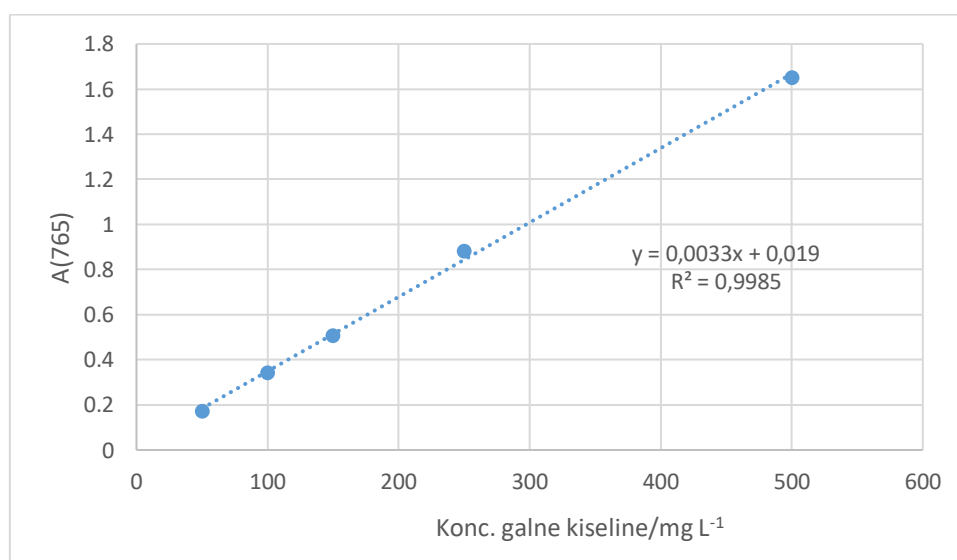
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Baždarni dijagram

Za pripremu baždarnog pravca (Slika 28) odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneju tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 60 minuta na sobnoj temperaturi. Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 28. Baždarni dijagram metode UF u kojem se iz apsorbancije određuje koncentracija galne kiseline (mg/L)

4. REZULTATI

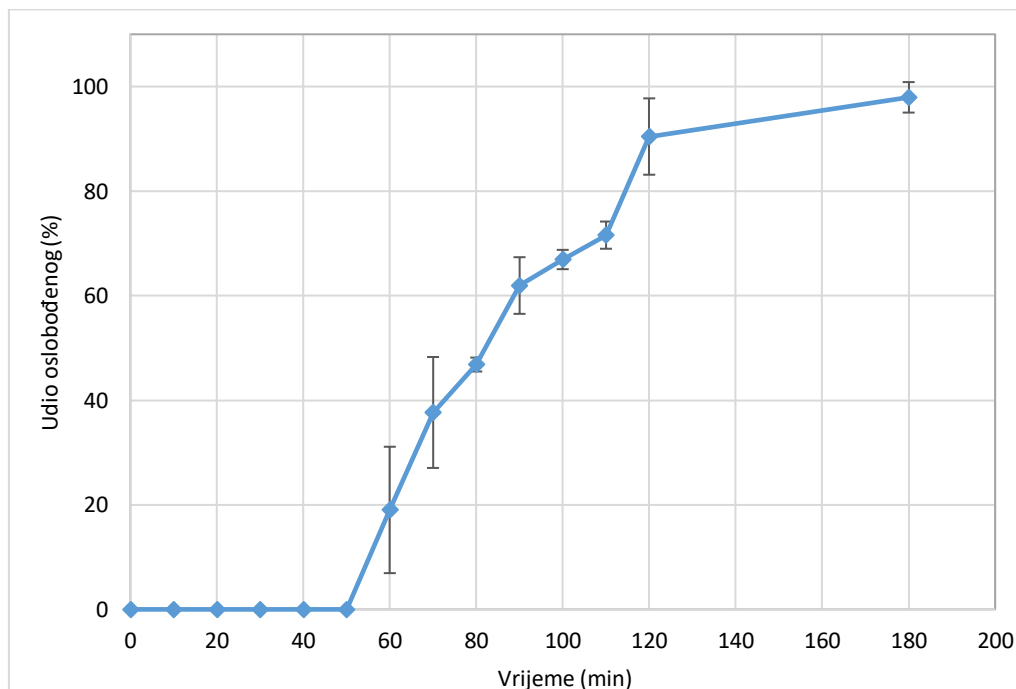
U ovom poglavlju dani su rezultati dobiveni analitičkim metodama (FRAP, DPPH, UF) te rezultati ispitivanja vremena oslobađanja kapsula različitih debljina.

Ispitivanje vremena oslobađanja

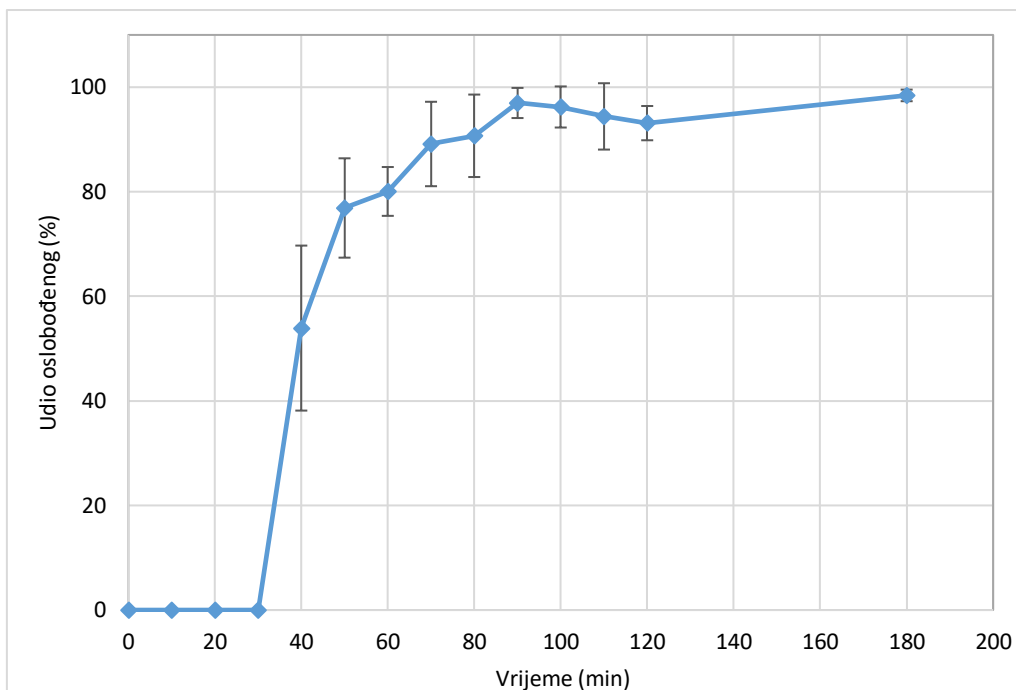
Tablica 3. Vrijeme oslobađanja za određenu debljinu stijeke kapsule

Debljina opne/ mm	Vremena oslobađanja/ min	Srednje vrijeme oslobađanja/min
0,25	25	26,5
	28	
0,5	30	33
	36	
0,75	60	63,5
	67	
1	73	78,5
	84	

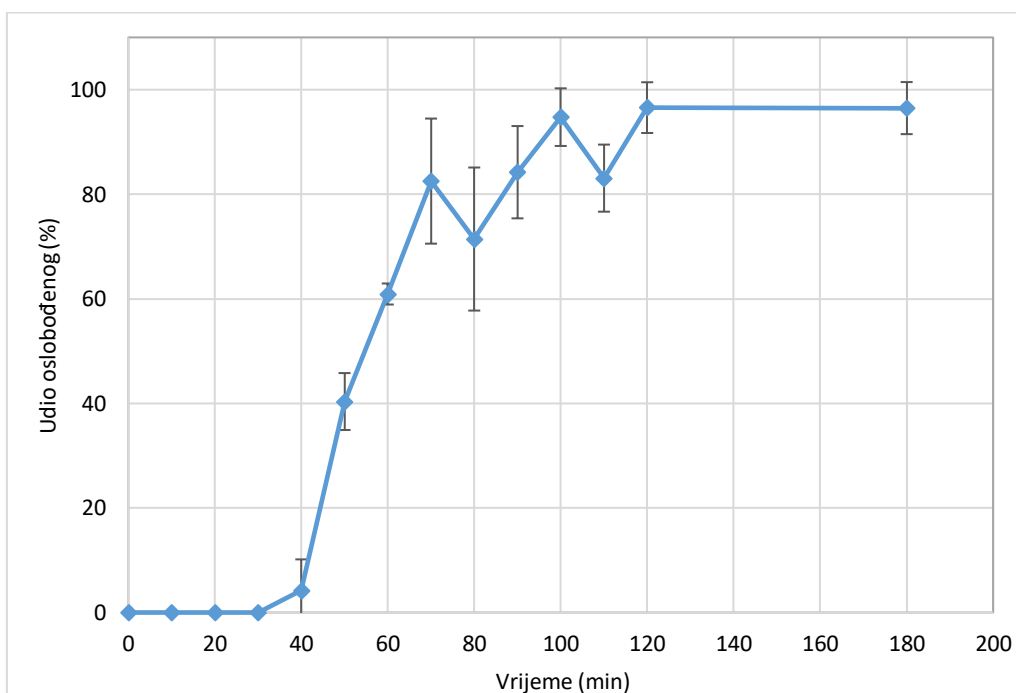
FRAP metoda



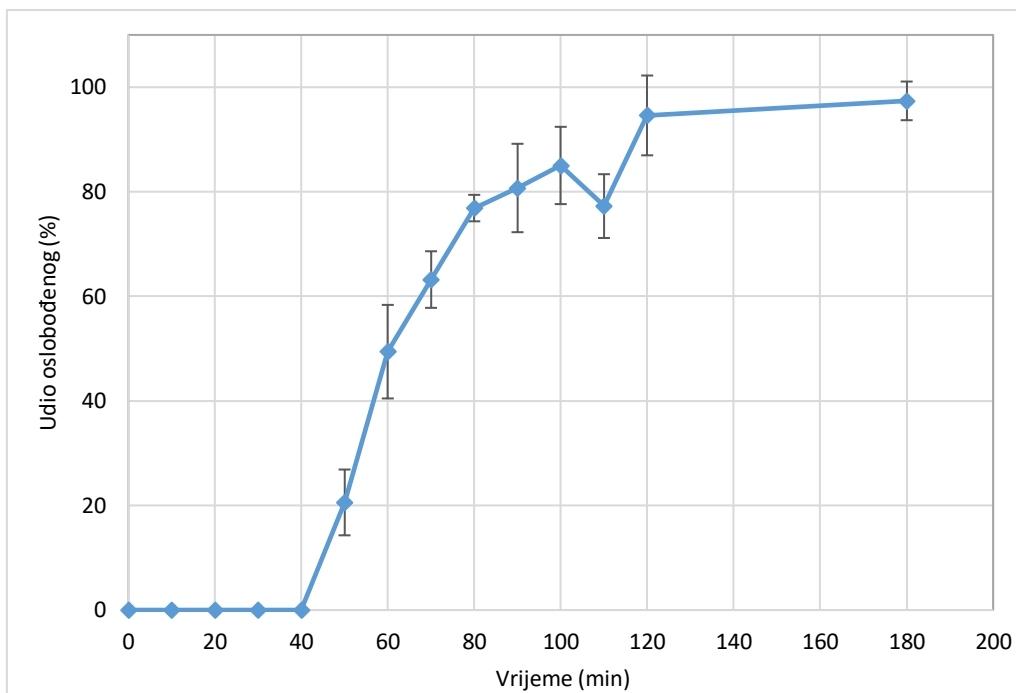
Slika 29. Promjena antioksidacijskog kapaciteta za ružmarin



Slika 30. Promjena antioksidacijskog kapaciteta za timijan

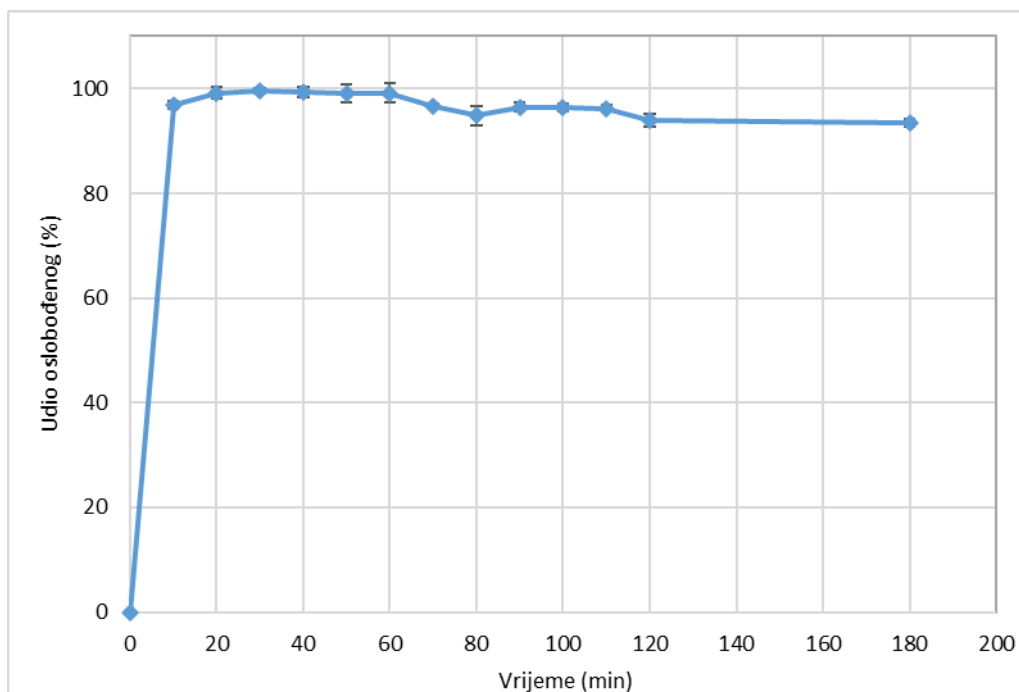


Slika 31. Promjena antioksidacijskog kapaciteta za origano

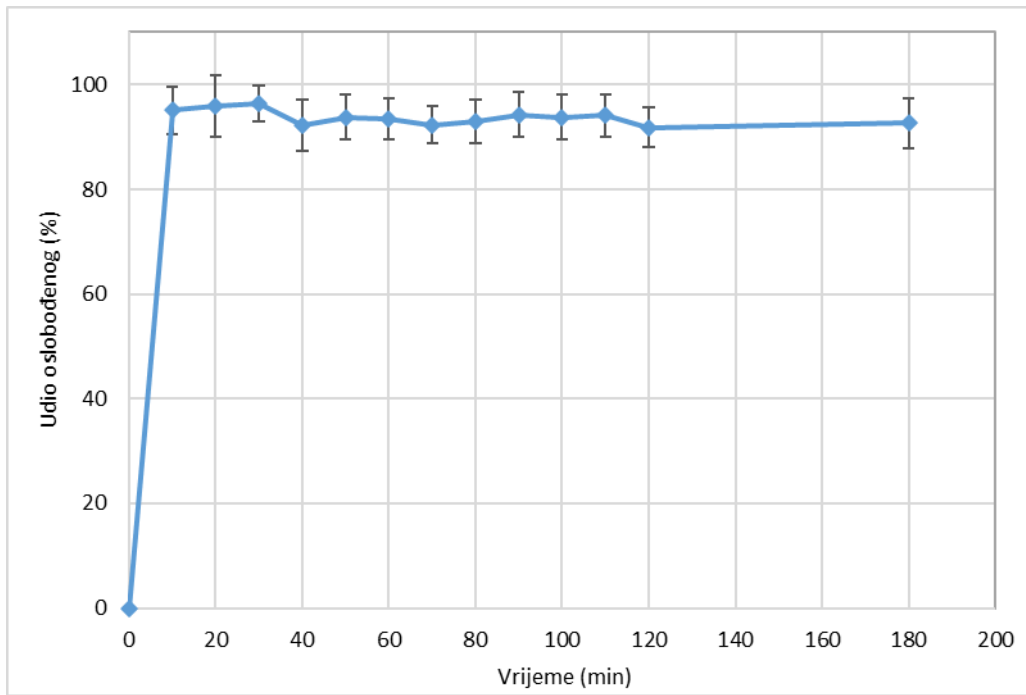


Slika 32. Promjena antioksidacijskog kapaciteta za kadulju

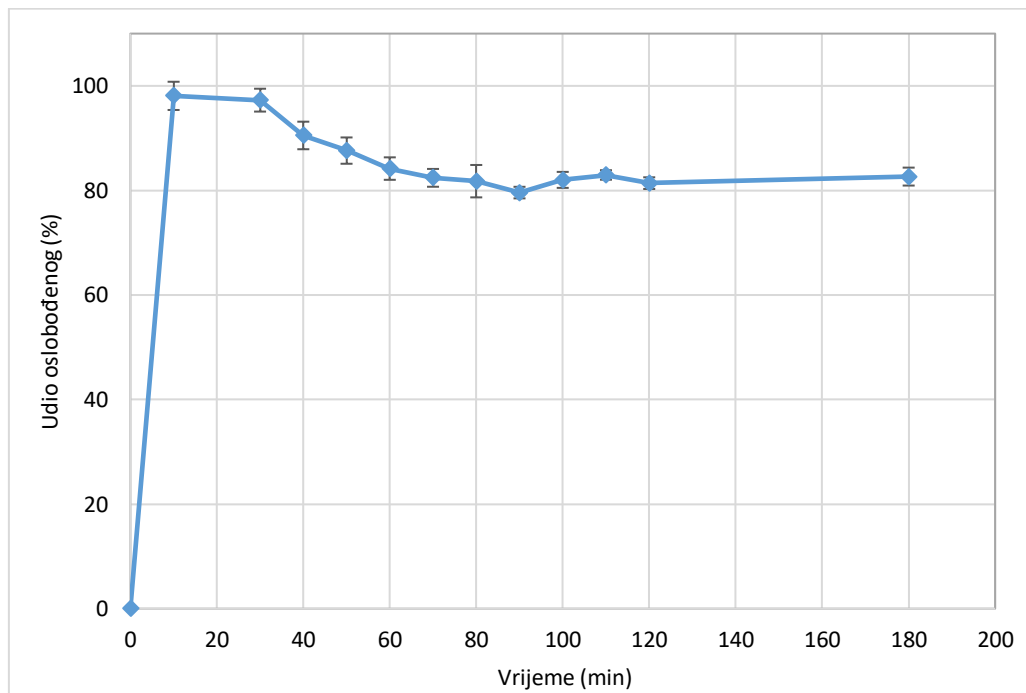
DPPH metoda



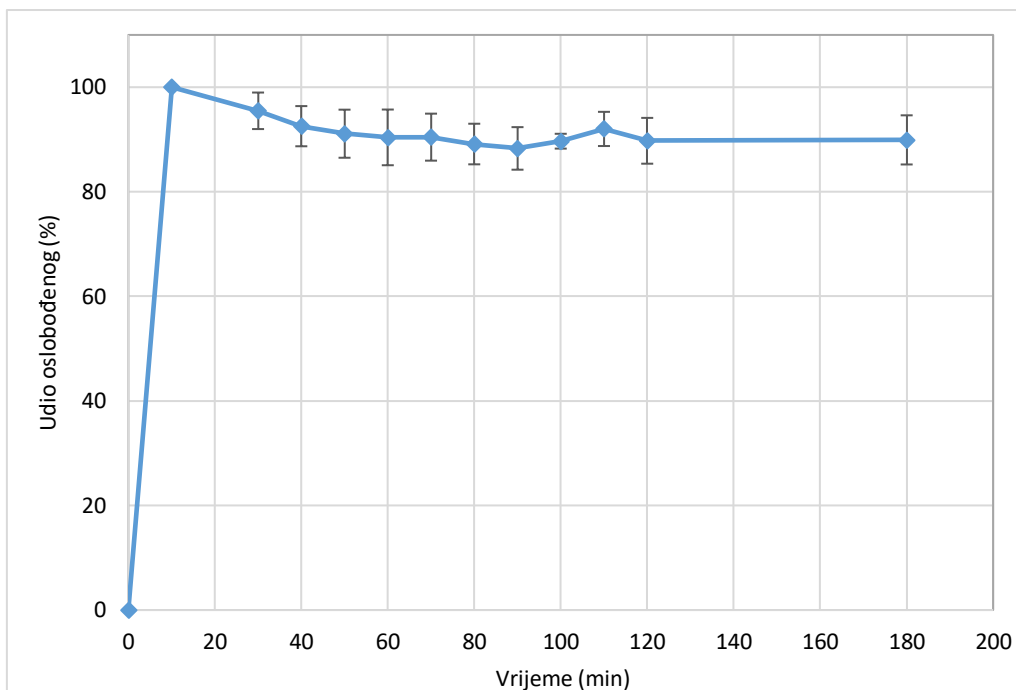
Slika 33. Promjena antioksidacijske aktivnosti za ružmarin



Slika 34. Promjena antioksidacijske aktivnosti za timijan

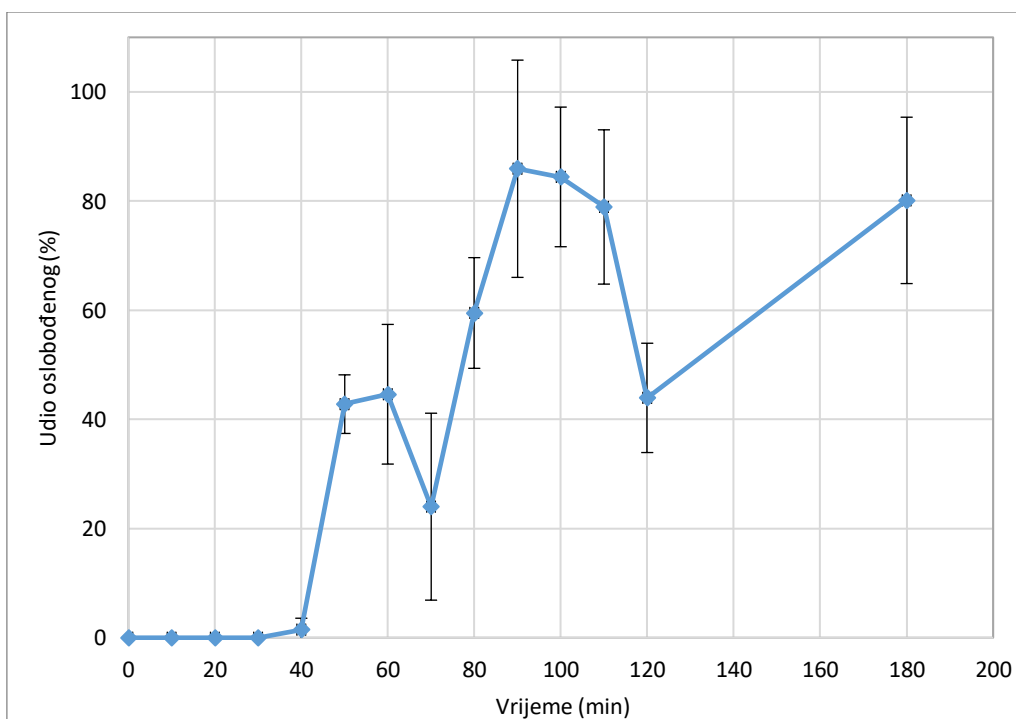


Slika 35. Promjena antioksidacijske aktivnosti za origano

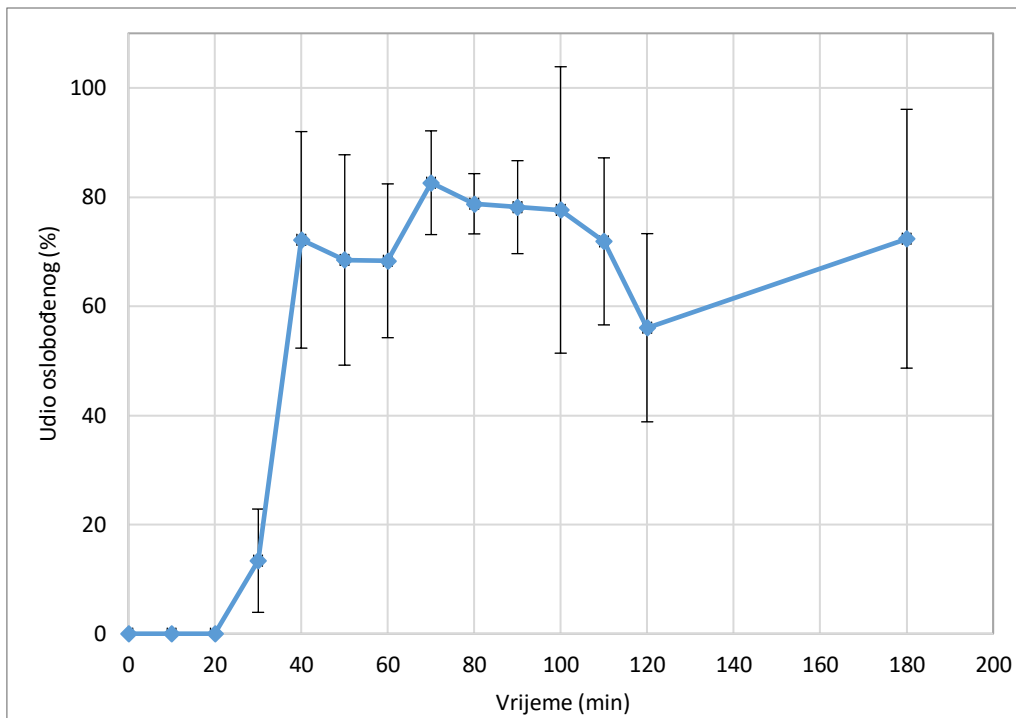


Slika 36. Promjena antioksidacijske aktivnosti za kadulju

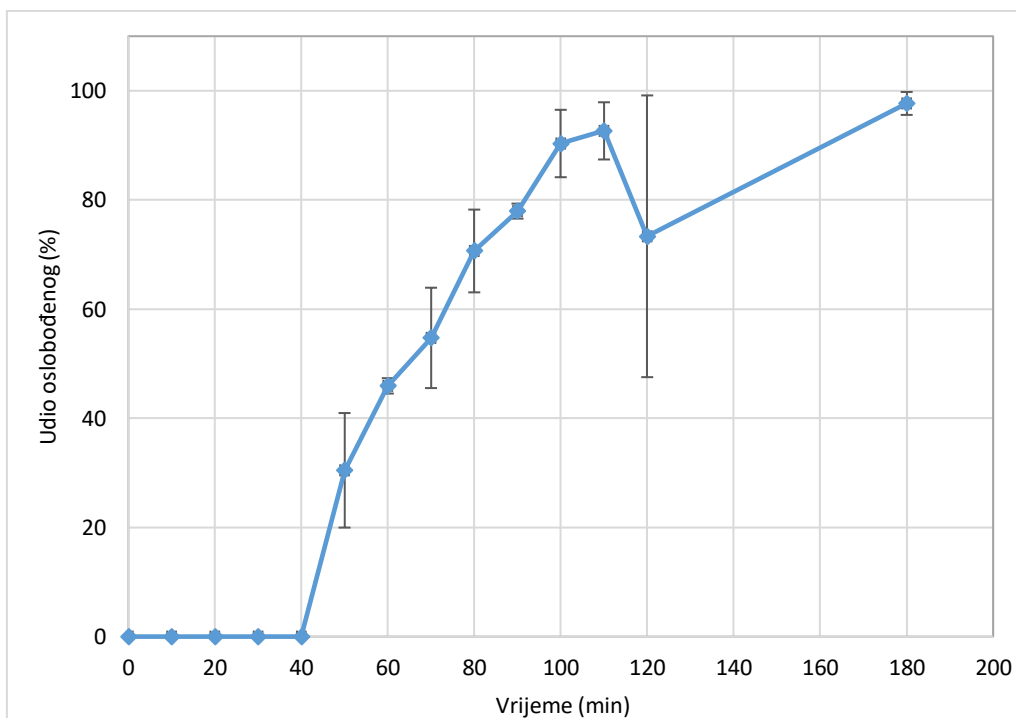
UF metoda



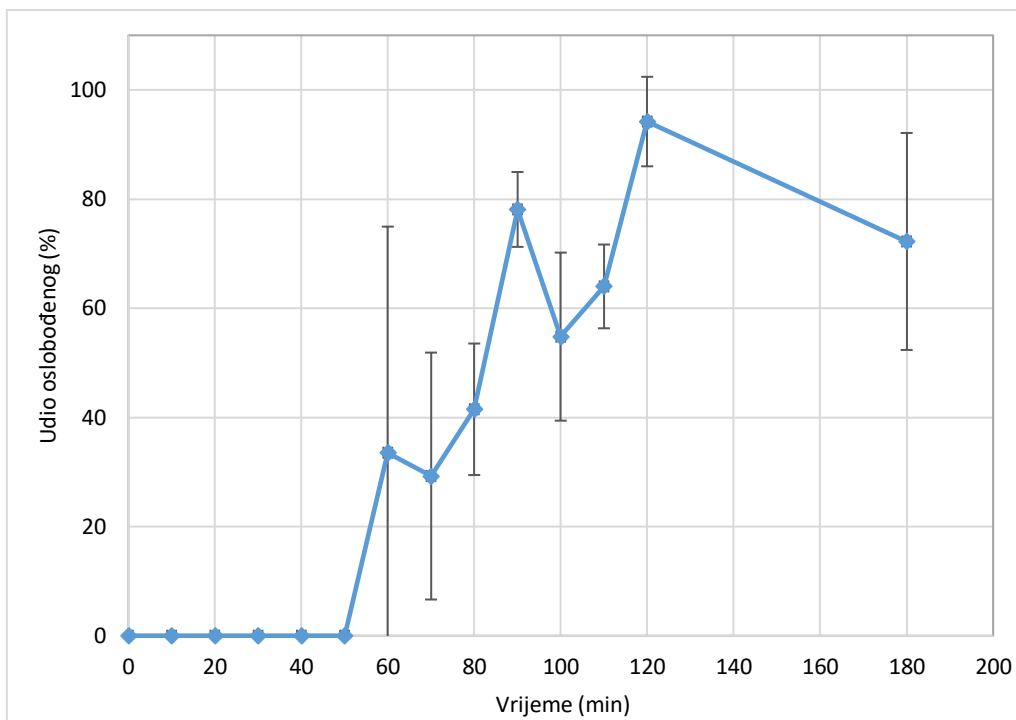
Slika 37. Ukupni fenoli – ružmarin



Slika 38. Ukupni fenoli – timijan



Slika 39. Ukupni fenoli – origano



Slika 40. Ukupni fenoli – kadulja

5. RASPRAVA

Prije samog eksperimenta s biljnim ekstraktima uspoređeno je vrijeme otpuštanja bojila iz kapsula svih debljina stijenki. Na taj je način dobiveno prosječno vrijeme otpornosti kapsule na želučanu kiselinu nakon kojeg dolazi do oslobađanja sadržaja kapsule. Ispitivanje je provedeno pomoću uređaja RC-6D (Zhengzhou Nanbei Instrument) u istim uvjetima kao i za biljne ekstrakte. Kapsule su se za ovu svrhu punile laktozom u prahu pomiješanom s bojilima za tekstil kako je opisano u eksperimentalnom dijelu. Ispitivanje se provodilo na način da se vizualno pratilo oslobađanje sadržaja kapsula, a kao vrijeme oslobađanja uzeo se trenutak u kojem se počelo primjećivati obojenje medija oko kapsule. Za svaku vrstu kapsule provedena su dva mjerenja iz kojih su potom izračunate srednje vrijednosti vremena oslobađanja. Rezultati su prikazani u tablici 3 kao srednje vrijednosti dva mjerenja. Povećanjem debljine stijenke povećava se i vrijeme potrebno da dođe do oslobađanja sadržaja, što je i očekivano. Prosječno vrijeme oslobađanja iz kapsule debljine stijenke 0,25 mm je 26,5 min, 33 min za 0,5 mm, 63,5 min za 0,75 mm i 78,5 min za 1 mm. Za eksperiment s biljnim ekstraktima odabrana je kapsula debljine stijenke 1 mm jer se pokazalo da ima dovoljno dugo vrijeme oslobađanja. Na slikama 29. do 40. prikazani su profili oslobađanja u obliku udjela oslobođenog ekstrakta u vremenu, a dobivenih pomoću FRAP, DPPH i UF metode. Ukupno vrijeme ispitivanja oslobađanja bilo je 180 minuta. Istraživanje je provedeno standardiziranom metodom ispitivanja oslobađanja djelatne tvari (engl. *Dissolution test*) pomoću Aparature 2 (naprava s lopaticama). Iz izmjerenih apsorbancija, pomoću baždarnih dijagrama određen je antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda), antioksidacijska aktivnost (DPPH metoda) i ukupni sadržaj fenola (metoda UF). U profilima oslobađanja navedene veličine prikazane su udjelima (udio oslobođenog, %) koji je izračunat kao omjer izmjerene vrijednosti u nekom vremenu i maksimalno postignute vrijednosti koja je uzeta ukupna vrijednost prema količini ekstrakta kojim su punjene kapsule.

FRAP

Prema FRAP metodi su iz izmjerenih apsorbancija izračunate koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (μM), odnosno antioksidacijski kapacitet uzoraka. Profili oslobađanja (Slike 29–32) ukazuju na odgođeno oslobađanje. Nije registriran antioksidacijski kapacitet u prvih 30 do 50 minuta kada je kapsula bila postojana i nije došlo do oslobađanja njezinog sadržaja. Nakon 30. minute oslobađaju se timijan i origano, potom kadulja nakon 40 minuta, a zadnji se oslobađa ružmarin nakon 50 minuta. Vrijeme oslobađanja u stvarnom eksperimentu s ekstraktima kraće je nego u

onom s bojilima unatoč tome što su uvjeti ispitivanja (medij, temperatura, uvjeti miješanja i uzorkovanja) bili isti. Test s bojilima pokazao je da je prosječno vrijeme odgode oslobađanja 78,5 min dok je kod ispitivanja ekstrakata antioksidacijska aktivnost uočena nakon 30 do 50 min. Ranije oslobađanje ekstrakata pripisuje se njihovom granulometrijskom stanju. Naime, radi se o sitnih česticama i vrlo kohezivnom prašku koji nema dobra svojstva tecivosti. Zbog toga moguće da je prilikom ručnog punjenja kapsula došlo do zadržavanja ekstrakta na stijenkama čepa zbog čega središnja spojnica nije dobro prianjala na čepove (Slika 15). Time dolazi do prodiranja medija između čepa i spojnice, a time i bržeg oslobađanja ekstrakta. Nakon 180 min kod svih je uzoraka postignut maksimalan antioksidacijski kapacitet. Kako je opisano u teorijskom dijelu, profili oslobađanja djelatnih tvar često se opisuju kinetičkim modelima. Higuchijev model često se koristi za opis brzine oslobađanja djelatnih tvari iz polimernih matrica. [29, 30]. U slučaju odgođenog oslobađanja modificira se tako da uključuje vrijeme odgode (T_{lag}), a zapisuje se u sljedećem obliku:

$$Q_t = K_H(t - T_{lag})^{1/2} \quad (1)$$

gdje je K_H konstanta brzine oslobađanja prema Higuchiju, a t je vrijeme.

U slučaju kada polimer bubri, Higuchijev model pokazuje određena odstupanja. [31] Predložen je model kojim se opisuje porast antioksidacijskog kapaciteta, a izvedenica je Higuchijevog modela.

$$Q_t = K^a(t - T_{lag})^b \quad (2)$$

Na slici 41 prikazana je usporedba eksperimentalnih podataka i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivenih na temelju modela za četiri vrste ekstrakata.

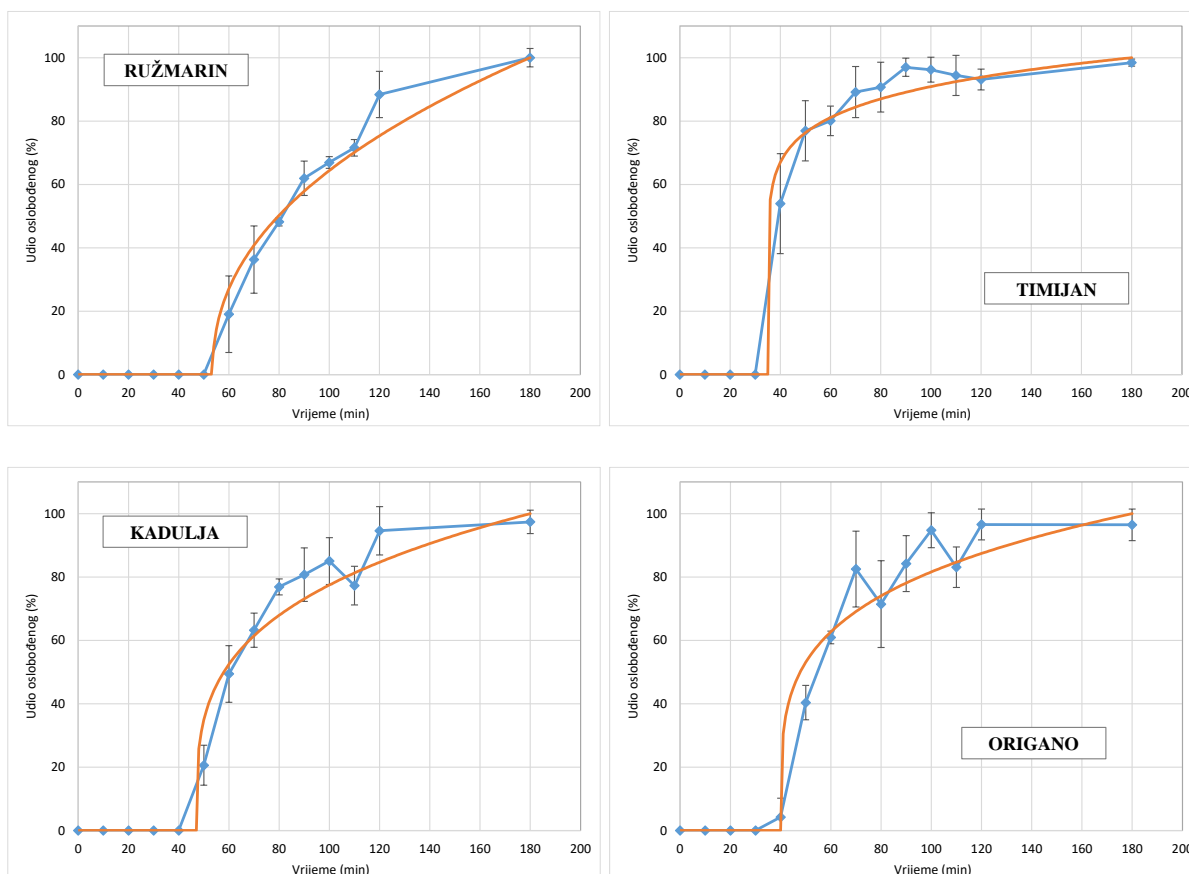
Vrijednosti konstanti brzine oslobađanja, koeficijenta modela i koeficijenta determinacije dane su u tablici 4.

Tablica 4. Konstante predloženog modela (jedn. 2)

EKSTRAKT	K, min^{-1}	T_{lag}, min	$a, -$	$b, -$	$R^2, -$
Ružmarin	4,625	53,5	0,44	1,615	0,986
Timijan	4,311	35,0	0,12	2,746	0,995
Kadulja	4,235	47,0	0,27	2,250	0,970
Origano	4,901	40,0	0,24	2,151	0,980

Konstante brzine oslobađanja za sva četiri ekstrakta su podjednake. Međutim, vrijednosti eksponenta brzine (a) se razlikuju pa se može zaključiti da ovaj eksponent ukazuje na brzinu oslobađanja. Veće vrijednosti dobivene za ružmarin pokazuju najsporije oslobađanje, odnosno

najsporiji rast antioksidacijskog kapaciteta. Najbrži rast uočen je za timijan dok kadulja i ružmarin pokazuju podjednaku brzinu oslobađanja. Važno je napomenuti da je u navedenom modelu jedino vrijeme odgode oslobađanja karakteristika samog 3D-tiskanog oblika. Jednom kada dođe do oslobađanja sadržaja iz kapsule, brzina oslobađanja posljedica je karakteristika ekstrakta (raspodjela veličina čestica, specifična površina, topljivost i sl.).



Slika 41. Usporedba grafova FRAP metode za različite ekstrakte; eksperimentalni podaci i rezultati dobiveni modelom

DPPH

DPPH metodom određuje se antioksidacijska aktivnost. Dobiveni rezultati (Slike 33 – 36) pokazuju da je već u prvom mjerenju (10 min) ostvarena maksimalna antioksidacijska aktivnost. Ovakav rezultat nije u skladu s FRAP i UF metodama u kojima je pokazano odgođeno oslobađanje ekstrakta. Vjerojatni razlog tome je prijevremena redukcija DPPH reagensa u prisutnosti klorovodične kiseline. Budući da rezultati značajno odstupaju te nisu u

skladu s odgođenim oslobađanjem iz 3D-tiskanih kapsula, ova metoda nije pogodna za opis oslobađanja ekstrakata iz kapsula.

UF

Na slikama 37 – 40 prikazan je udio ukupnih fenola oslobođenih tijekom vremena. Na početku, unutar prvih 40 minuta, nema odziva, što odgovara tome da nije došlo do oslobađanja ekstrakata iz kapsule. Nakon što se dostigne granično vrijeme i kapsula počinje oslobađati sadržaj, dolazi do promjene sadržaja fenola u mediju. Međutim, ne može se uočiti konstantan porast koncentracije s vremenom već vrijednosti variraju. Razlike uočene u tri mjerenja rezultiraju potpuno neusporedivim profilima s velikim vrijednostima standardnih devijacija. Ova odstupanja mogu se pripisati malim koncentracijama ispitivane tvari kod kojih i najmanja pogreška u provedbi eksperimenta ima velik odziv u rezultatima. Također, moguće je i da je došlo do pogreške kod dodavanja reagensa ili uzorci nisu dovoljno dugo termostatirani.

Oslobađanje ekstrakata iz 3D-tiskanih kapsula može se, pomoću rezultata dobivenih FRAP metodom, opisati kao odgođeno oslobađanje. Ono podrazumijeva početak oslobađanja ekstrakta iz kapsule tek nakon nekog vremena, odnosno vremena potrebnog da dođe do razgradnje opne kapsule u uvjetima prisutnim u želucu (Slika 9). [17]

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeno je *in vitro* ispitivanje 3D-tiskanih kapsula punjenih biljnim ekstraktima, ružmarin, timijan, origano i kadulja.

Korištene su kapsule čiji poklopci imaju stijenke debljine 1 mm. Prema rezultatima dobivenim FRAP metodom, profili oslobađanja ekstrakata iz 3D-tiskanih kapsula podudaraju se s onima odgođenog oslobađanja. Promjenom debljine stijenke 3D-tiskane kapsule može se regulirati vrijeme i mjesto oslobađanja određene tvari.

Profili oslobađanja ekstrakata, odnosno antioksidacijskog kapaciteta, opisani su novim modelom izvedenim modificiranjem Higuchijevog kinetičkog modela.

7. LITERATURA

1.	URL: https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=69979 (pristup 30. 4. 2020.)
2.	A. Milićević, M. Gretić, G. Matijašić, 3D-tiskani oralni dozirni oblici punjeni disperzijom ulja i djelatne tvari, <i>Kem. Ind.</i> 68 (2019) 389-396
3.	S. J. Trenfield, A. Awad, A. Goyanes, S. Gaisford, A. W. Basit, 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Front-line Care, <i>Trends Pharmacol. Sci.</i> 39 (2018) 440-451
4.	D. Khong Tan, M. Maniruzzaman, A. Nokhodchi, Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery, <i>Pharmaceutics</i> 10 (2018) 203
5.	A. Melocchi, F. Parietti, G. Loreti, A. Maroni, A. Gazzaniga, L. Zema, 3D printing by fused deposition modeling (FDM) of a swellable/erodible capsular device for oral pulsatile release of drugs, <i>JDDST</i> 30 (2015) 1-8
6.	A.-M. Bandov, <i>Raspadljive tablete za usta</i> , diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
7.	H. Lokhandwala, A. Deshpande, S. Deshpande, Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: an overview, <i>IJPBS</i> 4 (2013) 728-737
8.	G. Singhvi, M. Singh, Review: In vitro drug release characterization models, <i>IJPSR</i> 2 (2011) 77-84
9.	URL: https://www.drugtopics.com/view/fda-safety-page-delayed-release-vs-extended-release-rxs (pristup 5. 7. 2020.)
10.	B. Rama, V. Sandhiya, M. Swetha, G. Rathnam, U. Ubaidulla, Pulsatile drug delivery: A comprehensive review, <i>IJPDT</i> 5 (2015) 125-130
11.	J. W. Wheless, S. J. Phelps, A Clinician's Guide to Oral Extended-Release Drug Delivery Systems in Epilepsy, <i>J. Pediatr. Pharmacol. Ther.</i> 23 (2018) 277-292
12.	J. Petanjek, <i>Utjecaj hidrodinamičkih uvjeta na brzinu otpuštanja djelatne tvari</i> , završni rad, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
13.	J.-Y. Goh, R. J. Weaver, L. Dixon, N. J. Platt, R. A. Roberts, Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980 – 2013, <i>Toxicol. Res.</i> 4 (2015) 1297-1307.
14.	A. Milićević, <i>Kinetički modeli u farmaceutskoj industriji</i> , završni rad, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
15.	U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1997, str. 8-11.
16.	Ph. Eur., 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms, <i>European Pharmacopoeia</i> 8, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, 2013, str. 288-295
17.	URL: https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-1-rotating-basket.html (pristup 1. 7. 2020.)
18.	URL: https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-2-paddle-test.html (pristup 1. 7. 2020.)

19.	T. S. Gaaz, A. B. Sulong, M. N. Akhtar, A. A. H. Kadhum, A. B. Mohamad, A. A. Al-Amiery, Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites, <i>Molecules</i> 20 (2015) 22833-47
20.	URL: https://www.mpbio.com/0215193883-polyvinyl-alcohol-cf (pristup 11. 5. 2020.)
21.	J. P. Veenstra, J. J. Johnson, Oregano (<i>Origanum vulgare</i>) extract for food preservation and improvement in gastrointestinal health, <i>Int. J. Nutr.</i> 3 (2019) 43-52
22.	D. Baricevic, T. Bartol, The biological/pharmacological activity of the <i>Salvia</i> genus, S. E. Kintzios, <i>Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles Vol 14</i> . Sage, The Genus <i>Salvia</i> , Overseas Publishers Association, Amsterdam, 2000, str. 143-184
23.	J. R. de Oliveira, S. E. A. Carmago, L. D. de Oliveira, <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent, <i>J. Biomed. Sci.</i> 26 (2019) 1-22
24.	O. Boruga, C. Jianu, C. Misca, I. Golet, A. T. Gruja, F. G. Horhat, <i>Thymus vulgaris</i> essential oil: chemical composition and antimicrobial activity, <i>J. Med. Life</i> 7 (2014) 56-60
25.	M. Then, K. Szentmihályi, Á. Sárközi, I. Szöllösi Varga, Examination on antioxidant activity in the greatercelandine (<i>Chelidonium majus</i> L.) extracts by FRAP method, <i>Acta Biologica Szegediensis</i> 47 (2003) 115-117
26.	A. Braca, N. De Tommasi, L. Di Bari, C. Pizza, M. Politi, I. Morelli, Antioxidant principles from <i>Bauhinia tarapotensis</i> , <i>J. Nat. Prod.</i> 64 (2001) 892-895
27.	W. Brandwilliams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, <i>LWT-Food Science and Technology</i> 28 (1995) 25-30
28.	E. Shortle, M. N. O'Grady, D. Gilroy, A. Furey, N. Quinn, J. P. Kerry, Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (<i>Crataegus monogyna</i>) extracts in bovine muscle homogenates, <i>Meat Sci.</i> 98 (2014) 828-834
29.	H. Lokhandwala, A. Deshpande, S. Deshpande, Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: An overview, <i>Int. J. Pharma Bio Sci.</i> 4 (2013) 728-737
30.	M. L. Bruschi, <i>Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems</i> , Woodhead Publishing Limited, 2015.
31.	J. Siepmanna, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug dissolution, <i>Int. J. Pharm.</i> 453 (2013) 12– 24