

Pannon Egyetem



**Funkcionális mikro- és nanorészecskék létrehozása
szférikus agglomerációval és emulziós módszerrel**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Fodorné Kardos Andrea
okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Feczko Tivadar
tudományos főmunkatárs

Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola
Anyagtudományok és technológiák alprogram

Veszprém

2023

1 Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban egyre fontosabb és égetőbb feladat az élet minden területén az új megoldások keresése mellett a már meglévő megoldások hatékonyabbá tétele, legyen szó akár a gyógyszerhatóanyagok kisebb mennyiségben, de célzott módon történő alkalmazásáról vagy a rendelkezésünkre álló energiaforrások hatékonyabb felhasználásáról. A hatékonyság növelés elérhető funkcionális részecskékkel, amelyek előállíthatók mikrokapszulázással.

A funkcionális részecskék olyan szilárd, gyakran kompozit részecskék, melyek alkalmazásuk során valamilyen aktív szerepet töltenek be, hatást gyakorolnak a környezetükre és a funkciójuknak megfelelő összetett struktúrájuk van.

A mikrokapszulázáshoz két különböző szemcseformálási/szemcséképzési módszert, a szférikus agglomerációt és az emulziós oldószer-elpárolgatásos technikákat választottuk. Míg a szférikus agglomerációval előállítható pár száz μm -es szemcsék gyógyszeripari és akár építőipari felhasználásra is alkalmasak lehetnek, addig az emulziós oldószer-elpárolgatásos módszer mellett, hogy vízzoldható és nem vízzoldható anyagok kapszulázására is alkalmas, mikro- és nanorészecskék létrehozására is megfelelő módszer.

Munkám során célul tűztem ki, hogy olyan nanoszerkezetű, kompozit szemcsét alakítsak ki humán szérum albumin modellanyagból szférikus agglomerációval, amely modellrendszere lehet a gyógyszerhatóanyag szemcséinek tablettában való alkalmazásához. Célom volt a választott modellanyagra a megfelelő oldószerrendszer kialakítása, és a lejátszódó mechanizmus tanulmányozása révén megfelelő szfericitással és gördülékenységgel rendelkező szemcsék előállítása.

Célul tűztük ki olyan módszerek kifejlesztését építőipari alkalmazáshoz, amelyekkel paraffin és sóhidrát alapú fázisváltó hőtároló anyag tartalmú mikrokapszulákat állíthatunk elő. Feladatomban volt ezért $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ sóhidrát szférikus agglomerációjával, olyan szférikus mag kialakítása, amely a későbbiekben vízzáró polimerhéjjal ellátva mag-héj szerkezetű mikrokapszulát eredményezhet.

Paraffin típusú, hexadekánt tartalmazó mag-héj szerkezetű mikrokapszulák előállítása volt a cél etil-cellulóz és poli(metil-metakrilát) polimerrel emulziós oldószer-elpárolgatásos technikával. Feladatomban volt mérésekkel igazolni, illetve magyarázni az

emulziós oldószer-elpárolgatatás során kialakuló szemcsemorfológiát és a kapszulák héjában tapasztalt porozitást az irodalomból ismert közelítések alapján.

Célom volt továbbá interferon-béta mikrokapszulázása szklerózis multiplex tüneteinek enyhítésére, amely szemcsékre elvárt eredményként fogalmaztuk meg, hogy 200 nm átlag méretnél kisebb, keskeny méreteloszlású, jó kapszulázási hatékonyságú (>80 %) nanokompozit részecskéket állítsunk elő. A hatóanyagleadást tekintve pedig minimum egy héten át képesek legyenek nyújtott IFN-béta leadást biztosítani humán vérplazmában in vitro körülmények között.

2 Alkalmazott kísérleti és vizsgálati módszerek

A funkcionális részecskék szférikus agglomerációval történő előállításához előkísérletekként oldhatóság vizsgálatokkal meghatároztam a választott oldószerrendszerekben a hatóanyagok és a kapszulázó polimerek fázisdiagramját. Mind a szférikus agglomerációval, mind az emulziós oldószer-elpárologtatásos technikával előállított mikroméretű szemcsék szemcseméret-eloszlását lézer diffrakció elvén alapuló Malvern 2000-es, a nanorészecskéket Zetasizer Nano ZS készülékkel határoztam meg. A szemcsék morfológiájának jellemzésére látható fénymikroszkópot és pásztázó elektronmikroszkópot használtam. A fázisfájtó hőtároló anyagként vizsgált timsó szférikus agglomerátumok fizikai tulajdonságait termogravimetriás és differenciális pásztázó kalorimetriás technikákkal jellemeztem. A különböző szférikus agglomerátumok közelítő összetételét egyrészt FTIR-rel, másrészt röntgendiffrakciós módszerrel határoztam meg.

Az egyszerű emulziós módszerrel előállított hexadékan tartalmú mikrokapszulák morfológiáját és a mikrokapszulák héjának porozitását felületi feszültség mérések és Torza és Mason¹ ill. Bolognesi² és munkatársai által leírt egyenletek alapján modelleztem.

A humán szérum albumin tartalmú kitozán-PSS polimer kapszulák fehérje tartalmának meghatározása Bradford módszerrel történt. Az interferon-béta tartalmú PLGA és PEG_PLGA nanoszemcsék marha szérum albumin ill. interferon-béta tartalmát és in vitro leadási kinetikáját micro BCA és ELISA teszt segítségével mértem.

¹ Torza, S.; Mason, S. G. Three-phase interactions in shear and electrical fields. *Journal of Colloid and Interface Science* (1970) **33**(1), 67-83. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(70\)90073-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(70)90073-1)

² Bolognesi, A.; Mercogliano, C.; Yunus, S.; Civardi, M.; Comoretto, D.; Turturro, A. Self-Organization of Polystyrenes into Ordered Microstructured Films and Their Replication by Soft Lithography. *Langmuir* (2005) **21**(8), 3480-3485. <https://doi.org/10.1021/la047427u>

3 Új tudományos eredmények

Tézisek

- 1) a. Kidolgoztam egy olyan, a klasszikustól eltérő, szférikus agglomerációs módszert nanoszerkezetű szemcsék előállítására, amely alkalmas új, vízdíjható fehérje típusú gyógyszer (természetes interferon) kitozán és nátrium-polisztirol-szulfonát polimerekbe való kapszulázására. A folyamatban oldószercserés és kémiai precipitáció kombinációja játszódik le. A módszer megvalósításához nincs szükség sem felületaktív anyag jelenlétére, sem hőmérséklet különbség alkalmazására.
- 1 b. Meghatároztam a 10–15% (V/V) EtOH és 65–70% (V/V) EtOAc mennyiség által leírt szűk összetétel tartományt a vízzel alkotott oldószerek hármára nézve, ahol a kiindulási kétfázisú elegyből kiindulva etanol, ill. etanol–etil-acetát elegy hozzáadásával szférikus agglomerátumokat kaptam. Kísérletileg igazoltam, hogy a folyamat részlépéseiben kialakuló oldószerek összetételek jelentős hatással vannak a kialakuló agglomerátumok morfológiájára.
- 2) Kétféle, szférikus agglomerációs, illetve emulziós oldószerek-diffúziós módszerrel sikerült $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ szférikus agglomerátumait előállítani.
Szférikus agglomerációs mechanizmussal nem teljesen szférikus és kevésbé stabil, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -ként azonosítható agglomerátumok állíthatók elő.
Emulziós oldószerek-diffúziós mechanizmussal stabilabb, és szinte tökéletesen gömb alakú agglomerátumok képződnek, azonban összetételüket tekintve nem tisztán 12 kristályvizes timsót tartalmaznak. A timsón kívül további 4 kristályos só mutatható ki: rostit ($\text{Al}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), alunogen ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 17\text{H}_2\text{O}$), vízmentes $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ és vízmentes K_2SO_4 .
A különböző átlagos kristályvíz-, ill. timsótartalmú mintáknak a vízvesztésük és a megolvadásuk során mérhető hő mennyisége arányos a kristályvíz-, ill. timsótartalommal.

- 3) Megállapítottam, hogy n-hexadékan fázisváltó hőtároló anyagot tartalmazó poli(metil-metakrilát) és etil-cellulóz hordozó polimerekkel, emulziós oldószer-elpárologtatásos módszerrel, polivinil-alkohol vagy Tween80 emulgeátorok alkalmazása mellett, létrehozott mikrokapszulák a szétterülési együtthatók alapján nem érik el az egyensúlyi morfológiájukat. Az eltérő emulgeátor oldatok hatására kialakuló különböző felületi feszültség viszonyok a mag-héj szerkezet mellett a különböző mértékű porozításban mutatkoznak meg.
- 4) Sikerrel állítottam elő humán interferon-béta hatóanyagot tartalmazó (poli(tejsav-glikolsav) és (poli(tejsav-glikolsav)-polietilén-glikol nanorészecskéket 80–90% kapszulázási hatékonysággal és térfogati átlag szerinti 160–170 nm-es átlagos szemcsemérettel. A nanorészecskék legalább egy héten át képesek voltak nyújtott interferon-béta hatóanyagleadást biztosítani humán vérplazmában in vitro körülmények között. Az interferon-béta hordozó nanorészecskék in vitro citotoxicitási vizsgálatokban nem mutattak citotoxicitást, azonban az in vivo kísérletekben a kétféle polimerrel készült nanorészecskék enyhe toxicitást váltottak ki a vesékben.

4 Publikációk (A dolgozat alapját képező cikkek)

Cikk referált nemzetközi folyóiratban

1. **Andrea Fodor-Kardos**, Ádám Ferenc Kiss, Katalin Monostory and Tivadar Feczko, Sustained in vitro interferon-beta release and in vivo toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanoparticles, RSC Advances, 10, 27, (15893-15900), (2020) doi: 10.1039/C9RA09928J, Impakt faktor: 3,049 (2019) (Q1)
2. **Kardos, AF**; Toth, J (Toth, Judit); Trif, L (Trif, Laszlo); Gyenis, J (Gyenys, Janos); Feczko, T (Feczko, Tivadar) Preparation of spherical agglomerates from potash alum, RSC Advances Volume: 6 Issue: 7 Pages: 5466-5473 (2016) doi: 10.1039/c5ra18497e Impakt faktor: 3,228, (Q1)
3. **Fodor-Kardos, A**; Toth, J (Toth, Judit); Gyenis, J (Gyenys, Janos) Preparation of protein loaded chitosan microparticles by combined precipitation and spherical agglomeration Powder technology, Volume: 244 Pages: 16-25 (2013) DOI: 10.1016/j.powtec.2013.03.052 Impakt factor: 2,64 (Q1)

A dolgozat alapját képező társszerzős cikk:

4. Feczko, T (Feczko, Tivadar); **Kardos, AF**; Nemeth, B (Nemeth, Bence); Trif, L (Trif, Laszlo); Gyenis, J (Gyenys, Janos), Microencapsulation of n-hexadecane phase change material by ethyl cellulose polymer Polymer bulletin, Volume: 71 Issue: 12 Pages: 3289-3304 (2014) DOI: 10.1007/s00289-014-1250-y Impakt factor: 1,33

Előadás magyar nyelven teljes szöveges megjelenéssel:

1. **Fodorné, Kardos A**; Tóth, J; Hasznosné, Nezdei M, Szférikus agglomeráció háromkomponensű oldószerkeletben, In: Nagy, Endre; Simon, Ferenc; Kiss, Katalin; Hegedűs, Imre (szerk.) Műszaki Kémiai Napok '08 = Conference of Chemical Engineering: conference proceedings, Veszprém, Magyarország: MTA VEAB, Veszprémi Egyetemi Kiadó, (2008) pp. 245-249. , 5 p.
2. **Fodorné Kardos Andrea**, Feczko Tivadar, Szabályozott hatóanyagleadású biokompatibilis és biológiailag lebontható interferon-béta tartalmú kompozit részecskék fejlesztése, MŰSZAKI KÉMIAI NAPOK 2017, Veszprém, 2017. április 25-27.

Poszter idegen nyelven

Első szerzőként:

1. **Fodor-Kardos, A** ; Tóth, J ; Hasznos-Nezdei, M, Precipitation of HSA loaded microspheres in a polymeric spherical crystallization system pp. 1-4.,In: Anon (szerk.) 6th World Congress on Particle Technology, Nürnberg, Németország : Nürnberger Messe- und Ausstellungsgesellschaft, (2010)

Idegen nyelven tartott előadás teljes szöveges megjelenéssel

1. **Fodor-Kardos, A** ; Feczkó, T, Preparation of interferon-beta loaded PLGA and PEG-PLGA nanoparticles ,In: 5th international symposium on reliable flow of particulate solids 2017, Skien Norway, (2017) pp. 1-6. Paper: 8A1 , 6 p.
2. **Andrea Fodor-Kardos**, János Gyenis, Preparation of potash alum PCM core by spherical agglomeration, The MacroJournals Conference on Medicine, Science, and Technology – Dubrovnik 2014, August 4-5th, 2014