

Formulering og fremstilling av fluorholdige nanopartikler for bruk i munnhulen

Masteroppgave i galenisk farmasi

Camila Nhu Quynh Bui



Avdeling for farmasi
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2017

Formulering og fremstilling av fluorholdige nanopartikler for bruk i munnhulen

Av

Camila Nhu Quynh Bui

Veiledere:

Marianne Hiorth

Gro Smistad

Sanko Nguyen

Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitet i Oslo

Juni 2017

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden juni 2016 til mai 2017.

Først og fremst vil jeg takke mine hovedveiledere professor Marianne Hiorth og professor Gro Smistad for god veiledning og oppfølging gjennom hele arbeidet med oppgaven. Deres engasjement og entusiasme var en inspirasjon for meg.

En spesiell takk til postdoktor Sanko Nguyen for gode råd, nyttige innspill og for at du alltid fant tid til å svare på spørsmålene mine. Jeg er også takknemlig for Helene Jonassens engasjement.

Jeg vil også takke overingeniør Tove Larsen for gode råd og hjelp med praktiske utfordringer på lab.

Jeg er til slutt takknemlig for all støtte og oppmuntring som min familie og mine venner har vist. En stor takk til min samboer, Tomas, for støtte, tålmodighet og forståelse gjennom hele studiet.

Oslo, mai 2017

Camila Bui

Sammendrag

Fluorholdige preparater som tannkrem, munnskyllevæske og tabletter benyttes for å forebygge og behandle karies og erosjon. En utfordring med slike preparater er lav oppholdstid i munnhulen som følge av spyttsekresjon og svelging og dermed utilstrekkelig terapeutisk effekt. Nanopartikler basert på biopolymerer med innkapslet tinnfluorid kan være en egnet legemiddelformulering for å bruke i karies- og erosjonsprofylakse. I denne oppgaven ble det fremstilt nanopartikler basert på biopolymerer med negativ ladning (pektin) og positiv ladning (kitosan) via ionisk kryssbinding med kryssbindere av motsatt ladning (sink eller tripolyfosfat). Det ble fremstilt 8 ulike formuleringer med amidert lavmetoksylert (AM) pektin og kryssbinderen sink i en konstant ratio 85:15 (w/w), og SnF_2 ble forsøkt innkapslet ved hjelp av ulike startkonsentrasjoner av dette stoffet. Formuleringer basert på kitosan og TPP 80:20 (w/w) med ulike startkonsentrasjoner av SnF_2 ble fremstilt i totalt 5 forskjellige formuleringer. Karakterisering av formuleringene med hensyn til gjennomsnittlig partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks (PDI) og pH ble utført og en evaluering av disse resultatene avgjorde hvilken formulering som ble benyttet videre i oppgaven.

Nanopartiklene med 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF_2 var mest lovende med hensyn til partikkelstørrelse (50-80 nm), og PDI (0,1-0,2). Det ble forsøkt å forbedre stabiliteten av denne formuleringen ytterligere ved å fjerne ikke-innkapslet SnF_2 med gelfiltrering og eluering med 0,05 M NaCl. Lagringsstabiliteten av de gelfiltrerte nanopartiklene ble undersøkt ved å måle endringer i partikkelstørrelse, PDI og pH over en tidsperiode på i underkant av 3 uker. De gelfiltrerte nanopartiklene holdt en relativ stabil partikkelstørrelse og PDI i ca. en uke. Etter en uke tydet resultatene på dannelse av nye strukturer og aggregater.

De gelfiltrerte nanopartiklenes evne til adsorpsjon til hydroksyapatitt-pulver (HA) ble undersøkt ved hjelp av kitosan merket med fluorescensmarkøren fluorescein isothiocyanat (FITC). Resultatene viste lavere fluorescensintensitet i supernatanten ved høyere konsentrasjon av HA og at andel nanopartikler som adsorberte til HA dermed var avhengig av mengden HA tilstede.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.2	Hensikt med oppgaven.....	3
1.3	Forkortelser	4
2	Teori.....	5
2.1	Karies	5
2.2	Dental erosjon	6
2.3	Behandling og forebygging av karies og erosjon.....	7
2.4	Nanopartikler	9
2.5	Biopolymerer.....	12
2.5.1	Kitosan	12
2.5.2	Pektin.....	13
2.6	Tinnfluorid	14
2.7	Karakterisering av nanopartikler	15
3	Materialer og instrumenter.....	17
3.1	Materialer	17
3.1.1	Polymerer	17
3.1.2	Virkestoff.....	17
3.1.3	Andre kjemikalier.....	17
3.2	Løsninger	18
3.3	Instrumenter og utstyr	21
3.3.1	Produksjon av nanopartikler	21
3.3.2	Måling av partikkelstørrelse og zetapotensial.....	21
3.3.3	Diverse	22
4	Metoder	23
4.1	Fremstilling av nanopartikler.....	23
4.2	Karakterisering	24

4.2.1	Måling av partikkelstørrelse og PDI.....	24
4.2.2	Måling av zetapotensiale og konduktivitet	25
4.2.3	Måling av pH.....	26
4.3	Fjerning av ikke-innkapslet tinnfluorid ved gelfiltrering.....	26
4.4	Adsorpsjon til hydroksyapatitt (HA)-pulver.....	27
4.4.1	Hydrering av hydroksyapatitt-pulver	27
4.4.2	Adsorpsjonseksperiment.....	27
4.4.3	Estimering av mengde fluorescerende nanopartikler adsorbert til hydroksyapatitt	29
5	Forsøksoppsett.....	31
5.1	Utvikling av formulering	31
5.2	Forbedring av stabilitet	32
5.3	Adsorpsjon av nanopartikler til hydroksyapatitt (HA).....	33
6	Resultater	34
6.1	Utvikling av formulering	34
6.1.1	Nanopartikler basert på AM-pektin	34
6.1.2	Nanopartikler basert på kitosan.....	41
6.2	Forbedring av stabilitet	45
6.2.1	Nanopartikler basert på kitosan.....	45
6.2.2	Stabilitetsstudier	52
6.3	Adsorpsjon av nanopartikler til hydroksyapatitt (HA).....	60
7	Diskusjon.....	65
7.1	Utvikling av formulering	65
7.2	Forbedring av stabilitet	69
7.3	Adsorpsjon av nanopartikler til HA.....	72
8	Konklusjon	75
	Litteraturliste	76

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Karies og erosjon er en av de mest forekommende tannsykdommene i dagens samfunn, og utgjør et stort folkehelseproblem globalt (Selwitz, Ismail et al. 2007, Wiegand, Young et al. 2012, Petersen and Ogawa 2016). Det er vist at god tannhelse spiller en avgjørende rolle for livskvaliteten, og at det er en sammenheng mellom utvikling av andre sykdommer ved tilstedeværelse av tannsykdommer. Sykdommer generelt kan også bidra til en svekket tannhelse. Forekomsten av karies har vært lav opp gjennom årene grunnet økt eksponering av fluor og økt informasjon om god tannhygiene. Det er likevel fortsatt utfordringer ved tannsykdommen, og i følge World Health Organization (WHO) er 60-90 % av barn i skolealder og majoriteten av voksne fortsatt rammet av karies (World Health Organization 2003). Omfanget av erosjon har økt de siste årene som følge av økt inntak av sure drikker. I tillegg vil ulike livsstilsrelaterte sykdommer som for eksempel refluks eller oppkast føre til at surt mageinnhold utsetter tennene for kjemisk påvirkning (Johansson 2007).

Karies er en tannsykdom som skyldes primært at kariogene bakterier i plakk produserer svake organiske syrer via metabolisme av sukker og karbohydrater fra matinntak (Featherstone 2008). I motsetning til karies, er ikke bakterier involvert i utviklingen av erosjon som oppstår på tannflater som ikke har bakteriebelegg (Johansson 2007). Hos begge tannsykdommene vil syreangrep fra enten fra bakterier eller eksterne kilder over tid føre til en demineralisering av tannemaljen, og dersom tilstanden forblir ubehandlet vil dette til slutt utvikle seg til tannrøte. Kalsium og fosfat tilstede i spyttsekresjonen kan motvirke demineraliseringsprosessen. Tilførsel av fluor kan forsterke remineralisering av tannemaljen ytterligere ved at det virker som en katalysator for tilførsel av kalsium og fosfat til tennene (Featherstone 2004, Selwitz, Ismail et al. 2007, Ricketts, Chadwick et al. 2011). En utfordring ved bruk av fluorholdige produkter som tannkrem, munnskyllevæske og tyggetabletter er kort oppholdstid i munnhulen som følge av spyttsekresjon. Den terapeutiske effekten av disse preparatene er lav på grunn av kort kontakttid mellom fluor og tennene, samtidig som en stor andel av dosen svelges eller fortynnes med spyttet (Nguyen 2015).

Bruk av nanopartikulære legemiddelsystemer er en mulighet for å løse disse utfordringene. Bioadhesive nanopartikler med innkapslet fluor kan modifiseres slik at man oppnår økt

kontakttid mellom tenner og fluor. Frisettingshastigheten av innkapslet virkestoff kan også justeres slik at nanopartiklene frisetter fluor ved et eventuelt pH-fall (Nguyen 2015). I motsetning til konvensjonelle fluorholdige preparater, kan disse egenskapene forlenge oppholdstiden av fluor i munnhulen slik at eventuelle syreangrep forhindres. Dette vil bidra til en forbedret terapeutisk effekt av fluorholdige preparater, og dermed forebygge utvikling av karies og erosjon.

1.2 Hensikt med oppgaven

Det overordnede målet med denne oppgaven var å fremstille bioadhesive nanopartikler basert på biopolymerer med innkapslet tinnfluor (SnF_2) for mulig bruk i kariesprofylakse.

Første delmål av oppgaven var å utvikle stabile nanopartikler med innkapslet SnF_2 basert på biopolymerer med ulik ladning via ionisk kryssbinding med kryssbindere av motsatt ladning. UlikPektin ble valgt som negativ polymer og kryssbundet med sink. Kitosan ble valgt som positiv polymer og kryssbundet med natriumtripolyfosfat (TPP).

In vitro stabiliteten av formuleringene under lagring i kjøleskap ble evaluert ved å måle størrelse, PDI og pH over en tidsperiode.

Andre delmål av oppgaven var å undersøke den mest stabile formuleringens evne til å adsorbere til hydroksyapatitt (HA). Dette skulle gi en indikasjon på nanopartiklenes evne til å adsorbere til tenner, da HA er en del av tennenes sammensetning.

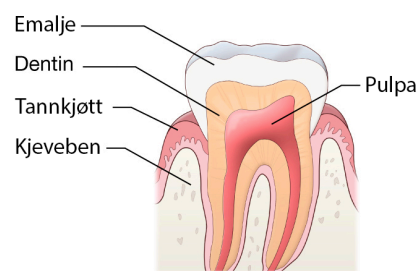
1.3 Forkortelser

AM	Amidert metoksyl
FITC	Fluorescein isothiocyant
HA	Hydrokxyapatitt
PDI	Polydispersity Index (polydispersitetsindeks)
rpm	Rounds per minute (omdreiningshastighet)
TPP	Natriumtripolyfosfat

2 Teori

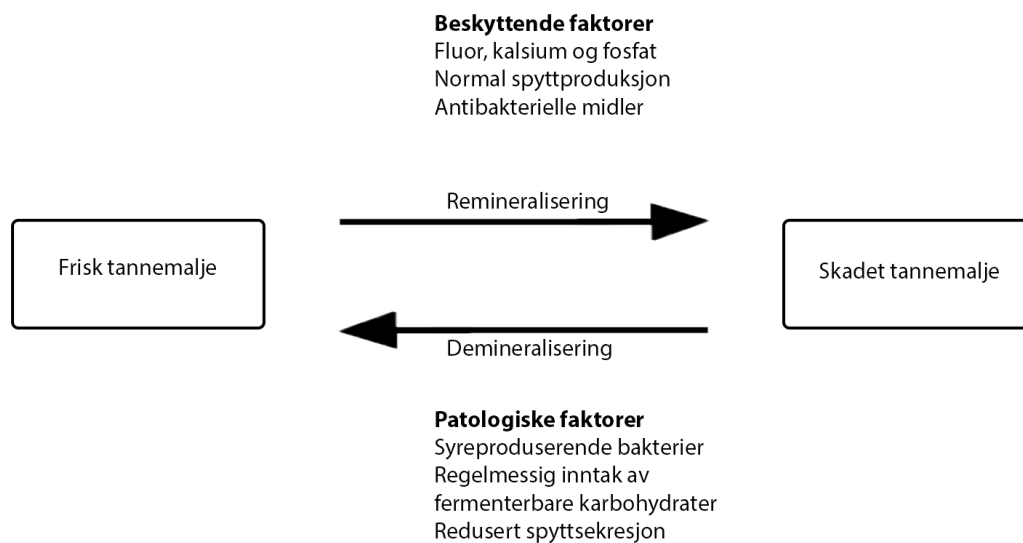
2.1 Karies

Karies er en sammensatt tannsykdom som avhenger av flere faktorer. Figur 2-1 viser en oversikt over tannens oppbygging og de berørte delene ved karies. Tannsykdommen oppstår via en kompleks interaksjon over tid mellom syreproduserende bakterier og fermenterbare karbohydrater. I tillegg spiller sekresjonen av spytt og sammensetningen av spytt en stor rolle for utviklingen av sykdommen. Karies forekommer når biofilm dannet av bakterier akkumuleres på tannoverflaten. Tannvevet demineraliseres når kariogene bakterier i biofilmen omdanner sukkersubstrater fra kosten om til organiske syrer som bryter ned mineraler i tannemaljen og dentin (Selwitz, Ismail et al. 2007, Featherstone 2008, Ricketts, Chadwick et al. 2011).



Figur 2-1: Illustrasjon av en tann. Figur bearbeidet fra (PubMed Health 2017).

Utviklingen av karies påvirkes av balansen mellom demineralisering og remineralisering. Denne prosessen foregår kontinuerlig, men over tid vil prosessen enten bli forskjøvet eller forbli vedlikeholdt slik tilstanden er (Selwitz, Ismail et al. 2007). Dersom demineraliseringsprosessen utvikler seg, vil det etterhvert oppstå hull i tannen. Det er mulig å reversere demineralisering, men en remineralisering vil avhenge av kalsium- og fosfationer tilstede i spyttet. Sekresjonen av spytt virker som en buffer mot syrene som dannes, i tillegg til at kalsium og fosfat i spyttet forhindrer demineralisering og fremmer remineralisering (Featherstone 2008). Figur 2-2 illustrerer balansen mellom demineralisering og remineralisering.



Figur 2-2: Kariesprosessen avhenger av patologiske og beskyttende faktorer. Bearbeidet fra (Selwitz, Ismail et al. 2007, Featherstone 2008)

2.2 Dental erosjon

Erosjon kjennetegnes av oppløsning av tannens hovedkomponent, hydroksyapatitt (HA) og dermed oppløsning av tannemaljen (West, Hooper et al. 2012). I motsetning til karies, forekommer erosjon uten tilstedeværelse av bakterier. Erosjon dannes på tannflater uten bakteriebelegg som følge av syreangrep fra kilder som sure matvarer og drikker. Magesyre som er i kontakt med tenner som følge av reflukssykdom eller oppkast kan også medføre erosjonsskader på tannemaljen. Syreangrep i kombinasjon med redusert tilførsel av hydroksyl- og fluorapatitt i spytt medfører tap av tannsubstans lag for lag (Johansson 2007). Inntak av matvarer og drikker som har en lavere pH enn 5,5 vil føre til oppløsning av hydroksyapatitt på tannemaljen, mens produkter som har en lavere pH enn 4,5 vil medføre oppløsning av fluorapatitt. Over tid vil en progressiv utvikling av erosjon kan føre til at dypere lag av tennene eksponeres. Dersom dentin og i verste fall pulpa eksponeres (figur 2-1), kan dette føre til at økt hypersensitivitet og dermed muligens smerter i tenner, ansikt og nakke (Kuchta and Szymańska 2014).

2.3 Behandling og forebygging av karies og erosjon

Karies

For å forebygge karies og motvirke demineralisering av tannemaljen, kan man bruke tannprodukter som inneholder fluor. Forskning viser at fluor er det mest effektive virkemiddelet mot karies, og at man oppnår tilstrekkelig forebygging ved regelmessig tilførsel av små mengder med fluor i munnhulen (World Health Organization 2003, Petersen and Lennon 2004, Petersen and Ogawa 2016). Fluor bidrar til å øke diffusjonen av kalsium- og fosfationer i spytt tilbake til tennene og vil dermed forsterke remineraliseringsprosessen. Fluor kan også binde seg direkte til tannoverflaten, og hemme demineralisering (Featherstone 2008). Tannemaljen beskyttes når fluor reagerer med tannens hovedkomponent, hydroksyapatitt (HA). Det vil da dannes fluorapatitt eller fluoridert hydroksyapatitt som beskytter mot nedbrytning av tannemaljen og syreangrep. De remineraliserte krystallene er mer syrer resistente, og mindre oppløselig enn de opprinnelige krystallmineralene (Selwitz, Ismail et al. 2007, Featherstone 2008). En nyere hypotese viser derimot at den kariesforebyggende effekten av fluorider muligens er et resultat av kalsiumfluorid (CaF_2) som dannes på tannoverflaten ved demineralisering. Ved demineralisering vil organiske syrer som produseres av kariogene bakterier føre til at fosfationer løses opp og diffundere fra tannstrukturen. Tilførsel av fluor vil føre til at fluorionene binder seg til kalsiumionene som eksponeres på tannoverflaten og danne stabil CaF_2 . Dette beskyttende laget av CaF_2 vil forsegle tannoverflaten og forhindre en videre utvikling av demineraliseringsprosessen (Rölla, Vik et al. 2011).

Dental erosjon

To mekanismer har blitt foreslått for effekten av fluor i forbindelse med forebygging av erosjon. Den første mekanismen viser til hypotesen som er foreslått for den kariesforebyggende effekten av fluorider, og at det mest sannsynlig er dannelsen av CaF_2 på tannoverflaten (Saxegaard, Lagerlöf et al. 1988, Ganss, Klimek et al. 2004, Rölla, Vik et al. 2011). Den andre mekanismen som er blitt foreslått er effekten av metallfluorider (for eksempel SnF_2) som danner et lag på tannflaten som er mer syrer resistent og muligens forhindrer utvikling av erosjon (Ganss, Hardt et al. 2010, Rölla, Vik et al. 2011). Begge mekanismene gir derimot kortvarige effekter som følge av konstant spyttsekresjon.

Fluorholdige preparater med sure metallioner

Fluorholdige preparater har vist å redusere karies med 30-70 % sammenlignet med ingen fluorbehandling (Selwitz, Ismail et al. 2007). Fluorforbindelser kan deles inn i tre hovedkategorier: uorganiske forbindelser, forbindelser som inneholder monofluorfosfat, og organiske forbindelser. De fleste fluorholdige preparater som er på markedet i dag består av uorganiske fluorforbindelser som er lettløselige saltforbindelser. I denne gruppen finner vi natriumfluorid (NaF), tinnfluorid (SnF_2), ammoniumfluorid (NH_4F) og titanium tetrafluorid (TiF_4), og det er hovedsakelig NaF som benyttes i størst grad (Pessan, Toumba et al. 2011).

SnF_2 har i enkelte studier fått økt oppmerksomhet som et lovende virkestoff mot karies og erosjon (Shannon and Edmonds 1979, Beiswanger, Mercer et al. 1980, Rölla, Vik et al. 2011, Schlueter, Klimek et al. 2014). Metallene i SnF_2 er kompleksdannere og vil danne tinnhydroksider ($\text{Sn}(\text{OH})_2$) ved kontakt med vann siden metallene har en sterk affinitet for hydroksylgrupper. Samtidig vil fluorioner (F^-) frigis når tinnfluorid er i løsning, noe som fører til at pH synker. Fluoridionene vil danne hydrogenfluorid (HF) og bidra til dannelsen av CaF_2 på tannoverflaten. Ved denne reaksjonen er pH rundt 2-3 som følge av et overskudd av protoner ved dannelse av $\text{Sn}(\text{OH})_2$, og CaF_2 vil derfor også være stabilt i dette pH-området. Dette bidrar til å forhindre videre utvikling av karies og erosjoner i surt miljø. Det er foreslått at en vandig løsning av NaF vil danne mindre HF ved lav pH og dermed ikke ha effekt mot tannerosjon. Dette skyldes mest trolig av forskjeller i elektronegativitet mellom Na^+ og H^+ slik at fluorid har en høyere affinitet for Na^+ (Rölla, Vik et al. 2011).

Det er blitt påvist at tannkrem som inneholder tinn (Sn^{2+}) kan redusere tap av tannemaljen med 26-37% (Huysmans, Jager et al. 2011, Schlueter, Klimek et al. 2014). Både F^- og Sn^{2+} -ioner har i tillegg vist å ha antimikrobielle effekter og vil dermed hemme effekten av syreproduserende bakterier som *Streptococcus mutans* og *Lactobacillus* i biofilm (Featherstone 2008, Pessan, Toumba et al. 2011). Både *in vitro* og *in situ* studier har vist at formuleringer med biopolymeren kitosan og Sn^{2+} har en bedre beskyttende effekt på tannemaljen sammenlignet med formuleringer som består av kitosan og NaF (Schlueter, Klimek et al. 2013). Kitosan er i tillegg ladet ved lave pH-verdier ($\text{pK}_a \approx 6-7$), og kan muligens adsorberes til tannemaljen som har et negativt zetapotensial (Young, Smistad et al. 1997, Thanou, Verhoef et al. 2001). Kombinasjonen av kitosan og Sn^{2+} i formuleringer kan dermed bidra til å danne et beskyttende lag på tannoverflaten (Ganss, Klimek et al. 2014).

Det er likevel enkelte ulemper ved bruk av SnF_2 i formuleringer til bruk i munnhulen. En utfordring er at formuleringer som består av SnF_2 kan forårsake misfarging av tenner (West, Hooper et al. 2012). Behandling av tannemalje og dentin med metallfluoridet SnF_2 har likevel potensial siden det bidrar til å danne CaF_2 ved pH 2-3. CaF_2 som dannes på tannoverflater som er utsatt for erosjon og karies vil selv være stabilt ved dette pH-nivået og bidra til å forhindre videre utvikling av tannsykdommene (Rölla, Vik et al. 2011).

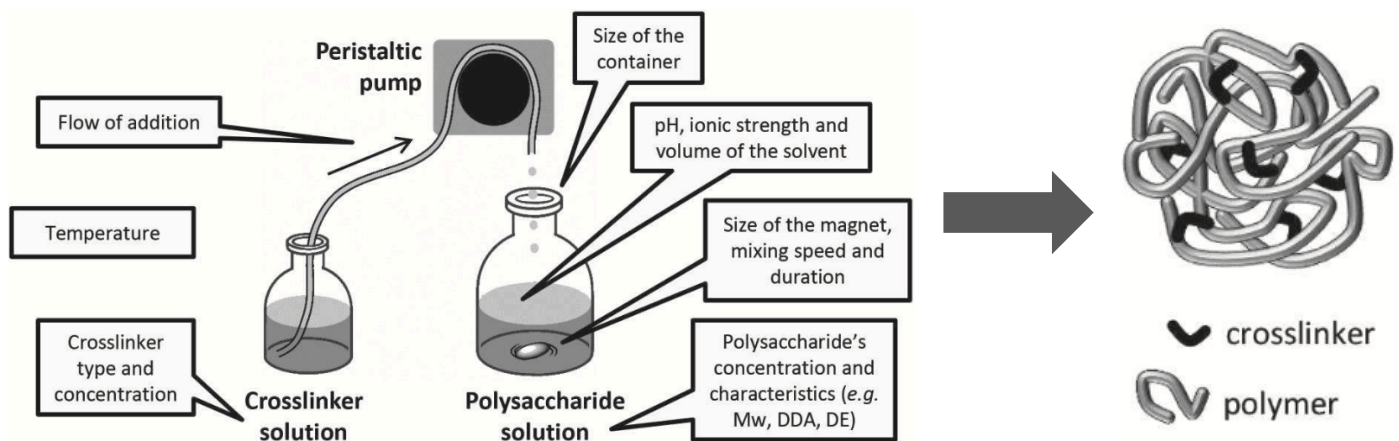
I denne oppgaven har fokuset vært på å utvikle en formulering med nanopartikler som leveringssystem av SnF_2 til bruk for beskyttelse av tenner. Anvendelse av nanopartikulære formuleringer basert på bioadhesive polymerer kan øke effekten av virkestoffet siden man forlenger tiden det er i kontakt med tennene. Dette kan også være med å redusere doseringshyppigheten. Nanopartikulære systemer kan inkorporeres i velkjente doseringsformer som munnskyllevann eller tannkrem som er lett å selv-administrere for pasienten og dermed gi økt etterlevelse.

2.4 Nanopartikler

Nanopartikler er kolloidale solide partikler som varierer i størrelse mellom 1 til 1000 nm. Legemiddelet kan enten være oppløst, innkapslet eller bundet til nanopartikkelens overflate (Kumari, Yadav et al. 2010, Mitra, Lee et al. 2013). Nanopartikler kan fremstilles av forskjellige stoffer og deles inn ulike kategorier ut i fra fremstillingsmaterialene: dendrimerer, liposomer, miceller, nanokrystaller, og polymere nanopartikler (Colson and Grinstaff 2012). Bruken av disse nanopartikulære legemiddelsystemene til bruk i munnhulen har blitt undersøkt, og har de siste årene fått økt oppmerksomhet i forbindelse med forebygging og behandling av ulike sykdommer i munnhulen (Ozak and Ozkan 2013). I denne oppgaven har det blitt forsøkt å fremstille polymere nanopartikler basert på naturlige polymerer som kitosan og pektin.

Polymere nanopartikler kan bestå av nanosfærer eller nanokapsler. Nanosfærer består av en matriks der legemiddelet er fordelt i polymeren eller adsorbert på overflaten, mens nanokapsler består av en kjerne der legemiddelet er innkapslet med en polymer membran rundt (Singh 2011, Tovsen 2013). Polymere nanopartikler kan fremstilles av biopolymerer via ionisk kryssbinding, kovalent binding, polyelektrolytte komplekser og selvorganisering

(self assembly) (Liu, Jiao et al. 2008). Det har tidligere blitt fremstilt vellykkede biopolymere nanopartikler via ionisk kryssbinding (Agnihotri, Mallikarjuna et al. 2004, Jonassen 2014, Nguyen, Escudero et al. 2017, Pistone, Goycoolea et al. 2017). Ved ionisk kryssbinding blir nanopartiklene fremstilt under kontrollerte forhold. Metoden utføres under milde forhold og er forholdsvis enkel og rask å utføre. Ionisk kryssbinding baseres på elektrostatiske interaksjoner mellom en biopolymer og en kryssbinder med motsatt ladning. En kryssbinder-løsning tilføres til en fortynnet biopolymer-løsning, og nanopartikler vil spontant dannes når kryssbinder-polymer-løsningen er under omrøring som følge av kryssbinderen induserer gelning av løsningen (figur 2-3). Nanopartiklenes egenskaper kan påvirkes ved å justere ulike parametere som omdreiningshastighet på peristaltisk pumpe, magnetstørrelse, røreastighet og hvor lenge polymerløsningen er under omrøring (Liu, Jiao et al. 2008, Pistone 2016).



Figur 2-3: Skjematisk illustrasjon av fremstilling av biopolymere nanopartikler via ionisk kryssbinding. Tekstboksene viser parametere som kan justeres under tillaging og som kan påvirke nanopartiklenes egenskaper. Figur bearbeidet fra Pistone 2016.

Man kan oppnå nanopartikulære legemiddelsystemer med ønskede egenskaper ved å modifisere parametere som partikkelstørrelse, overflatespenning, overflateegenskaper og graden av hydrofobisitet. De viktigste faktorene er derimot størrelse og størrelsesdistribusjonen av nanopartiklene. Interaksjonen mellom nanopartikler og cellemembran avhenger av disse faktorene, og avgjør om det er mulig å penetrere ulike biologiske barrierer og vev. Overflatespenningen spiller en stor rolle for nanopartiklenes evne til å akkumulere ved et bestemt målorgan. Avhengig av om overflatespenningen er kationisk eller anionisk, vil nanopartiklene enten interagere med celler med motsatt ladning eller akkumuleres i blodstrømmen (Brannon-Peppas and Blanchette 2012).

Det dynamiske og komplekse miljøet i munnhulen er utfordrende for fluorholdige preparater som administreres oralt. Konstant spyttsekresjon bidrar til å fortynne virkestoffet og en stor andel av preparatet svelges. I tillegg fører spyttsekresjonen til kort oppholdstid i munnhulen og begrenset kontakttid av fluorholdige preparater i munnhulen. Noen av utfordringene ved bruk av legemidler i munnhulen kan muligens forbedres ved bruk av nanopartikulære legemiddelsystemer. Formuleringer basert på nanopartikler av naturlige polymerer har bioadhese egenskaper og kan bidra til å forlenge oppholdstiden i munnhulen for et legemiddel. Andre fordeler ved bruk av nanopartikulære legemiddelsystemer for munnhulen er muligheten til å oppnå en mer kontrollert frisetting av legemiddelet og målstyrt administrering. Polymere nanopartikler kan i tillegg beskytte legemiddelet mot enzymatisk eller sur degradering. Størrelsen til nanopartikler øker også sjansen for en forbedret distribusjon av legemiddelet siden det lettere dekker tannoverflater (Kumari, Yadav et al. 2010, Mitra, Lee et al. 2013, Pistone 2016).

Noen av begrensningene ved bruk av polymere nanopartikler er derimot faren for aggregatdannelse som følge av liten partikkelstørrelse og stor partikkeloverflate. I tillegg er det begrenset hvor mye legemiddel som kan inkorporeres i polymere nanopartikler (Mitra, Lee et al. 2013). Stabiliteten av polymere nanopartikler er også utfordrende med tanke på elektrostatiske interaksjoner. Figur 2-4 viser de mest vanligste årsakene knyttet til ustabilitet for polymere nanopartikler. Aggregering av nanopartikler kan forekomme som følge av at den elektrostatiske frastøtningen mellom nanopartikler reduseres. Dette skjer ofte ved tilsetning av monovalente eller divalente salter i polymerløsningen som vil skjerme ladningen til ioniserte polymerkjeder. Disintegrering er et annet problem og kan forekomme når elektrostatiske bindinger mellom polymer og kryssbinder brytes. Andre utfordringer med polymere nanopartikler er at de kan swelle eller krympe. Dette forekommer ofte i forbindelse med endringer av overflatespenningen av nanopartiklene (Pistone 2016).



Figur 2-4: Potensielle årsaker til ustabilitet for polymere nanopartikler som følge av elektrostatiske interaksjoner. Figur bearbeidet fra Pistone 2016.

2.5 Biopolymerer

Biopolymerer er en fellesbetegnelse på polymerer som inngår i bestanddeler av levende organismer. I farmasøytiske formuleringer anvender man helst biopolymerer som er biodegraderbare, biokompatible og har lav toksisitet. De største fordelene ved bruk av biodegraderbare polymerer er at man oppnår større kontroll i forhold til økt biotilgjengelighet, retensjonstid og løselighet. Andre fordeler er målstyrt legemiddelbruk og dermed økt terapeutisk effekt av legemiddelet. I tillegg unngår man for tidlig nedbrytning og interaksjoner mellom legemiddel og annet vev enn målstedet (Alexis, Pridgen et al. 2008). Kitosan og pektin er biopolymerer som er av stor interesse for bruk i munnhulen. Disse biopolymerene kan bidra til økt terapeutisk effekt i kombinasjon med fluorider, da de har vist å ha beskyttende effekter for hydroksyapatitt (HA) ved syreangrep. Kitosan har i tillegg vist å ha antibakteriell effekt (No, Young Park et al. 2002, Beyer, Reichert et al. 2010, Lee, Tsai et al. 2012, Pistone 2016).

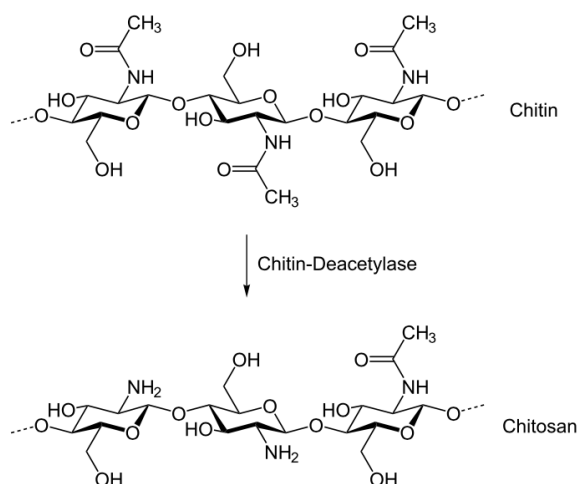
2.5.1 Kitosan

Kitosan er en polymer som er modifisert fra den naturlige karbohydrat polymeren kitin som kan utvinnes fra blant annet rekeskall. Kitosan består av lineære kjeder av β -1,4-bundet glukosamin og N-acetyl-D-glukosamin. Ved lave pH-verdier ($pK_a \approx 6-7$), vil polymeren ha en positiv ladning siden amin-gruppene ($-NH_2$) på glukosaminet er protonert. Kitosan er kjent for å være ikke-toksisk, biodegraderbar og biokompatibelt (Kean and Thanou 2010, Kumari, Yadav et al. 2010, Kang, Hong et al. 2012, Ganss, Klimek et al. 2014). Kitosan er uløselig ved nøytral og høye pH-verdier (Thanou, Verhoef et al. 2001). Polymeren er ofte brukt i legemiddelformuleringer for å øke effekten av legemidler. Kitosan er en allsidig polymer som finnes i ulike molekylvekt og grad av deacetylering. De fysiokjemiske og biologiske egenskapene til kitosan avhenger av graden av polymerisering og deacetylering. Dette bidrar til at polymeren kan modifiseres og tilpasses til ønsket legemiddelsystem (Kean and Thanou 2010).

Kitosan har i nyere studier vist å ha en antibakteriell effekt (No, Young Park et al. 2002, Liu, Chen et al. 2006, Du, Niu et al. 2009). Denne effekten er i stor grad knyttet til den kjemiske strukturen og molekylvekten. Kitosan har en positiv ladning ved lave pH-verdier som følge av protonering av $-NH_2$. Positivt ladet kitosan kan dermed binde seg til membraner hos bakterier som er negativt ladet. Den antibakterielle effekten skyldes av at bakteriemembranen

destabiliseres ved at ioner og proteiner frigis fra bakteriecellen. Kitosan hemmer også transkripsjonen av mRNA (Du, Niu et al. 2009, Padovani, Feitosa et al. 2015).

Figur 2-5 viser strukturen til kitosan og kitin.



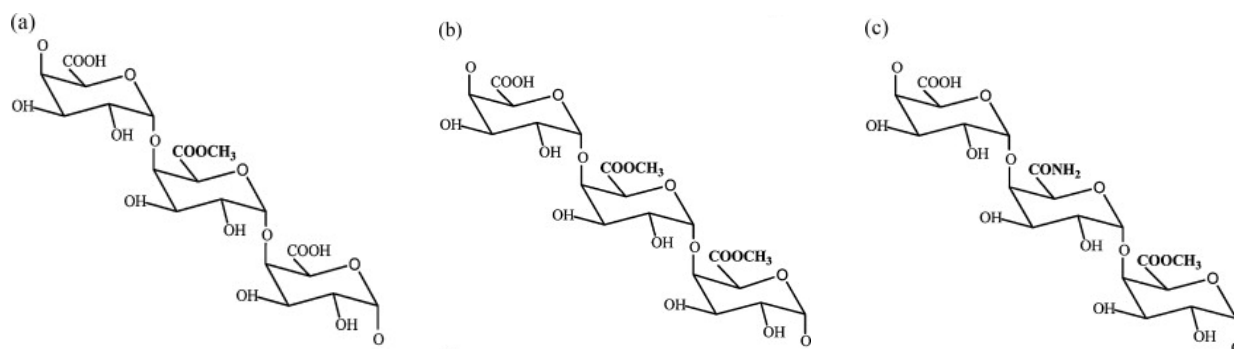
Figur 2-5: Strukturformel til kitosan. Kitosan er modifisert form av kitin. Figur fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>

2.5.2 Pektin

Pektin er en polymer med forgreninger som består mest av D-galakturonat-enheter. Man finner polymeren ofte i eple skall og appelsinskall (Pistone 2016). Hovedkjeden består av en metylert ester av polygalakturonsyre som er α -1 \rightarrow 4 bundet. Sidekjedene vil i varierende grad være kovalent bundet til nøytrale sukker. Karboksylgruppen på galakturonat-monomerene kan være enten metylesterifisert eller amidert, og graden av esterifisering og amidifisering avgjør egenskapene til pektin og da spesielt evnen til å danne en gel. Pektin er generelt delt inn i to hovedkategorier avhengig av forestringsgraden. Høy-metoksyliert (HM-pektin) pektin har en forestringsgrad som er høyere enn 50%, mens lav-metoksylierte (LM-pektin) har en forestringsgrad som er mindre enn 50%. LM-pektin kan også bli amidert (AM-pektin). Det er en negativ ladning på karboksylgruppene, og de har en pK_a -verdi ca 3.5 (Chang, McLandsborough et al. 2012, Mendes, Esperança et al. 2017, Pistone, Goycoolea et al. 2017). Figur 2-6 viser de ulike formene av pektin.

Pektin har en kompleks struktur i forhold til de andre polymerene, men studier har konkludert at pektin har lav toksisitet, er biokompatibelt og biodegraderbar (Jonassen, Treves et al. 2013).

Den mest unike og karakteristiske egenskapen til pektin er evnen til å danne gel. Denne egenskapen gjør pektin til et av de mest benyttede substansene i mange matvarer og farmasøytiske formuleringer. Lav toksisitet og lave produksjonskostnader er i tillegg andre fordeler som gjør den svært egnet i formuleringer med kontrollert frisetting og bioadhesjon (Sriamornsak 2011).



Figur 2-6: Strukturformel av lav-metoksylert (LM) pektin (a), høy-metoksylert (HM) pektin (b), og amidert (AM) pektin (c). Figur bearbeidet fra Nguyen 2011.

2.6 Tinnfluorid

Tinnfluorid (SnF_2) er et hvitt, krystallinsk pulver. SnF_2 er løselig i vann (30-39%) ved 20 °C, men SnF_2 -løsninger er ustabile innen noen få timer etter tillaging og må derfor brukes rett etter tillaging (National Center for Biotechnology Information 2017). I denne oppgaven hadde 0,2% og 0,1% SnF_2 -løsninger pH ca. 2,8.

2.7 Karakterisering av nanopartikler

Det er viktig å karakterisere nanopartikler generelt for å ha informasjon om formuleringens *in vitro* stabilitet. Parametere som partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks (PDI), pH, zetapotensial og konduktivitet kan fortelle noe om nanopartiklenes egenskaper, og endringer i disse parameterne over tid kan indikere ustabilitet.

Partikkelstørrelse

Størrelse er en viktig faktor i nanopartikulære legemiddelsystemer. Nanopartiklenes evne til å kapsle inn legemidler avhenger av partikkelstørrelse. Det er viktig å ha kunnskap om partikkelstørrelse for å kunne avgjøre om nanopartiklene har evnen til å penetrere ulike fysiologiske barrierer i kroppen og om de vil interagere med cellemembraner (Kumari, Yadav et al. 2010, Brannon-Peppas and Blanchette 2012). Partikkelstørrelse er en nøkkelfaktor når det kommer til fordelingen av nanopartikler med lang sirkulasjonstid i kroppen og terapeutisk effekt. I tillegg vil partikkelstørrelse avgjøre hvilke organer legemiddelet akkumuleres i (Alexis, Pridgen et al. 2008). Ved å følge endringer i partikkelstørrelse over tid kan man også si noe om partiklenes *in vitro* stabilitet.

Partikkelstørrelsen til nanopartikler kan bestemmes ved hjelp av dynamisk lysspredning (DLS). Metoden baserer seg på å detektere lysspredning fra partikler og molekyler som beveger seg i en løsning. En laser vil sende lys gjennom prøveløsningen, og partiklene og molekylene i prøven vil spre lyset i ulike retninger. Nanopartikler beveger seg konstant som følge av tilfeldige kollisjoner med andre molekyler i løsningen. Partiklenes hastighet avhenger av størrelsen til partiklene, og lysintensitetsmønsteret vil kunne gi informasjon om størrelsesfordelingen av partiklene i prøven. Man kan benytte variasjonen i lys til å beregne størrelsen til en partikkel som har brownske bevegelser ved hjelp av Stokes-Einstein ligning (Malvern 2013). I denne oppgaven har det blitt benyttet Zetasizer Nano til å detektere nanopartiklenes lysspredning.

Stokes-Einstein ligning:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Hvor D_H = hydrodynamisk diameter til partikkel, k = Boltzmanns konstant, T = absolutt temperatur i Kelvin, η = viskositet, D = diffusjonskoeffisient.

Nano Zetasizer kan også benyttes til å beregne polydispersitetsindeksen (PDI). Denne parameteren forteller noe om størrelsesfordelingen til partiklene, og det er ofte ønskelig å ha lave verdier som mulig for nanopartikulære systemer. En lav PDI-verdi betyr at det er lav polydispersitet i løsningen vår. PDI-verdier oppgis mellom 0 og 1.

Zetapotensiale

Zetapotensiale er et mål på elektrostatiske interaksjoner mellom partikler, og forteller noe om stabiliteten til partikler i et system. Ladede partikler i et system vil tiltrekke seg motioner fra medium slik at det dannes et elektrisk dobbeltlag rundt partiklene. Det vil dannes en forskjell i det elektrokinetiske potensialet mellom den nøytrale delen av mediet og partiklene sammen med det elektriske dobbeltlaget. Denne forskjellen karakteriseres som zetapotensialet. Bestemmelse av zetapotensial kan utføres ved hjelp av elektroforese. Denne metoden baserer seg på mobiliteten av partikler mot en ladet elektrode. Man måler altså hvor raskt partikler med negativ ladning vil bevege seg mot en positiv ladet elektrode, og hvor raskt partikler med positiv ladning vil bevege seg mot en negativ ladet elektrode i et medium (Malvern 2013). Zetapotensialet kan deretter beregnes ved hjelp av Henrys ligning:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Hvor U_E = elektroforetisk mobilitet, ε = dielektrisk konstant, z = zetapotensial, $f(ka)$ = Henrys konstant, η = viskositet.

Zetapotensial påvirkes av ulike faktorer som pH-endringer, konduktivitet og konsentrasjonsendringer av en komponent i formuleringen. Zetapotensialet forteller noe om stabiliteten til nanopartikler i et system, og man ønsker generelt å oppnå suspensjoner med zetapotensiale høyere enn 30 mV eller lavere enn -30 mV siden disse har vist seg å være stabile (Malvern 2013).

3 Materialer og instrumenter

3.1 Materialer

3.1.1 Polymerer

Polymerer	Molar masse (g/mol)	K-nummer/ Batch-nummer	Produsent
Kitosan	$M_w = 3,1 \times 10^5$ Da $M_n = 1,15 \times 10^5$ Da DDA = 83%	BP-0805-04	NovaMatrix
AM-Pektin	DE: 30% DA: 19%	(Genu Pectin LM-102 AS)	CPKelco, Danmark

3.1.2 Virkestoff

Virkestoff	Molar masse (g/mol)	K-nummer/ Batch-nummer	Produsent
Tinnfluorid, SnF_2	156,71	MKBZ2129V	Sigma-Aldrich, USA

3.1.3 Andre kjemikalier

Andre kjemikalier	Molar masse (g/mol)	K-nummer/ Batch-nummer	Produsent
Natriumklorid, NaCl	58,44	13F130010	AnalaR Normapur, Belgia
Natriumtripolyfosfat, $\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$	367,86	1394281	Sigma-Aldrich, Tyskland
Sinkklorid, ZnCl_2	136,29	SZBA2880V	Sigma-Aldrich, Tyskland
Natriumhydroksid, NaOH	40,00	70800 42407C04	Sigma-Aldrich, Sveits
Di-natriumhydrogenfosfat dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	177,99	K25001880 814	Merck, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	137,99	A942646 706	Merck, Tyskland
Hydrogenklorid 37%, HCl	36,46	K30870114 226	Merck, Tyskland
Hydroksyapatitt, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1004,6	I028C5SD13C	Fluidinova, Portugal
Fluorescein isothiocyant (FITC)	389,38	SLBB8376V	Sigma-Aldrich, Tyskland

3.2 Løsninger

Kitosan 0,07 % (w/w)

0,0875 g romtemperert kitosan ble veid ut på finvekt i veieskip og overført til et begerglass. Det ble deretter tilført 74,9125 g Milli-Q vann i begerglasset. En magnet ble skylt med Milli-Q vann, før begerglasset ble dekket med parafilm og satt på en magnetrører. Løsningen var under omrøring (nivå 4) i romtemperatur til dagen etter.

Kitosan merket med 5% FITC 1% (w/w) stamløsning

Ferdig tillagd kitosan merket med 5% FITC fremstilt etter metoden som er forklart i en tidligere artikkel (Quemeneur, Rinaudo et al. 2008), ble benyttet til å lage en stamløsning på 1% i denne oppgaven.

1,0 g kitosan merket med FITC ble veid ut på papir på finvekt og overført til et begerglass 150 ml. Begerglasset ble deretter fylt med 99,0 g Milli-Q vann. En magnet ble skylt med Milli-Q vann, før begerglasset ble dekket med parafilm og satt på en magnetrører (nivå 4). Stamløsningen ble oppbevart i kjøleskapet og beskyttet mot lys ved hjelp av aluminiumsfolie rundt erlenmeyerkolben.

Kitosan 0,07% (w/w) med kitosan merket med FITC 1% (w/w) stamløsning

0,4375 g kitosan med merket FITC 1% stamløsning ble utpipettert på finvekt og overført til et begerglass 150 ml. 74,48 g Milli-Q vann og en skylt magnet ble tilsatt begerglasset. 0,0831 g romtemperert kitosan ble veid ut på papir på finvekt og overført til det samme begerglass. Begerglasset ble dekket med parafilm og satt på en magnetrører (nivå 4). Begerglasset var dekket med aluminiumsfolie for å beskytte løsningen mot lys.

TPP 5 % (w/w) stamløsning

Romtemperert 5 g TPP ble veid ut i et glassveieskip på finvekt og overført til 100 ml erlenmeyerkolbe. 95 g Milli-Q vann ble tilsatt erlenmeyerkolben, og en magnet ble skylt før løsningen ble satt på en magnetrører (nivå 4). Stamløsningen ble oppbevart i kjøleskap.

TPP-løsninger

0,874 g TPP 5% stamløsning ble beregnet ut i fra forholdet mellom kitosan:TPP (80:20), og veid ut på finvekt i begerglass 100 ml. 49,126 g Milli-Q vann og en skylt magnet ble tilført begerglasset. Begerglasset ble deretter dekket med parafilm og satt på en magnetrører (nivå 4).

Pektin-løsninger

Det ble tillagd flere ulike konsentrasjoner av polymeren pektin. Tabell 3-1 nedenfor gir en oversikt over mengde pektin og Milli-Q vann som ble benyttet for de ulike konsentrasjonene. Ønsket mengde romtemperert pektin ble veid ut på finvekt i veieskip og overført til et begerglass 100 ml. Deretter ble begerglasset fylt med Milli-Q vann til ønsket konsentrasjon. En magnet ble skylt med Milli-Q vann, før begerglasset ble tildekket med parafilm og satt på en magnetrører. Løsningene var under omrøring (nivå 4) i romtemperatur til dagen etter.

Tabell 3-1: Oversikt over ulike konsentrasjoner av pektin som ble fremstilt.

Konsentrasjon pektin % (w/w)	Pektin (g)	Milli-Q vann (g)
0,07	0,0875	74,9125
0,05	0,0625	74,9395
0,03	0,0375	74,9625

ZnCl₂ 5% (w/w) stamløsning

5,0 g ZnCl₂ ble veid ut på finvekt i veieskip og overført til 100 ml erlenmeyerkolbe. 95 g Milli-Q vann ble tilsatt erlenmeyerkolben, og en magnet ble skylt før løsningen ble satt på en magnetrører (nivå 4). Stamløsningen ble oppbevart i kjøleskap.

ZnCl₂- løsninger

Ønsket mengde ZnCl₂ stamløsning ble beregnet ut i fra forholdet mellom pektin:Zn²⁺ (85:15), og utpipettert på finvekt i begerglass 100 ml. Milli-Q vann og en skylt magnet ble tilført begerglasset. Deretter ble begerglasset dekket med parafilm og satt på en magnetrører (nivå 4).

SnF₂-løsninger

Det ble tillagd flere ulike konsentrasjoner av SnF₂. Tabell 3-2 gir en oversikt over mengde SnF₂ og Milli-Q vann som ble benyttet for de ulike konsentrasjonene. Ønsket mengde romtemperert SnF₂ ble veid ut på finvekt i veieskip og overført til et begerglass 100 ml. Deretter ble begerglasset fylt med Milli-Q vann til ønsket konsentrasjon. En magnet ble skylt med Milli-Q vann, før begerglasset ble tildekket med parafilm og satt på en magnetrører. Løsningene var under omrøring (nivå 4) i romtemperatur.

Tabell 3-2: Oversikt over ulike konsentrasjoner av SnF₂ som ble fremstilt.

Konsentrasjon SnF ₂ % (w/w)	SnF ₂ (g)	Milli-Q vann (g)
0,05	0,125	49,875
0,1	0,25	49,25
0,15	0,375	49,625
0,2	0,5	49,5
0,25	0,625	49,375

0,05 M NaCl

2,922 g NaCl ble veid inn i et glassveieskip på en finvekt, og overført til en 1000 ml målekolbe. Glassveieskipet ble skylt med Milli-Q vann og målekolben ble deretter fylt med Milli-Q vann ad 1000 ml. En magnet ble skylt med Milli-Q vann, og målekolben ble satt på en magnetrører (500 rpm) i 10 min i romtemperatur (~20°C).

10 mM Fosfatbuffer pH 6.8

Fosfatbufferen ble lagd etter oppskriften "Sørensen's fosfatbuffer" (Ruzin 1999). 13,799 g natriumdihydrogenfosfat monohydrat (NaH₂PO₄ x H₂O) og 17,799 g dinatriumhydrogenfosfat dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O) ble veid ut på papir på finvekt og overført til hver sine 500 ml målekolber. Tørrstoffene ble løst i Milli-Q vann. En skylt magnet ble tilført målekolbene før de ble satt på en magnetrører (500 rpm) i 10 min i romtemperatur (~20°C). 51,0 ml av løsningen med NaH₂PO₄ x H₂O og 49,0 ml av løsningen med Na₂HPO₄ x 2H₂O ble overført til en ny 250 ml målekolbe. 100 ml av denne blandingen ble overført til et begerglass og fortynnet med 900 ml Milli-Q vann for å oppnå en konsentrasjon på 10 mM. pH i løsningen ble justert til 6,8 med 0,1 M HCl.

3.3 Instrumenter og utstyr

3.3.1 Produksjon av nanopartikler

<u>Instrument og utstyr</u>	<u>Modell</u>	<u>Produsent</u>
Peristaltisk pumpe	Watson-Marlow 520S	Storbritannia
Pumpeslange for kitosan	Silikonslange, indre diameter 0,8 mm	
Pumpeslange for pektin	Silikonslange, indre diameter 1,52 mm	
Finvekt	AG204 Delta Range	Mettler Toledo, Sveits
Grovvekt	PB3002 Delta Range	Mettler Toledo, Sveits
Filter (produksjon av nanopartikler)	Millex AA 0,22 µm og 0,8 µm	Merck Millipore, Irland
Magnetrører	Werke modell R010 power	IKA, Tyskland

3.3.2 Måling av partikkelstørrelse og zetapotensial

<u>Instrument og utstyr</u>	<u>Modell</u>	<u>Produsent</u>
Zetasizer	Zetasizer Nano-Zs	Malvern Instruments, Storbritannia
Elektrode	Zetasizer Dip Cell	Malvern Instruments, Storbritannia
Standardløsning til måling av zetapotensiale	Zeta potential transfer Standard, Batch nr. 151405	Malvern Instruments, Storbritannia
Engangskyvetter	Polystyrene 10 x 10 x 45 cm REF 67.754	Sarstedt, Tyskland

3.3.3 Diverse

Instrument	Modell	Produsent
pH-meter	MP220	Mettler Toledo, Sveits
Kalibreringsløsninger til pH-meter	Bufferløsning pH 7,0	VWR Chemicals, Prolabo, Frankrike
	Bufferløsning pH 4,0	VWR Chemicals, Prolabo, Frankrike
Gelfiltreringskolonner	PD-10 Columns	GE Healthcare, England
Rotator	LD-79	Labinco BV, Nederland
Sentrifuge	5430R	Eppendorf AG, Tyskland
Sentrifugerør	Centrifuge Tubes, 15 ml	VWR, USA
Plateleser	Wallac Viktor ³ 1420	Perkin-Elmer, USA
	Multilabel Counter	
Plater	96 well, white	Nunc, Danmark
Eppendorfrør	Safe-Lock Tubes, 1.5 ml	Eppendorg Ag, Tyskland
Varmeskap	TS8056	Termaks, Norge
Oppsamlingsrør	Freestanding Mailing Tube, 5 ml	VWR, USA

4 Metoder

4.1 Fremstilling av nanopartikler

Fremstilling av nanopartikler ble fremstilt over to dager som følgende:

Dag 1 – Tillaging av polymerløsninger:

Polymerløsningen ble tillagd dag 1 av fremstillingsprosessen og satt på røring (nivå 4) i romtemperatur til dagen etter. Hetteglass ble skylt med Milli-Q vann og satt til tørk på et stativ i romtemperatur til dagen etter.

Dag 2 – Tillaging av kryssbinder- og fluorid-løsning:

Kryssbinder-løsninger, og fluorid-løsninger ble tillagd dag 2 av fremstillingsprosessen og satt under omrøring i romtemperatur i ca. 1 time før de ble benyttet videre i tillagingen av nanopartikler. 45 g av polymerløsningen ble veid i et hetteglass med et sprøytefilter (0,8 μm). En skylt magnet ble deretter tilsatt hetteglasset med polymeren. 15 g kryssbinderløsning og 15 g av fluoridløsningen ble veid inn i hvert sitt hetteglass ved hjelp av sprøytefiltre (0,22 μm). En peristaltisk pumpe ble benyttet for å blande løsningene med kontrollert hastighet. Før løsningene ble blandet sammen, ble slangen skylt med minst 30 ml filtrert (0,22 μm) Milli-Q vann ved 105 rpm. Deretter ble slangen mettet med minst 20 ml av fluoridforbindelsen ved 105 rpm. Omdreiningen ble satt ned til 25 rpm ved overføring av fluorforbindelse og kryssbinder til polymeren. Hetteglasset med 15 g fluorforbindelse ble overført først dråpevis over til hetteglasset med polymerløsningen, og polymerløsningen var under omrøring (nivå 5) i totalt 10 min fra første overførte dråpe av fluorforbindelsen. Når all fluorforbindelse hadde blitt overført til polymeren, ble slangen nok en gang rensset med minst 30 ml filtrert (0,22 μm) Milli-Q vann og deretter mettet med minst 20 ml av kryssbinder-løsningen ved 105 rpm. Hetteglasset med filtrert kryssbinder-løsning ble overført til hetteglasset med blandingen polymer- og fluoridløsning dråpevis via den peristaltiske pumpen. Blandingen var under omrøring (nivå 5) i totalt 10 min fra første overførte dråpe av kryssbinderen. Det ble notert ned tiden når siste dråpe av fluorforbindelsen og kryssbinder ble overført til polymerløsningen for å kontrollere at pumpen fungerer. Nanopartikkel-formuleringene ble oppbevart i kjøleskap til dagen etter (dag 3) for karakterisering.

Fremstilling av fluorescerende nanopartikler

Polymerkonsentrasjonen i fluorescerende nanopartikler bestod av kitosan 0,07% (w/w) der 5% bestod av kitosan merket med fluorescein isothiocyanat (FITC) og 95% av ikke-fluorescerende kitosan. Fremstilling av nanopartikler med fluorescensmarkøren FITC ble lagd på akkurat samme måte som beskrevet ovenfor, men prosessen ble utført under forhold der målet var å eksponere fluorescensmarkøren for minst mulig for lys. Det ble derfor benyttet aluminiumsfolie til å dekke utenpå begerglass, hetteglass og andre beholdere.

4.2 Karakterisering

Karakterisering av nanopartiklene ble utført på dag 3 av fremstillingsprosessen, altså dagen etter tilblending via en peristaltisk pumpe. Nanopartikkel-formuleringene ble tatt ut av kjøleskapet og satt under omrøring (nivå 4) til det hadde oppnådd romtemperatur.

Nanopartiklene ble karakterisert med hensyn på størrelse, PDI, zetapotensiale og pH. Disse parametrene ble vurdert underveis i oppgaven, og derfor ble ikke alle parametrene nødvendigvis målt hver gang.

4.2.1 Måling av partikkelstørrelse og PDI

Måling av partikkelstørrelse og PDI ble utført med Zetasizer Nano-ZS. Engangskyvetter av polystyren ble fylt med 1 ml prøve. Før prøven ble satt inn i instrumentets målecelle, ble kyvetten tørket med linsepapir og undersøkt for støv og eventuelle luftbobler. Tabell 4-1 viser innstillinger som ble brukt ved måling av partikkelstørrelse og PDI.

Tabell 4-1: Innstillinger benyttet ved måling av størrelse og PDI

Dispersjonsmedium	Vann
Refraktiv indeks for vann	1,330
Viskositet for vann (cP)	0,8872
Innstillinger	Mark-Houwink parameter
Måletemperatur	25°C
Ekvilibreringstid	300 sekunder
Målevinkel	173°
Varighet (hver måling)	Automatisk
Antall målinger	3
Antall run per måling	Automatisk
Attenuator	Automatisk

4.2.2 Måling av zetapotensiale og konduktivitet

Måling av zetapotensiale ble også utført med Zetasizer Nano ZS, mens måling av konduktivitet ble utført med både Zetasizer Nano ZS og konduktivetsmåleren (utfylling, må sjekke laben igjen). Ved måling av zetapotensiale og konduktivitet på Zetasizer NanoZS ble det først benyttet en standard for å kontrollere at instrumentet og dipcellen er i orden. Standarden skulle ha et zetapotensiale innenfor $-42 \text{ mV} \pm 4,2 \text{ mV}$. Dipcellen ble deretter skylt med destillert vann. For å unngå luftbobler, ble kyvetten holdt litt på skrå mens dipcellen ble ført sakte ned i prøven. Tabell 4-2 viser innstillinger ved måling av zetapotensiale.

Tabell 4-2: Innstillinger benyttet ved måling av zetapotensiale og konduktivitet

Dispersjonsmedium	Vann
Refraktiv indeks for vann	0,8872
Viskositet for vann (cP)	1,330
Innstillinger	Smoluchowski
Måletemperatur	25°C
Ekvilibreringstid	120 sekunder
Varighet (hver måling)	Automatisk, 10-100
Antall målinger	5
Attenuator	Automatisk
Celletype	Zeta dip cell
Spenning	Automatisk

4.2.3 Måling av pH

pH-meteret ble kalibrert med to ulike bufferløsninger, pH 7 og pH 4 før prøvene ble avlest. Elektroden ble skylt med destillert vann og tørket lett av før prøvemåling ble utført i romtemperatur.

4.3 Fjerning av ikke-innkapslet tinnfluorid ved gelfiltrering

Kolonnen ble først ekvilibrert med 25 ml Milli-Q vann og mettet med 25 ml 0,5 M NaCl. 2,5 ml av nanopartikkelprøven ble utpipettert til kolonnen og deretter eluert med 3,5 ml 0,5 M NaCl.

Ved gelfiltrering av prøver med fluorescensmarkør, ble kolonnene tildekket med aluminiumsfolie for å unngå at fluorescensmarkøren ble eksponert for lys.

4.4 Adsorpsjon til hydroksyapatitt (HA)-pulver

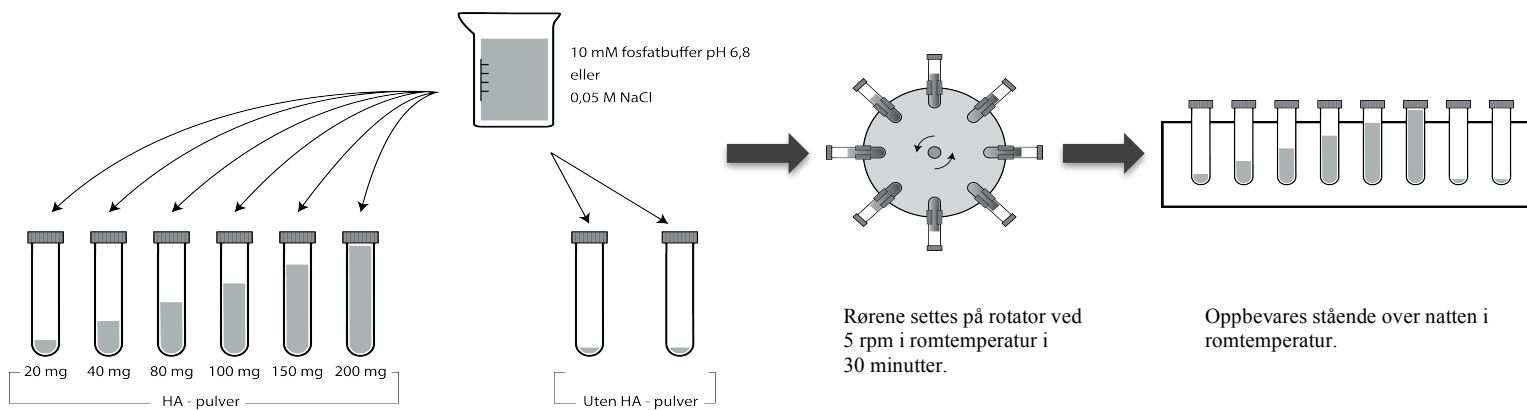
4.4.1 Hydrering av hydroksyapatitt-pulver

Det ble veid ut ulike mengder av HA-pulver til 6 sentrifugeringsrør: 20 mg, 40 mg, 80 mg, 100 mg, 150 mg, og 200 mg HA. Deretter ble det tilført 1 ml løsningsmiddel (enten 10 mM fosfatbuffer eller 0,05 M NaCl). Det ble også tillagd to blankprøver som kun inneholdt 1 ml løsningsmiddel og ikke noe HA. Alle sentrifugeringsrørene ble satt på en rotator ved 5 rpm i romtemperatur i 30 minutter. Til slutt ble rørene oppbevart i romtemperatur til dagen etter i en vertikal posisjon (figur 4-1).

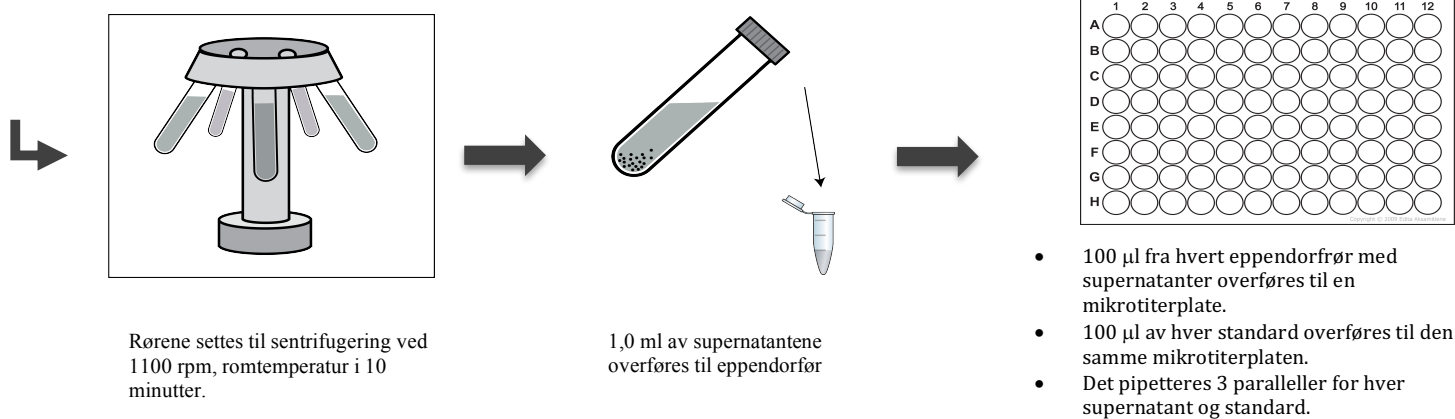
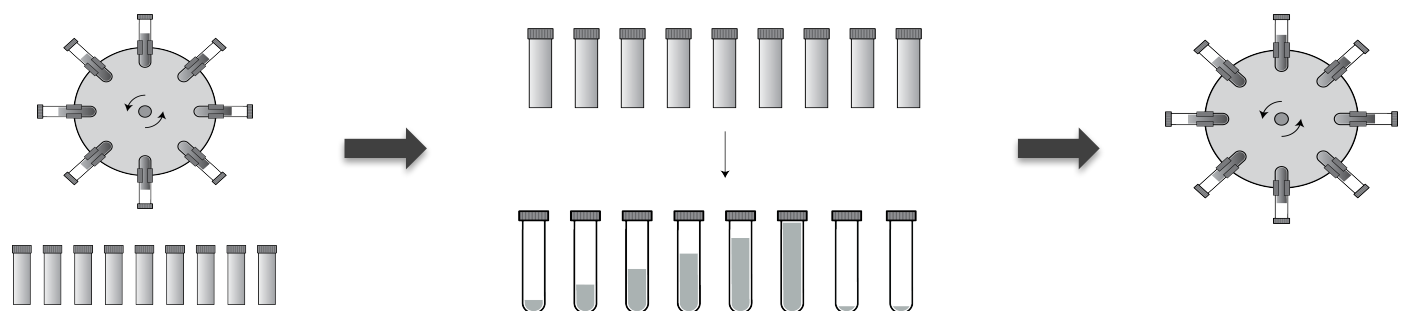
4.4.2 Adsorpsjonseksperiment

Sentrifugeringsrørene med HA fra dagen før ble satt på en rotator ved 5 rpm, 35°C i 1 time for å resuspendere HA-suspensjonene. Gelfiltrerte nanopartikler med fluorescensmarkør ble også plassert i varmeskapet sammen med rotatoren. Hvert sentrifugeringsrør ble tilsatt 2 ml av gelfiltrert prøve, før sentrifugeringsrørene ble plassert på rotatoren ved 5 rpm, 35°C i 5 minutter. Deretter ble alle rørene sentrifugert ved 1100 rpm i romtemperatur i 10 minutter. 1 ml av supernatantene ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (figur 4-1).

1. Hydrering av HA-pulver



2. Adsorpsjon til HA-pulver



Figur 4-1: Skjematisk illustrasjon av adsorpsjonseksperimentet. Rpm (*rounds per minute*) tilsvarer omdreiningshastigheten.

4.4.3 Estimering av mengde fluorescerende nanopartikler adsorbent til hydroksoapatitt

For å kunne kvantifisere mengden fluorescerende nanopartikler som adsorbent til hydroksoapatitt, ble det lagd en kalibreringskurve basert på blankprøver av gelfiltrert nanopartikler med konsentrasjoner på henholdsvis: 100%, 80%, 60%, 40%, 20% og 0% (tabell 4-3). Ved tillaging av standarder ble det benyttet enten 10 mM fosfatbuffer eller 0,05 M NaCl som fortynningsmiddel i kombinasjon med gelfiltrert prøve. Totalvolumet av hver enkel standard var på 1 ml, og kalibreringsstandardene ble tillagd i 1,5 ml eppendorfrør. Det ble benyttet en hvit microtiter plate som hadde 96 brønner. Under utpipettering ble alle prøver og standardløsninger beskyttet mot lys. Fra hver standard ble det utpipetert 100 µl til en brønn. Dette ble repetert to ganger slik at det var tre parallelle brønner for hver standard. For hver supernatant ble det også utpipetert 100 µl til en brønn, og gjentatt to ganger for å oppnå tre parallelle brønner. Alle prøver og standardløsninger ble beskyttet mot lys under adsorpsjonseksperimentet.

Tabell 4-3: Oversikt over tillagde standarder som ble benyttet for å lage kalibreringskurven.

Standard (%)	Gelfiltrert prøve (ml)	Fortynningsmiddel (0,05 M NaCl / 10 mM fosfatbuffer, ml)
100	1	0
80	0,8	0,2
60	0,6	0,4
40	0,4	0,6
20	0,2	0,8
0	0	1

Måling av fluorescens

Fluorescens ble målt ved hjelp av Victor³ Multilabel plateleser. Eksitasjon og emisjon for fluorescensmarkøren fluorescein isothiocyanat (FITC) ble i denne oppgaven satt til $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm og $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm. Tabell 4-4 viser innstillinger ved måling av fluorescens.

Tabell 4-4: Innstillinger benyttet ved måling av fluorescens

Ristevarighet	3 sekunder
Ristehastighet	Rask
Ristediameter	0,1 mm
Ristetype	Lineær
CW Lampeenergi	500
Filter emisjon	F535 – Slot A5
Filter eksitasjon	F485 – Slot A5
Emisjonsside	Ovenfra

Beregning av mengde adsorbert kitosan på hydroksyapatitt

Gjennomsnittet av avlest fluorescensintensitet ($n=3$) hos standardene dannet grunnlaget for kalibreringskurven. Ved hjelp av ligningen fra kalibreringskurven ($y = ax + b$) kan man plote inn y som gjennomsnittet avlest fluorescensintensitet ($n=3$) hos de fluorescerende nanopartiklene og beregne mengden adsorbert kitosan ved bruk av følgende formel (I):

$$\text{Adsorbert kitosan (\%)} = 100 - \left(\frac{y-b}{a} \times 100 \right) \quad (\text{I})$$

5 Forsøksoppsett

5.1 Utvikling av formulering

Det har tidligere blitt kartlagt betingelser for fremstilling av polymere nanopartikler med innkapslet natriumfluorid. I denne oppgaven har fokuset vært på en annen fluorforbindelse, tinnfluorid (SnF_2). Det ble fremstilt nanopartikler av polymerer med ulik ladning. Kitosan er en positiv ladet polymer, mens pektin er en negativ ladet polymer. Ulike nanopartikkelformuleringer ble fremstilt med enten kitosan og pektin, og henholdsvis kryssbindere som TPP og sink (Zn^{2+}), mens den innkapslede konsentrasjonen av SnF_2 ble variert. Formuleringer som viste tilfredsstillende resultater med hensyn til stabilitet, størrelse, PDI og pH ble undersøkt videre. Tabell 5-1 og tabell 5-2 viser en oversikt over formuleringer som har blitt fremstilt. Det ble også fremstilt blindprøver av de ulike formuleringene.

Tabell 5-1: Oversikt over ulike formuleringer fremstilt med AM-pektin.

Polymer	Polymer-konsentrasjon (%, w/w)	Kryssbinder	Løsemiddel	Ratio polymer:kryssbinder (w:w)	SnF_2 -konsentrasjon (%, w/w)
AM-Pektin	0,07	ZnCl_2	Vann	85:15	0,05
AM-Pektin	0,07	ZnCl_2	Vann	85:15	0,1
AM-Pektin	0,07	ZnCl_2	Vann	85:15	0,15
AM-Pektin	0,07	ZnCl_2	Vann	85:15	0,2
AM-Pektin	0,05	ZnCl_2	Vann	85:15	0,05
AM-Pektin	0,05	ZnCl_2	Vann	85:15	0,1
AM-Pektin	0,03	ZnCl_2	Vann	85:15	0,05
AM-Pektin	0,03	ZnCl_2	Vann	85:15	0,1

Tabell 5-2: Oversikt over ulike formuleringer fremstilt med kitosan.

Polymer	Polymer-konsentrasjon (%, w/w)	Kryssbinder	Løsemiddel	Ratio polymer:kryssbinder (w:w)	SnF ₂ -konsentrasjon (%, w/w)
Kitosan	0,07	TPP	Vann	80:20	0,05
Kitosan	0,07	TPP	Vann	80:20	0,1
Kitosan	0,07	TPP	Vann	80:20	0,15
Kitosan	0,07	TPP	Vann	80:20	0,2
Kitosan	0,07	TPP	Vann	80:20	0,25

5.2 Forbedring av stabilitet

In vitro stabilitet av de ulike nanopartikkel formuleringene ble også undersøkt. Nanopartikkel formuleringene ble oppbevart i kjøleskap (~4°C) etter fremstilling, men ved karakterisering ble formuleringene først tatt ut igjen i romtemperatur (~20°C) før størrelse, PDI, pH og eventuelt zetapotensial ble målt. Alle formuleringer ble fulgt opp i minst én uke. Det ble foretatt visuelle observasjoner av formuleringene hver gang det ble utført målinger for å unngå at synlige faseparasjoner eller aggregater kunne påvirke resultatene.

Den mest lovende formuleringen med pektin ble testet for pH-endringer. Formuleringen med 0,05% pektin med innkapslet 0,1% SnF₂ ble pH-justert slik at pH ≈ 5 for å undersøke om formuleringen fortsatt var stabil ved pH > 4,76. Nanopartikler av pektin var vanskelig å fremstille og var ikke egnet til videre forsøk. Nanopartikler av kitosan viste tilfredsstillende verdier med hensyn til størrelse og PDI. Det ble benyttet gelfiltrering for å fjerne ikke-innkapslet SnF₂ som en metode for å forbedre stabiliteten ytterligere for nanopartikler av kitosan. Konduktivitet ble målt for å avgjøre om gelfiltrering var en god nok metode for å fjerne ikke-innkapslet SnF₂. Det ble i tillegg undersøkt om NaCl eller Milli-Q vann kunne brukes som elueringsmiddel for gelfiltrering. Den mest lovende formuleringen med 0,07% kitosan og innkapslet 0,2% SnF₂ ble valgt ut for videre adsorpsjonsstudier på bakgrunn av de beste resultatene med hensyn til størrelse og PDI over tid.

5.3 Adsorpsjon av nanopartikler til hydroksyapatitt (HA)

Fluorescein isothiocyanat (FITC) ble benyttet som fluorescensmarkør for å undersøke hvor mye av nanopartiklene som adsorberes til hydroksyapatitt. I utgangspunktet ble adsorpsjonseksperimentet utført som beskrevet under kapittel 4.4.1 og 4.4.2. Det ble undersøkt om fosfatbuffer eller NaCl kunne brukes som løsningsmiddel. De første forsøkene med fosfatbuffer ga ikke en vellykket kalibreringskurve. Ved bruk av NaCl som løsningsmiddel ble det oppnådd en akseptabel kalibreringskurve, men måling av pH viste at standardene og supernatantene var i to ulike pH-områder. For å benytte standardkurven og ligningen derfra til å kvantifisere mengden kitosan som adsorberes til HA-pulver, må standardene og supernatantene være i samme pH-område. Dette skyldes av at fluorescensen er pH-avhengig. Adsorpsjonseksperimentet ble derfor nedskalert 50% slik at det var praktisk mulig å gjennomføre det i løpet av en dag, og for å ha muligheten til å måle størrelse, PDI og pH underveis. Ved nedskalering ble det veid ut ulike mengder av HA-pulver til 6 sentrifugeringsrør: 20 mg, 40 mg, 60 mg, og 80 mg HA. Deretter ble volumet av alle løsningsmidlene halvert. Volumet av fluorescerende gelfiltrert prøve tilsatt til hvert sentrifugeringsrør ble halvert til 1 ml, mens volumet av supernatanter som overføres til 1,5 ml eppendorfrør ble halvert til 0,5 ml. I tillegg ble standardene pH-justert med 0,1 M NaOH slik at de var i samme pH-område (pH ~6) som supernatantene.

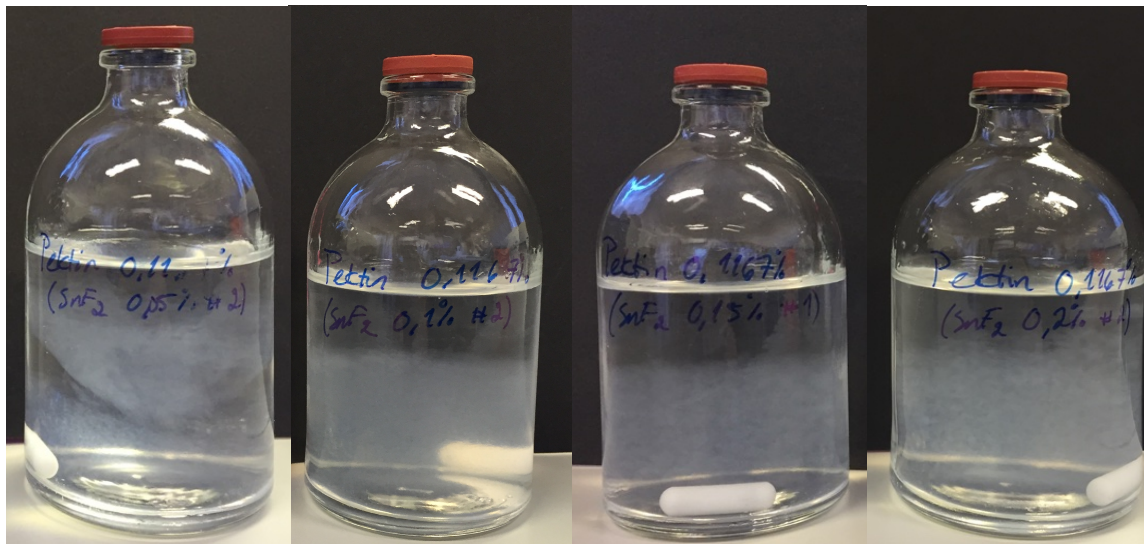
6 Resultater

6.1 Utvikling av formulering

Nanopartikler basert på biopolymerer med negativ ladning (pektin) og positiv ladning (kitosan) ble fremstilt via ionisk kryssbinding med henholdsvis sink og TPP. Disse ble karakterisert med hensyn til størrelse, PDI, pH, og zetapotensial. Formuleringene som viste de mest lovende resultatene ble utviklet videre i oppgaven med tanke på forbedring av stabilitet. Nanopartiklene ble ansett som tilfredsstillende dersom partikkelstørrelsen var mellom 1 og 1000 nm. Partikkelstørrelse påvirker stabiliteten av nanopartiklene og avgjør hvor mye legemiddel som kan innkapsles i nanopartiklene (Mitra, Lee et al. 2013). I tillegg er det ønskelig at PDI er så lavt som mulig i nanopartikulære systemer. PDI-verdier angis mellom 0 og maksimalt 1, men PDI-verdier mellom 0 og 0,3 er akseptable og tilsvarer lav polydispersitet i formuleringen.

6.1.1 Nanopartikler basert på AM-pektin

Nanopartikler fremstilt av pektin hadde sink (Zn^{2+}) som kryssbinder. Ratio mellom pektin og Zn^{2+} ble holdt konstant 85:15 gjennom alle formuleringene. Det ble benyttet ulike startkonsentrasjoner av tinnfluorid (SnF_2) i nanopartikkelformuleringene. Det var ingen store problemer med fremstillingen av formuleringene med innkapslet SnF_2 , men det var vanskelig å gjennomføre karakterisering av prøvene. Formuleringene viste allerede små tegn på dannelse av aggregater ved tillaging, og det var synlige tegn på faseseparasjon og dannelse av aggregater dagen etter fremstilling. Karakterisering av formuleringer basert på 0,07% pektin, Zn^{2+} og SnF_2 ble ikke gjennomført siden prøvene var ganske viskøse og blakket på karakteriseringsdagen. Det ble derfor ikke tatt noen målinger av dem med hensyn til størrelse, PDI og pH. Figur 6-1 viser hvordan prøvene så ut dagen etter fremstillingen.



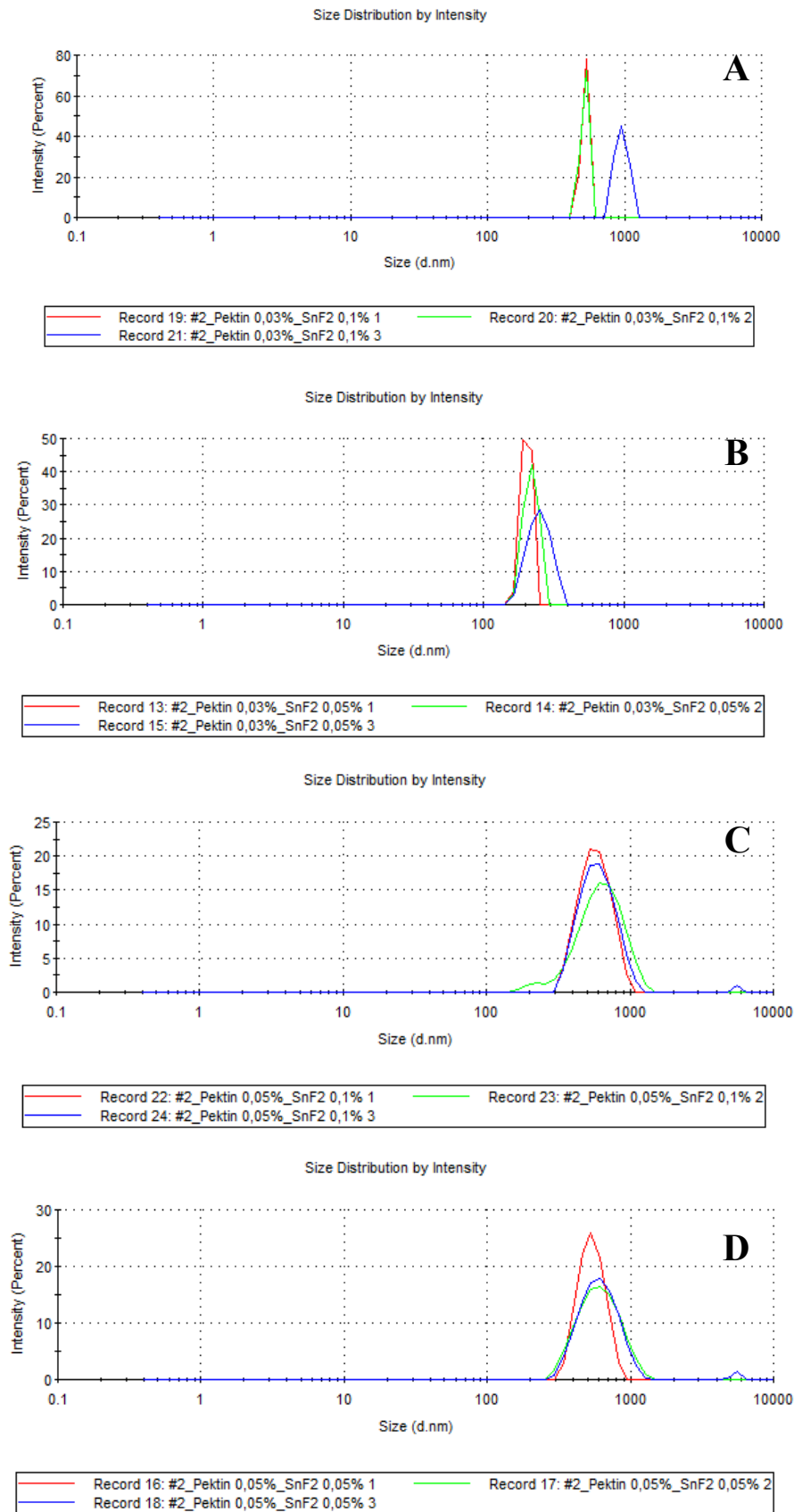
Figur 6-1: Formuleringer med 0,07% Pektin: Zn^{2+} 85:15 med ulike SnF_2 - startkonsentrasjoner dagen etter fremstilling. (A) 0,05% SnF_2 , (B) 0,1% SnF_2 , (C) 0,15% SnF_2 , og (D) 0,2% SnF_2 .

Bildene i figur 6-1 ble tatt dagen etter fremstilling og ved visuelle observasjoner ble det observert at de ulike formuleringene var mest viskøse hos prøvene med de to høyeste tinnfluorid-konsentrasjonene (0,2% SnF_2 og 0,15% SnF_2). Det ble testet ut lavere konsentrasjoner av AM-pektin i formuleringene for å unngå at prøvene ble for viskøse. Konsentrasjonen av pektin ble redusert til 0,03% og 0,05%. Disse konsentrasjonene ble kombinert med de to laveste SnF_2 -konsentrasjonene (0,05% og 0,1%). Tabell 6-1 oppsummerer resultatene for formuleringer med 0,05% pektin og 0,03% pektin. Resultatene er basert på gjennomsnittet av to paralleller av hver konsentrasjon.

Tabell 6-1: Oversikt over målinger utført for de ulike AM-pektin formuleringene.

Formulering	Z-Ave (d.nm) Mean \pm st.dev (n = 3)	PDI Mean \pm st.dev (n = 3)	pH
0,03% pektin Pektin:Zn ²⁺ (85:15) 0,05% SnF ₂	519,5 \pm 134,7	0,5 \pm 0,1	3,26
0,03% pektin Pektin:Zn ²⁺ (85:15) 0,1% SnF ₂	1982 \pm 315,2	0,8 \pm 0,2	3,32
0,05% pektin Pektin:Zn ²⁺ (85:15) 0,05% SnF ₂	632,8 \pm 84,1	0,4 \pm 0,1	3,15
0,05% pektin Pektin:Zn ²⁺ (85:15) 0,1% SnF ₂	708,1 \pm 54,57	0,41 \pm 0,04	3,15

Resultatene i tabell 6-1 viser at det er lavere PDI-verdier hos formuleringen med 0,05% pektin. Målinger viste også en større forskjell i partikkelstørrelse mellom parallellene for formuleringer med 0,03% enn hos 0,05% pektin. Intensitetsplottene av formuleringene viste at størrelsesfordelingen var unimodal hos formuleringene med 0,05% pektin, mens størrelsesfordelingen hos 0,03% pektin var mer multimodal (figur 6-2). Lavere konsentrasjoner av pektin i kombinasjon med ulike konsentrasjoner av SnF₂ ga dessverre prøver som også var viskøse og blakket på karakteriseringsdagen.



Figur 6-2: Størrelsesfordeling dagen etter fremstilling av 0,03% pektin: Zn^{2+} med 0,1% SnF_2 (A) og 0,05% SnF_2 (B), og 0,05% pektin: Zn^{2+} med 0,1% SnF_2 (C), og 0,05% SnF_2 (D).

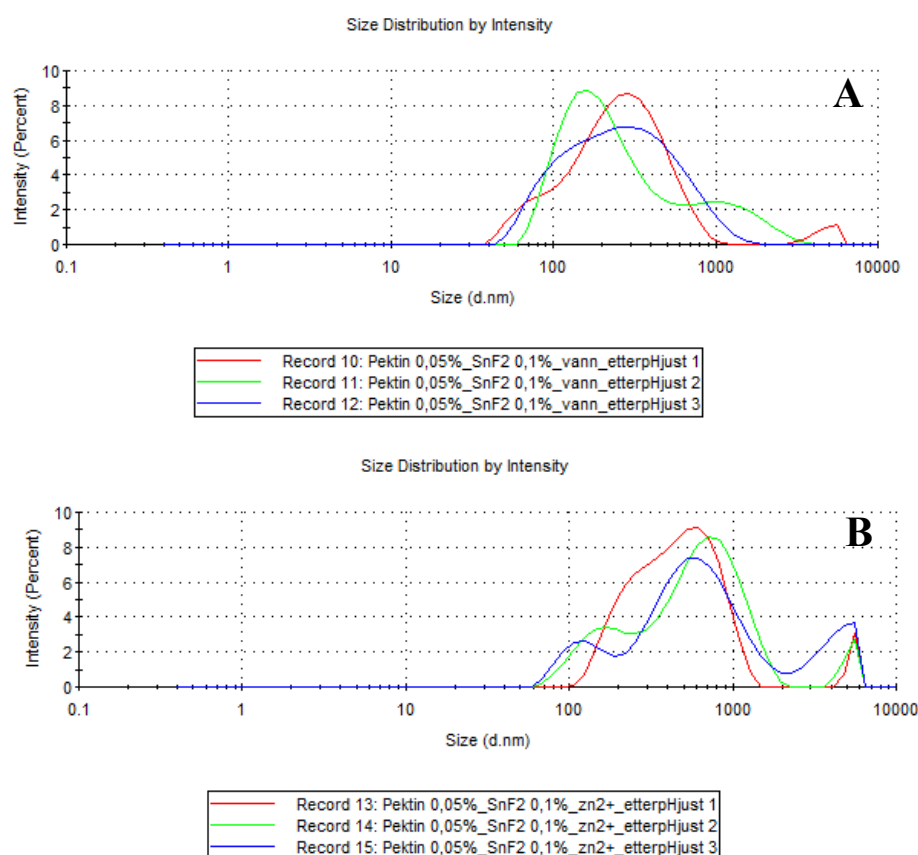
Til tross for at formuleringene basert på 0,03% og 0,05% pektin: Zn^{2+} med SnF_2 var blakket og viskøse dagen etter fremstilling, ble det forsøkt å forbedre formuleringen med 0,05% pektin: Zn^{2+} med 0,1% og 0,2% SnF_2 som følge av lavere partikkelstørrelse og PDI enn formuleringene med 0,03% pektin: Zn^{2+} og SnF_2 . Intensitetsplottene viste også at størrelsesfordelingene var mer unimodale hos 0,05% pektin: Zn^{2+} med SnF_2 . Av formuleringene med 0,05% pektin: Zn^{2+} og SnF_2 ble det valgt å gå videre med formuleringen som hadde 0,1% SnF_2 som startkonsentrasjon siden intensitetsplottet var mest unimodal for denne sammensetningen i motsetning til formuleringen med 0,05% SnF_2 som startkonsentrasjon.

Det ble videre undersøkt om formuleringen med 0,05% pektin: Zn^{2+} og 0,1% SnF_2 som startkonsentrasjon ville være stabil ved $\text{pH} > 4,76$. Denne pH -verdien representerer 0,05% pektin fremstilt i kun vann, men i samme forhold som om Zn^{2+} og SnF_2 hadde vært tilstede. Ved lavere pH -verdier vil karboksylgruppene i pektin bli protonert og miste ladningen. For at pektin skal kunne kryssbindes til et stoff med motsatt ladning må det selv ha ladning. Det var ønskelig å justere pH i formuleringen slik at $\text{pH} \approx 5$ for å undersøke om formuleringen ville være stabil. Dersom det ikke var noen synlige utfellinger, ble pH justert sakte opp til $\text{pH} = 6$. 0,1 M NaOH ble benyttet til å pH -justere formuleringene. Det ble foretatt pH -justering av en prøve med pektin, SnF_2 og tilsatt kryssbinder og en prøve med kun pektin og SnF_2 . Karakterisering med hensyn til størrelse og PDI ble utført både før og etter pH -justeringen for å holde oversikt over eventuelle endringer i parameterne (tabell 6-2).

Tabell 6-2: Oversikt over resultater før og etter pH-justering.

Formulering	Z-Ave (d.nm) Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	PDI Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	pH
Før pH-justering			
0,05% Pektin 0,1% SnF ₂ Blindprøve	16566 ± 5212	1 ± 0,0	2,92
0,05% Pektin + Zn ²⁺ (85:15) + 0,1% SnF ₂ Parallell 1	1771 ± 146	0,706 ± 0,122	3,17
Etter pH-justering			
0,05% Pektin 0,1% SnF ₂ Blindprøve	203 ± 2	0,362 ± 0,014	6,05 (tilsatt 1140 µl 0,1 M NaOH)
0,05% Pektin + Zn ²⁺ (85:15) + 0,1% SnF ₂ Parallell 1	462 ± 12	0,528 ± 0,046	5,43 (tilsatt 1500 µl 0,1 M NaOH)

Resultatene i tabell 6-2 viser at pH-justering av formuleringene fører til en reduksjon i både partikkelstørrelse og PDI. Intensitetsplottene i figur 6-3 viste at begge formuleringene med 0,1% SnF₂ som startkonsentrasjon har brede topper og tyder på fravær av monodisperse partikler og mulige aggregater ved pH > 4,75. Dette støttes opp av de visuelle observasjonene av prøvene etter pH-justering, der man tydelig kunne se utfelling med det blotte øyet.



Figur 6-3: Størrelsesfordeling i prøve uten sink tilstede (A) og i prøve med sink (B) etter pH-justering.

Formuleringer fremstilt med pektin var vanskelig å holde stabile, og prøveløsningene viste synlige tegn til faseseparasjon og aggregatdannelse dagen etter fremstilling. Formuleringen med 0,05% pektin og 0,1% SnF₂ som startkonsentrasjon viste størst potensiale blant alle formuleringene med pektin. pH-justering av formuleringer med og uten kryssbinderen Zn²⁺ tilstede ga en reduksjon i både størrelse og PDI. Intensitetsplottene viste en multimodal størrelsesfordeling etter at formuleringene har blitt pH-justert og at formuleringene er ustabile når pH > 4,76. Formuleringen ble derfor ikke inkludert i videre forsøk i denne oppgaven.

6.1.2 Nanopartikler basert på kitosan

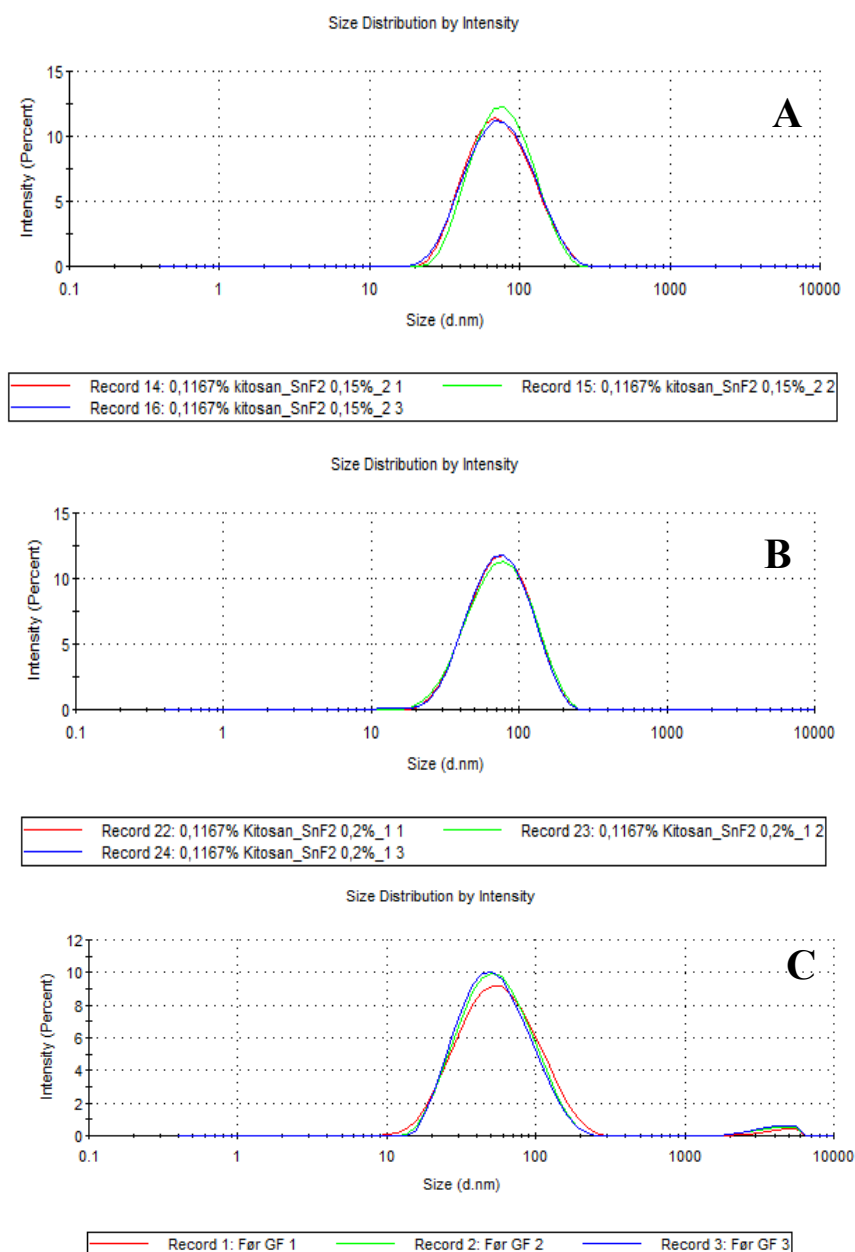
Nanopartiklene med kitosan hadde TPP som kryssbinder og SnF₂ ble forsøkt innkapslet. Det har tidligere blitt fremstilt nanopartikler med kitosan og TPP, men med innkapslet NaF (Nguyen, Escudero et al. 2017). Man har oppnådd tilfredsstillende nanopartikler med hensyn på størrelse og PDI tidligere ved 0,07% kitosan, der ratioen mellom kitosan og TPP var 80:20 (Pistone, Goycoolea et al. 2017). Pistone et al. klarte å fremstille nanopartikler med partikkelstørrelse ~120 nm og PDI-verdier ~0,2, mens Nguyen et al. har klart å fremstille nanopartikler med innkapslet NaF der partikkelstørrelsen var ~100 nm og PDI-verdier mellom 0,1 og 0,2. I denne oppgaven ble samme forhold mellom kitosan og TPP benyttet (80:20), men startkonsentrasjonen av innkapslet SnF₂ ble variert ved utvikling av formuleringene (tabell 6-3).

Tabell 6-3: Oversikt over målinger utført med hensyn til partikkelstørrelse, PDI og pH for formuleringer med 0,07% kitosan:TPP 80:20 og ulike startkonsentrasjoner av SnF₂.

SnF ₂ % (w/w)	Z-Ave (d.nm) Mean ± st.dev (n = 3)	PDI Mean ± st.dev (n = 3)	pH
0,05%	79,31 ± 0,09	0,481 ± 0,006	3,62
0,1%	72,1 ± 0,1	0,237 ± 0,007	3,42
0,15%	667 ± 0,1	0,190 ± 0,009	3,42
0,2%	65,8 ± 0,3	0,182 ± 0,005	3,43
0,25%	48,4 ± 0,6	0,254 ± 0,004	3,18

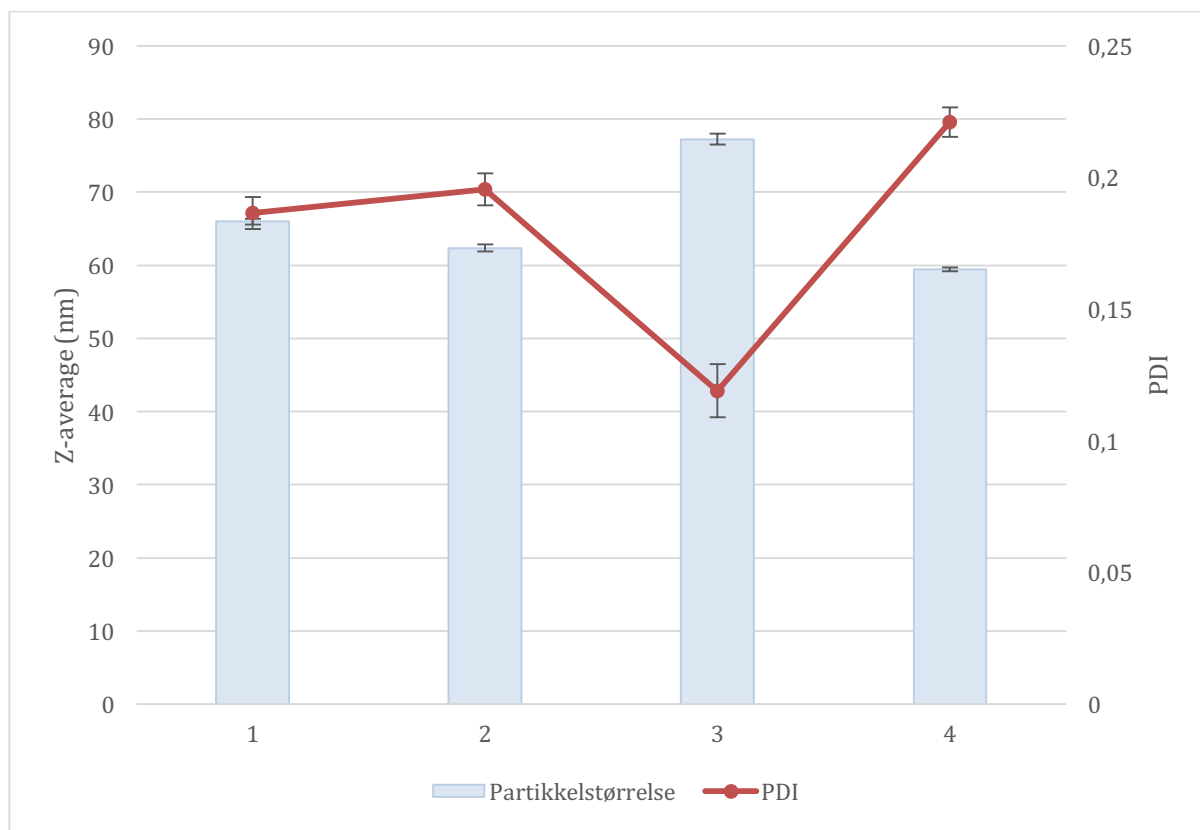
Det ble utviklet fire formuleringer med kitosan i første omgang med SnF₂-startkonsentrasjoner på 0,05%, 0,1%, 0,15% og 0,2%. Det ble også fremstilt en formulering med innkapslet 0,25% SnF₂ for å undersøke om det var mulig å oppnå en lavere partikkelstørrelse og PDI. Formuleringene med startkonsentrasjonene 0,15% og 0,2% SnF₂ hadde de beste resultatene med hensyn til størrelsesfordeling og PDI. Som det fremgår av tabell 6-3 viser resultatene av formuleringen med startkonsentrasjon 0,25% SnF₂ en lavere partikkelstørrelse enn formuleringer med lavere konsentrasjoner av SnF₂. PDI-verdien i denne formuleringen er derimot høyere sammenlignet med de andre formuleringene.

Figur 6-4 viser størrelsesfordelingen av de tre ulike formuleringene med 0,07% kitosan, TPP med henholdsvis 0,15% SnF₂ (Figur 6-4A), 0,2 % SnF₂ (Figur 6-4B) og 0,25% SnF₂ (Figur 6-4C). Hos alle formuleringene kan man observere en unimodal størrelsesfordeling. Størrelsesfordelingen i intensitetsplottene er mer overlappende hos formuleringen med innkapslet 0,2% SnF₂. I tillegg viser intensitetsplottet med 0,25% SnF₂ som startkonsentrasjon (figur 6-4C) to topper som kan tolkes som enten tilfeldig forurensning, dårlig stabilitet eller svikt under fremstillingsprosessen. Som følge av disse resultatene ble det valgt å gå videre med formuleringen som hadde 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon.



Figur 6-4: Størrelsesfordeling dagen etter tillaging i (A) 0,15% SnF₂ (B) 0,2% SnF₂ og (C) 0,25% SnF₂.

Det ble fremstilt flere formuleringer med 0,07% kitosan:TPP 80:20 og startkonsentrasjon 0,2% SnF₂ for å undersøke om resultatene var reproduerbare (figur 6-5). Disse ble karakterisert dagen etter fremstilling. I tillegg var det ønskelig å følge opp formuleringene 1 uke etter fremstilling. Det ble ikke foretatt nye målinger av prøvene etter 1 uke siden prøvene hadde synlige tegn på aggregater og faseseparasjon.



Figur 6-5: Figuren illustrerer gjennomsnittlig partikkelstørrelse (z-average) og polydispersitetsindeks (PDI) for de ulike batchene av 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon. Det ble lagd to paralleller av hver batch.

Tabell 6-4: Reproduserbarhet av 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon.

Batch nr.	Z-ave	PDI
1	66	0,19
2	62	0,20
3	77	0,12
4	59	0,22

Gjennomsnitt	66,3	0,2
Standard avvik	7,8	0,0
Relativ standard avvik (%)	11,6	24,1

Tabell 6-4 viser reproduserbarheten av metoden og den utvalgte formuleringen 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂. Resultatene viser at reproduserbarheten varierer fra batch til batch, men alle batchene viste nanopartikler med akseptable partikkelstørrelser og PDI. Den som skiller seg mest ut er batch nr.3 med høyest partikkelstørrelse og lavest PDI (figur 6-5). Det er vanskelig å si om dette skyldes fremstillingsprosedyren, men den store variasjonen mellom batchene tyder på at fremstillingsprosessen kunne vært optimalisert ytterligere for å unngå avvik mellom formuleringene. Nanopartiklene som ble fremstilt hadde tilfredsstillende størrelse og PDI, men var ikke stabile i mer enn 1 uke. Det ble derfor besluttet å undersøke om stabiliteten av formuleringen med 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon kunne forbedres ytterligere.

6.2 Forbedring av stabilitet

6.2.1 Nanopartikler basert på kitosan

In vitro stabiliteten av formuleringen basert på 0,07% kitosan:TPP 80:20 og startkonsentrasjon 0,2% SnF ble undersøkt videre siden den viste de mest lovende resultatene vedrørende partikkelstørrelse (50-80 nm) og PDI (0,1-0,2) i innledende forsøk. For å forbedre stabiliteten av formuleringen ble gelfiltrering benyttet som metode for å fjerne ikke-innkapslet SnF₂. Konduktiviteten av Milli-Q vann, 0,05 M NaCl og SnF₂ 0,2% ble målt før og etter gelfiltrering for å undersøke om separasjonsmetoden var effektiv nok. Konduktivitet forteller noe om ledningsevnen til en løsning, og en høy konduktivitet betyr at det er mange ioner tilstede. Tabell 6-5 viser at konduktiviteten ble redusert etter gelfiltrering med Milli-Q vann og at separasjonsmetoden var i stand til å fjerne ikke-innkapslet SnF₂.

Tabell 6-5: Oversikt over målt konduktivitet før og etter gelfiltrering med Milli-Q vann.

Formulering	Konduktivitet	Kommentar
Før gelfiltrering		
0,2% SnF ₂ -løsning	0,397	
Milli-Q vann	0,0339	
Etter gelfiltrering		
<u>Kolonne 1</u>		
Milli-Q vann blind	0,00571	
0,2 % SnF ₂ -løsning, prøve 1	0,0723	
Vaskevannet	0,0351	Kolonnen ble skylt 3 ganger med 25 ml Milli-Q vann. Konduktiviteten ble målt etter 3.vask. pH = 6,01
0,2% SnF ₂ -løsning, prøve 2	0,0288	Prøve ble avsatt på samme kolonne som ble skylt etter 3.vask
<u>Kolonne 2</u>		
0,2% SnF ₂ -løsning, prøve 2	0,0273	Eluat fra kolonne 1 ble gelfiltrert i ny kolonne

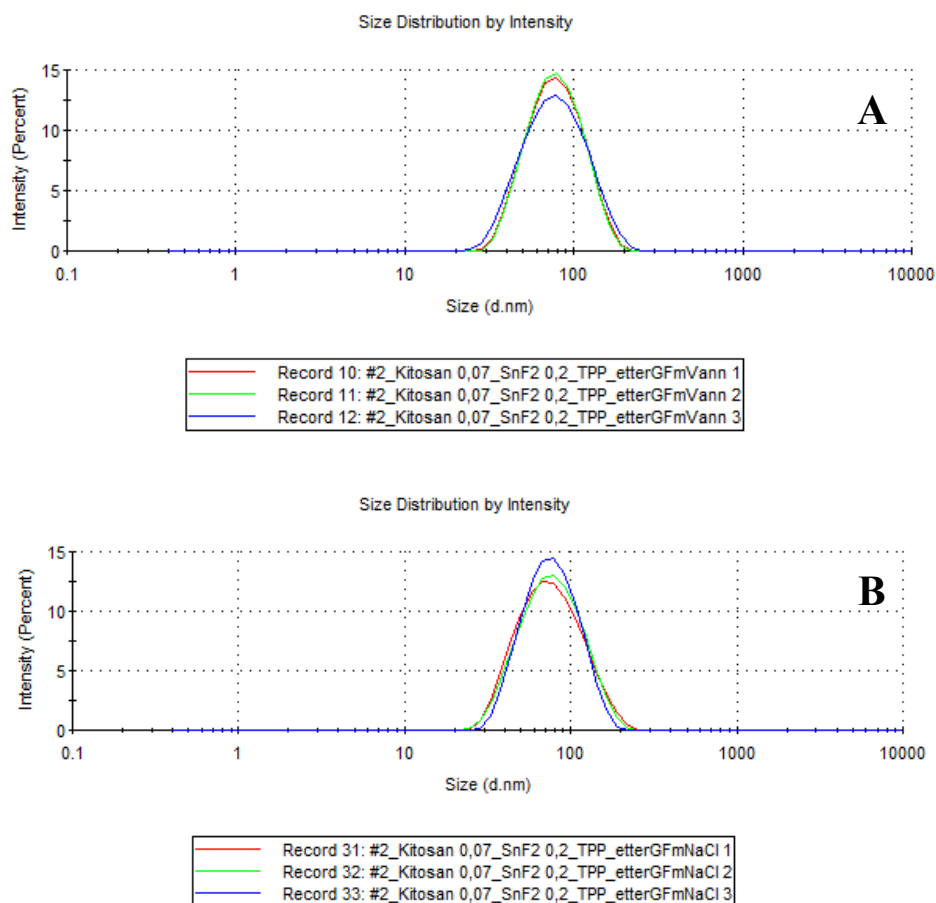
Som det fremgår av tabell 6-5 så er konduktiviteten av SnF₂-løsningen lavere etter gelfiltrering og eluering med Milli-Q vann. Konduktiviteten ble ytterligere redusert når kolonnen ble skylt tre ganger med 25 ml Milli-Q vann før ny prøve med 0,2% SnF₂ ble avsatt. Kolonnen var altså egnet til å fjerne av ikke-innkapslet SnF₂. Det ble derfor undersøkt videre om fjerning av ikke-innkapslet SnF₂ kunne bidra til å forbedre stabiliteten av kitosan-nanopartiklene med innkapslet SnF₂ ytterligere.

Enkelte studier har vist at man oppnår bedre stabilitet for nanopartikler fremstilt i nærvær av monovalente og divalente ioner (Jonassen, Treves et al. 2013). Det ble derfor undersøkt om 0,05 M NaCl kunne brukes som elueringsmiddel istedenfor Milli-Q vann ved gelfiltrering av formuleringen. Gelfiltreringen av nanopartiklene ble utført med to kolonner, én kolonne for hvert elueringsmiddel. Kolonnene ble skylt 3 ganger med 25 ml Milli-Q vann før parallell 2 av prøvene ble gelfiltrert. Størrelse, PDI, zetapotensial, konduktivitet og pH av nanopartiklene ble målt før og etter gelfiltrering med Milli-Q vann og 0,05 M NaCl som elueringsmiddel (tabell 6-6).

Tabell 6-6: Måling av partikkelstørrelse, PDI, zetapotensialkonduktivitet og pH av 0,07% kitosan:TPP med 0,02% SnF₂ som startkonsentrasjon før og etter gelfiltrering med Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl som elueringsmiddel. Gelfiltreringen ble utført med samme kolonne for begge parallellene. Kolonnene ble skylt 3 ganger med 25 ml Milli-Q vann før neste parallell ble gelfiltrert.

Formulering	Z-Ave (d.nm) Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	PDI Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	Zeta pot. (mV) Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 5)	Konduktivitet Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 5)	pH
Før gelfiltrering					
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 1	62,5 ± 0,4	0,208 ± 0,007	24,8 ± 0,4	0,89 ± 0,02	2,99
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 2	56,4 ± 0,1	0,234 ± 0,004	77 ± 2	0,763 ± 0,007	3,04
Etter gelfiltrering med Milli-Q vann					
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 1	69,2 ± 0,8	0,30 ± 0,01	30,9 ± 0,6	0,263 ± 0,001	4,13
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 2	62,7 ± 0,5	0,179 ± 0,005	32,4 ± 0,7	0,205 ± 0,003	3,53
Etter gelfiltrering med 0,05 M NaCl					
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 1	67,4 ± 0,7	0,28 ± 0,02	26 ± 2	0,42 ± 0,02	4,10
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 2	63,6 ± 0,7	0,17 ± 0,01	34,6 ± 0,8	0,140 ± 0,002	3,71

Karakteriseringen av prøveløsningene før og etter gelfiltrering viser at det ikke er stor forskjell mellom gelfiltrering med Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl. Felles for begge elueringsmidlene er økt partikkelstørrelse og pH, og redusert PDI etter gelfiltrering. Ved begge elueringsmidlene var også konduktiviteten lavere etter gelfiltrering. Lavere pH og konduktivitet etter gelfiltrering viser at gelfiltreringen klarer å fjerne SnF_2 . Mellom de ulike parallellene viste resultatene at parallell 2 hadde høyere zetapotensial, men lavere partikkelstørrelse og PDI enn parallell 1 etter gelfiltrering ved begge elueringsmidlene. Det kan tyde på at bruk av samme kolonne for begge parallellene påvirker effekten av gelfiltreringen. Intensitetsplottene (figur 6-6) viste at størrelsesfordelingen var unimodal etter gelfiltrering med de to ulike elueringsmidlene.



Figur 6-6: Størrelsesfordeling etter gelfiltrering med Milli-Q vann (A) og 0,05 M NaCl (B) for nanopartikler av 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF_2 som startkonsentrasjon.

Størrelsen av de gelfiltrerte nanopartiklene med kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ble målt også 4 dager etter gelfiltrering med Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl. (tabell 6-7). De gelfiltrerte nanopartiklene ble oppbevart i kjøleskap (~4°C) mellom målingene.

Tabell 6-7: Måling av partikkelstørrelse og PDI for gelfiltrerte nanopartikler med kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon 4 dager etter gelfiltrering med Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl.

Formulering	Z-Ave (d.nm) Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	PDI Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)
Etter gelfiltrering med Milli-Q vann		
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 1	92,1 ± 0,6	0,221 ± 0,008
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 2	746 ± 10	0,57 ± 0,05
Etter gelfiltrering med 0,05 M NaCl		
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 1	152,6 ± 0,8	0,270 ± 0,006
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂ Parallell 2	1563 ± 1639	0,4 ± 0,2

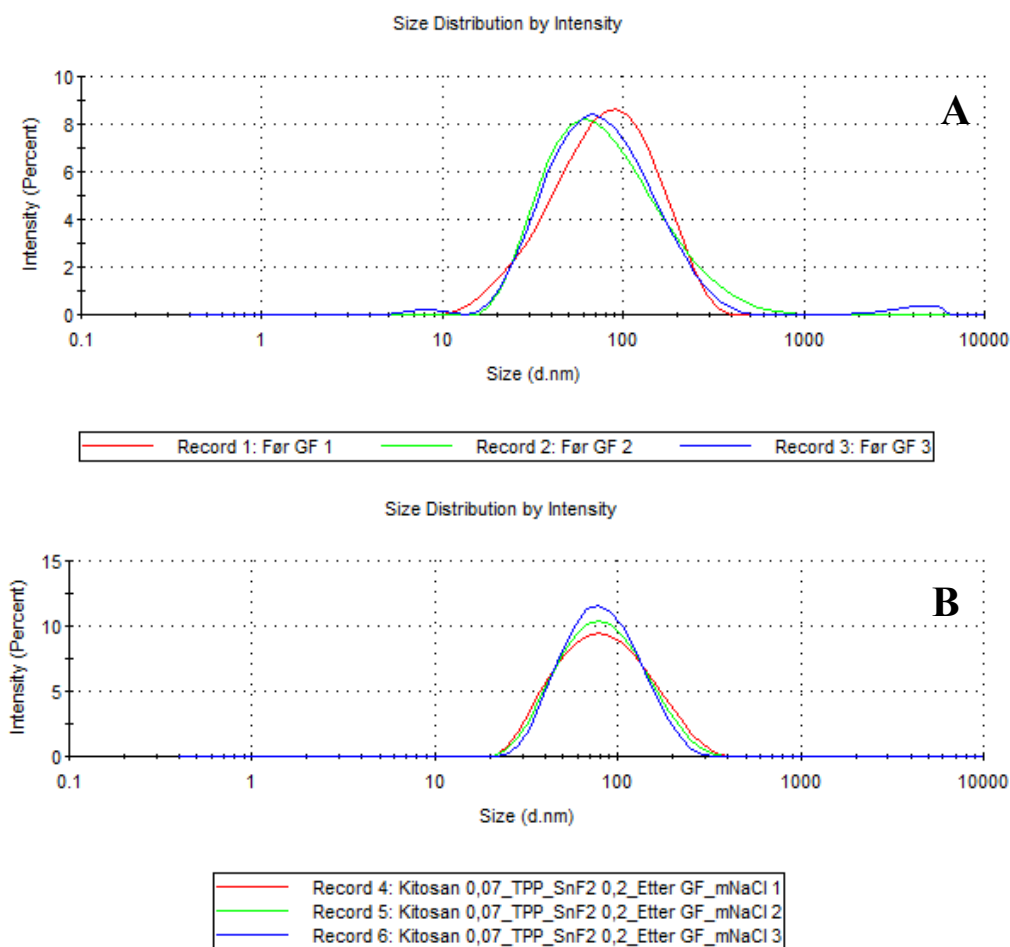
Målingene viste høyere verdier av både størrelse og PDI 4 dager etter gelfiltrering med elueringsmidlene. Det var en enda større forskjell i størrelse og PDI mellom parallellene etter 4 dager. Det ble også utført gelfiltrering av 0,07% kitosan:TPP med 0,25% SnF₂ som startkonsentrasjon med enten Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl som elueringsmiddel. I dette tilfellet ble det ikke benyttet samme kolonne for parallellene, men nye kolonner for hver gelfiltrering. Resultatene viste at gelfiltrering med de ulike elueringsmidlene ikke ga noen forskjell mellom bruk av Milli-Q eller 0,05 M NaCl i dette forsøket heller. I tillegg var det ingen forskjell mellom parallellene ved bruk av nye kolonner for hver gelfiltrering. Det ble derfor valgt å benytte nye kolonner for hver gelfiltrering senere for å unngå forskjell i resultatene mellom parallellene.

Det var ingen forskjell mellom Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl som elueringsmiddel, fordi eluering med 0,05 M NaCl fører til at kolonnene tar til seg ionene. Dette fører til at nanopartiklene gelfiltreres på samme måte som når man benytter Milli-Q vann som elueringsmiddel. Det ble derfor undersøkt videre om det var mulig å forbedre stabiliteten ved å modifisere gelfiltreringsmetoden. Det ble valgt å benytte 0,05 M NaCl som elueringsmiddel siden man tidligere har påvist bedre stabilitet for nanopartikler i nærvær av salt (Jonassen, Treves et al. 2013). Men for å unngå at saltet forsvinner i kolonnen, ble det forsøkt å mette kolonnen med 25 ml 0,05 M NaCl før prøven ble avsatt. Tabell 6-8 viser at PDI ble redusert etter gelfiltrering sammenlignet med verdiene før gelfiltrering dersom kolonnen ble mettet med NaCl før prøve ble avsatt.

Tabell 6-8: Målinger av størrelse og PDI for 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon etter gelfiltrering med 0,05 M NaCl, der kolonnen er mettet med 25 ml 0,05 M NaCl.

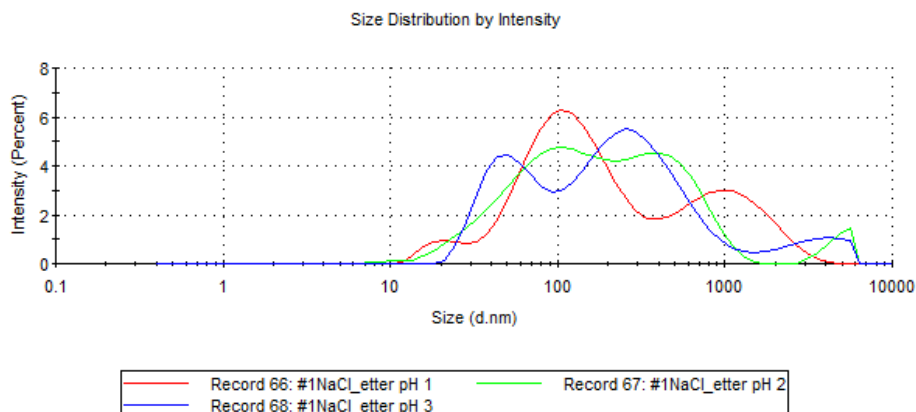
Formulering	Z-Ave (d.nm) Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)	PDI Gjennomsnitt ± st.avvik (n = 3)
Før gelfiltrering		
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂	64,2 ± 0,5	0,278 ± 0,002
Etter gelfiltrering		
0,07% kitosan + TPP (80:20) + 0,2% SnF ₂	72,2 ± 0,1	0,2 ± 0,01

Målinger viste at partikkelstørrelsen økte etter gelfiltrering. PDI var lavere etter gelfiltrering mest sannsynlig fordi store partikler ble igjen i kolonnen. Intensitetsplottet for nanopartiklene før gelfiltrering viste to topper, mens intensitetsplottet etter gelfiltrering viste kun en unimodal fordeling av partikkelstørrelsene (figur 6-7). I tillegg var toppene smalere etter gelfiltrering.



Figur 6-7: Størrelsesfordeling for nanopartikler av 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon før gelfiltrering (A) og etter gelfiltrering med 0,05 M NaCl, der kolonnen er mettet med 25 ml 0,05 M NaCl (B).

Det ble videre undersøkt om de gelfiltrerte nanopartiklene med 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ville være stabil ved pH 5. Dette er gunstig med tanke på at kritisk pH for demineralisering av tannemaljen som følge av syreangrep er rundt pH 5-5,5 (Kuchta and Szymańska 2014). Stabilitet av formuleringen ved pH 5 indikerer mulig bruk i kariesprofylakse og forebygging mot erosjon. Amin-gruppene ($pK_a \approx 6-7$) på kitosankjedene vil være protonert og ha positiv ladning når pH er lavere enn pK_a (Kean and Thanou 2010). Prøvene som ble gelfiltrert med Milli-Q vann og 0,05 M NaCl ble pH-justert med 0,1 M NaOH for å undersøke om SnF₂ ville felles ut. Det ble observert synlige utfellinger ved pH \approx 5. Intensitetsplottet i figur 6-8 viser størrelsesfordelingen av nanopartiklene etter gelfiltrering med NaCl og pH-justering.



Figur 6-8: Størrelsesfordeling av gelfiltrerte nanopartikler med 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ ved pH = 5,21. Nanopartiklene ble gelfiltrert med 0,05 M NaCl som elueringsmiddel, der kolonnen ble mettet med 25 ml 0,05 M NaCl før prøven ble avsatt.

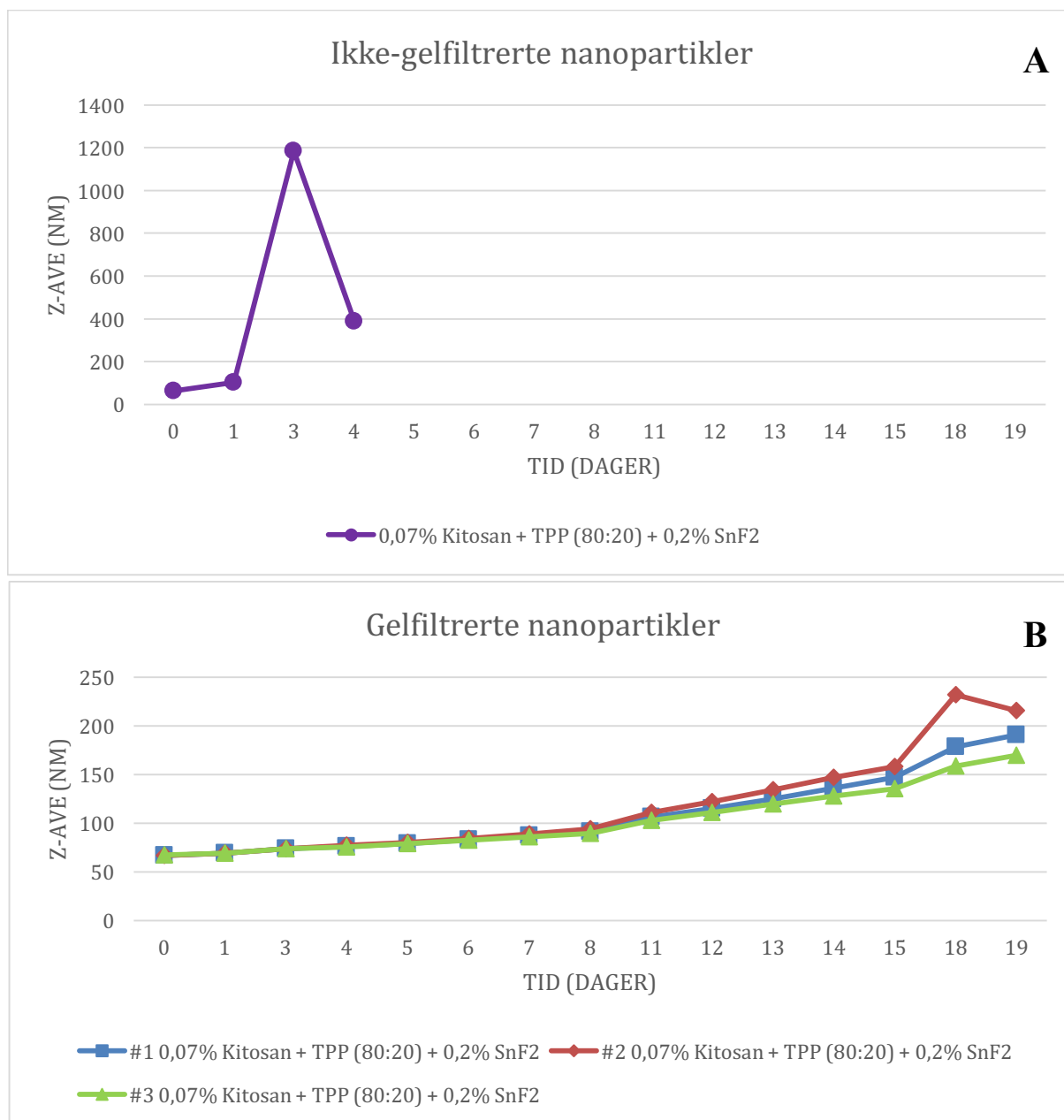
Intensitetsplottet av de gelfiltrerte nanopartiklene bekrefter at formuleringen var ustabil når pH = 5,21. Til tross for at de gelfiltrerte nanopartiklene feller ut SnF₂ når pH > 5,21, var det ønskelig å vurdere stabiliteten av nanopartiklene (0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon) som ble gelfiltrert med 0,05 M NaCl og der kolonnen ble mettet med salt før prøven ble avsatt over en lengre periode, siden disse nanopartiklene viste de beste resultatene med hensyn til partikkelstørrelse, PDI og pH. Den endelige gelfiltreringsprosessen bestod altså av å mette kolonnen først med 25 ml 0,05 M NaCl før prøve ble avsatt og bruk av 0,05 M NaCl som elueringsmiddel.

6.2.2 Stabilitetsstudier

Resultatene i innledende forsøk viste at gelfiltrering med 0,05 M NaCl som elueringsmiddel og der kolonnene ble mettet først med salt før prøven ble avsatt ga nanopartikler med tilfredsstillende størrelse (~60-70 nm) og PDI (~0,2). Stabiliteten til de gelfiltrerte nanopartiklene av 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ble fulgt over en periode for å kartlegge hvor lenge de forble stabile med hensyn til størrelse, PDI og pH. Prøvene ble oppbevart i kjøleskap under stabilitetsstudiene.

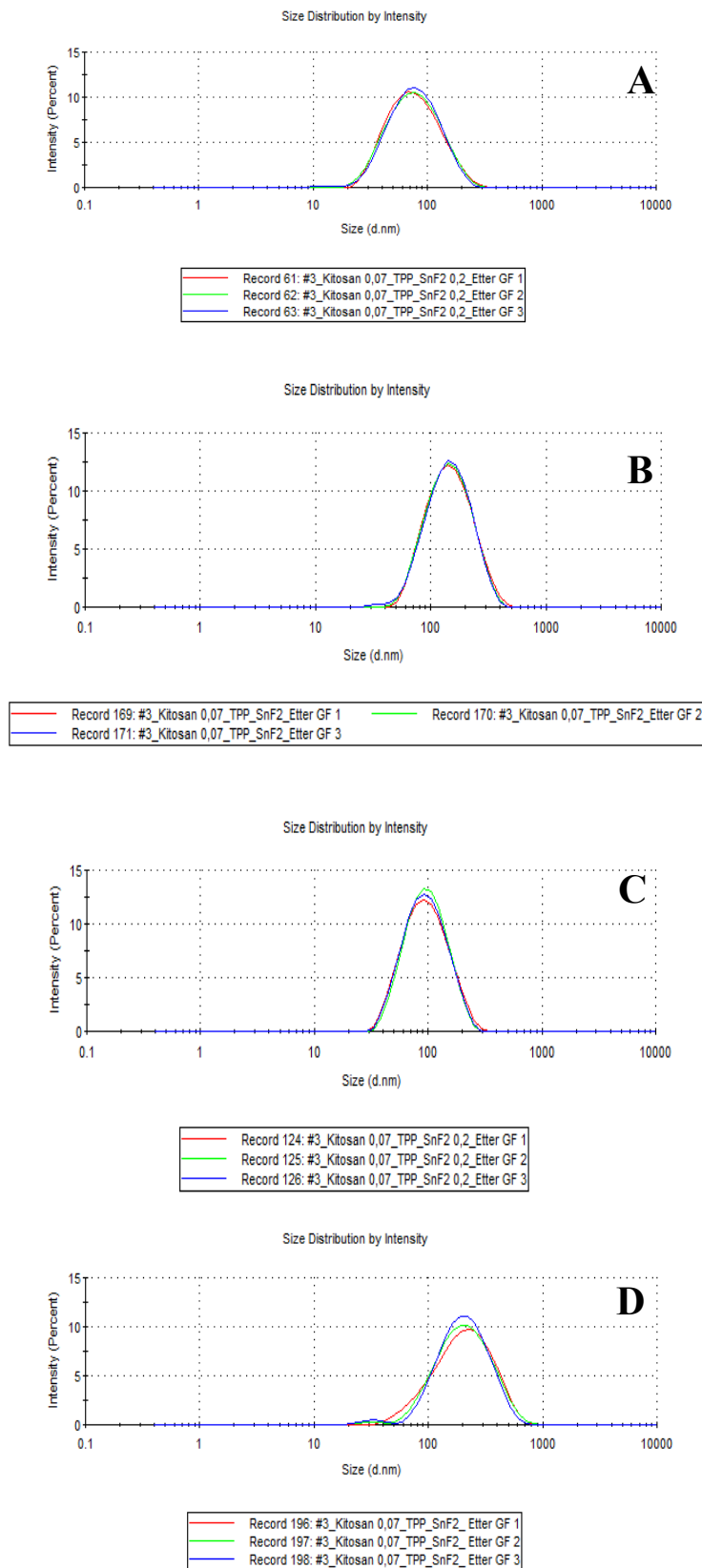
Størrelse

Partikkelstørrelsen til den utvalgte formuleringen med kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ble målt over en tidsperiode på i underkant av 3 uker (figur 6-8). Partikkelstørrelsen av ikke-gelfiltrerte nanopartikler økte drastisk fra dag 1 til dag 3, før det ble redusert igjen fra dag 3 til dag 4. Mest sannsynlig skyldes endringen i partikkelstørrelse aggregatdannelse og sedimentasjon. Det var ikke mulig å følge opp den ikke-gelfiltrerte prøven etter dag 4 siden det var synlige tegn på aggregatdannelse. For de gelfiltrerte nanopartikler kan man observere en svak økning av partikkelstørrelsen fram mot dag 8. Fra dag 8 mot dag 15 øker partikkelstørrelsen av nanopartiklene ytterligere. Etter omtrent 2 uker er partikkelstørrelsen fordoblet.



Figur 6-9: Endring i størrelse som funksjon av tid for ikke-gelfiltrerte nanopartikler (A) og gelfiltrerte nanopartikler (B). Nanopartiklene bestod av 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon. Nanopartiklene ble oppbevart i kjøleskap mellom hver måling.

Visuelle observasjoner ble foretatt før hver måling, og prøvene var klare fram til dag 15. Etter denne dagen ble det etter hvert mer synlig for det blotte øyet at det var dannet aggregater. Størrelsesfordelingen av prøvene på ulike dager (figur 6-10) viste en unimodal topp, bortsett fra størrelsesfordelingen på dag 19. Her kan man observere at størrelsesfordelingen er fordelt på en stor topp og en mindre venstreskjev topp.

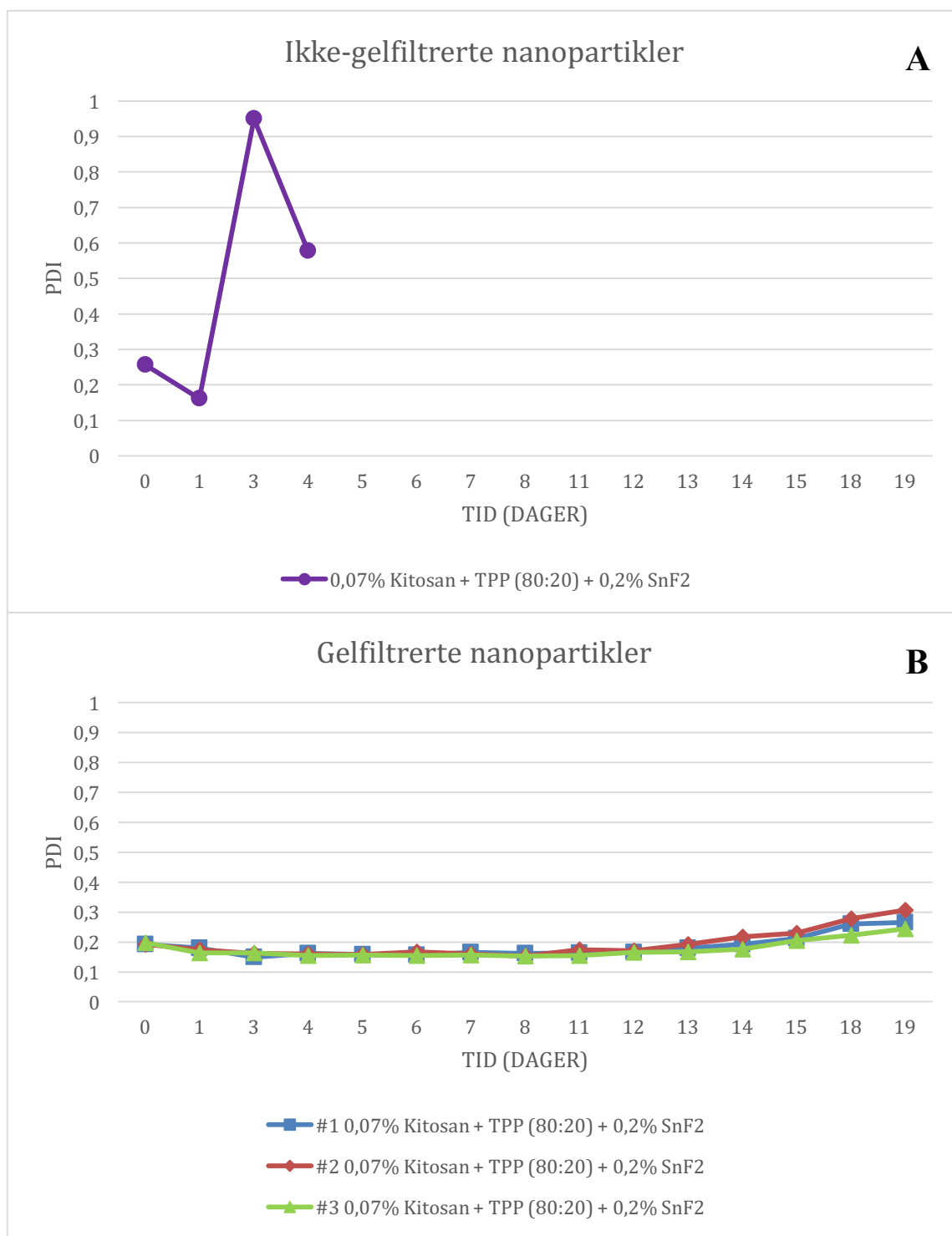


Figur 6-10: Størrelsesfordeling for gelfiltrerte nanopartikler av 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon på dag 0 (A), etter 7 dager (B), etter 14 dager (C) og etter 19 dager (D). Nanopartiklene ble oppbevart i kjøleskap mellom målingene.

I figur 6-10C kan man observere at toppen er forskjøvet mot venstre sammenlignet med de andre intensitetsplottene, og at partiklene har mindre størrelse. Dette tyder på begynnende aggregering og sedimentasjon av de største partiklene før målingen starter, det vil si under ekvilibreringstiden i Nanosizeren.

PDI

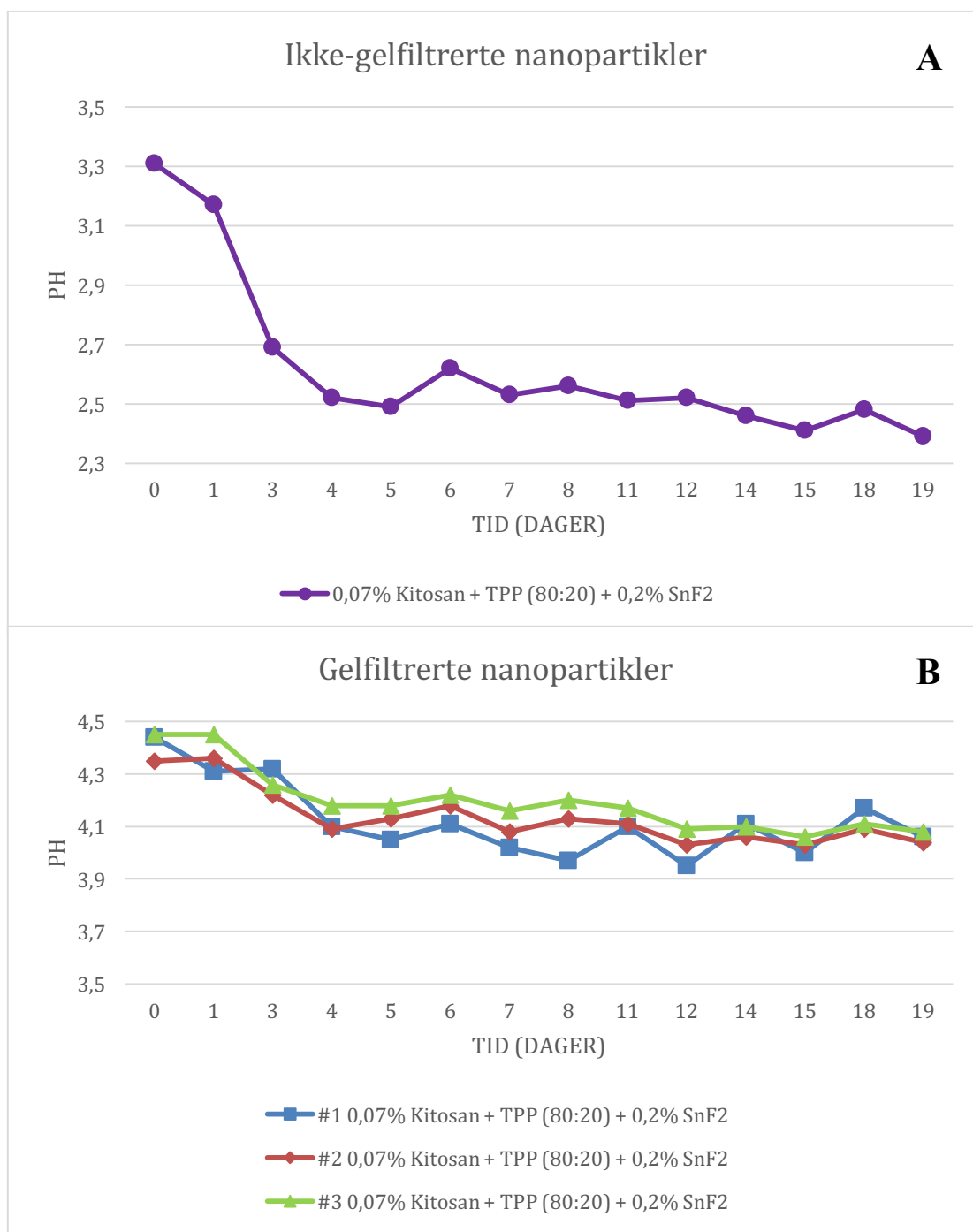
For ikke-gelfiltrerte nanopartikler var det ikke mulig å måle størrelse og PDI etter dag 4 grunnet dannelse av aggregater i prøven (figur 6-11A). PDI forble tilnærmet uendret for de gelfiltrerte nanopartiklene i omtrent en uke. I likhet med størrelsesfordelingen, begynner PDI å øke fra dag 11-12 (figur 6-11B).



Figur 6-11: Endring av PDI som funksjon av tid for ikke-gelfiltrerte nanopartikler (A) og gelfiltrert nanopartikler (B). De gelfiltrerte nanopartiklene 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ble eluert med 0,05 M NaCl og mettet kolonne, og ble oppbevart i kjøleskap mellom hver måling.

pH

pH hos ikke-gelfiltrerte nanopartikler falt drastisk i løpet av de tre første dagene, og holdt deretter en ganske stabil pH rundt 2,4-2,5 i løpet av de neste to ukene (figur 6-12A). Dersom man sammenligner pH-verdien initielt på dag 0 hos ikke-gelfiltrerte og gelfiltrerte nanopartikler, kan man observere at pH er høyere hos formuleringen som er gelfiltrert. Dette skyldes at ikke-innkapslet SnF_2 har blitt fjernet under gelfiltreringen. Løsninger med 0,2% SnF_2 har en lav pH (~2,8). De tre parallellene med gelfiltrerte nanopartikler viser at pH synker drastisk i løpet av de tre første dagene i likhet med ikke-gelfiltrerte nanopartikler før det stabiliserer seg. Tendensen er altså den samme uavhengig av om prøvene har blitt gelfiltrert eller ikke. Denne pH-endringen kan være en indikasjon på at formuleringen ustabil og at SnF_2 gradvis lekker ut av nanopartiklene.



Figur 6-12: Endringer i pH som funksjon av tid for ikke-gelfiltrerte nanopartikler (A) og gelfiltrerte nanopartikler (B). Nanopartiklene bestod av 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon. Gelfiltrerte nanopartikler ble eluert med 0,05 M NaCl, der kolonnen ble mettet med 25 ml 0,05 M NaCl. Nanopartiklene ble oppbevart i kjøleskap mellom hver måling.

6.3 Adsorpsjon av nanopartikler til hydroksoapatitt (HA)

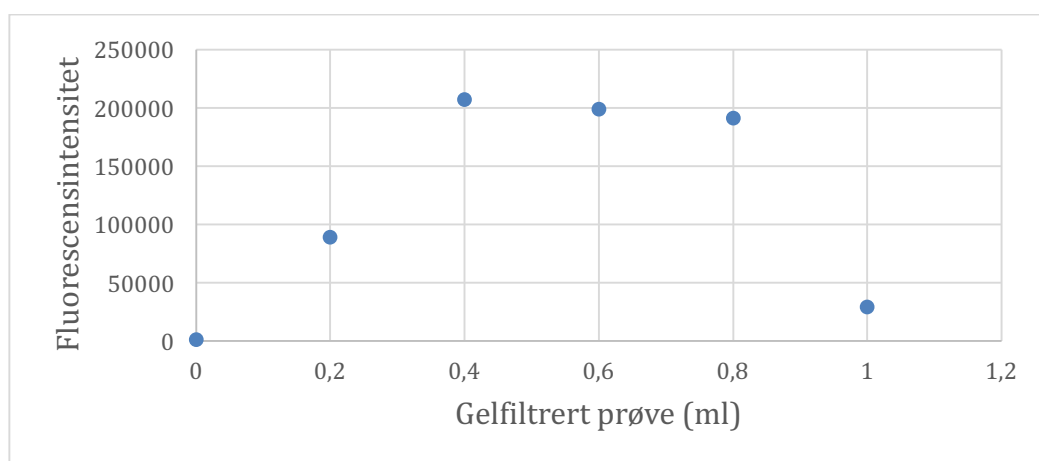
Resultatene fra innledende forsøk viste at nanopartikler av 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon ga de mest tilfredsstillende nanopartiklene med hensyn til størrelse (50-80 nm) og PDI (0,1-0,2). Forsøk viste at stabiliteten av nanopartiklene økte ved bruk av gelfiltrering med 0,05 M NaCl som elueringsmiddel, og dersom kolonnene ble mettet først med 25 ml 0,05 M NaCl før prøve ble avsatt. De gelfiltrerte nanopartiklene ble derfor benyttet videre i adsorpsjonseksperimentet, der hensikten var å estimere andel fluorescerende nanopartikler som adsorberes til HA.

Gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler ble fortynnet i ulik grad med enten fosfatbuffer eller NaCl. Dette dannet grunnlaget for kalibreringskurven og ligningen som ble benyttet videre for å bestemme mengde andel adsorberte nanopartikler til HA. Avleste fluorescensverdier i supernatanten på prøven ble deretter beregnet ved hjelp av ligningen fra kalibreringskurven. Fluorescensnivåene i prøven må være direkte proporsjonal med fluorescensnivåene i standardene for at det skal være mulig å beregne mengde fluorescens som adsorberes til HA. Fosfatbuffer (10 mM, pH 6,8) ble i første omgang benyttet til å hydrere HA og som fortynningsmiddel for standardene. Det viste seg å være utfordrende å oppnå en akseptabel kalibreringskurve som var lineær siden fluorescensen er pH-avhengig (Zhang, Gong et al. 2009, Liu, Maruyama et al. 2014). Standardene ble fortynnet med ulik mengde buffer slik at pH i standardene ble forskjellige (tabell 6-9).

Tabell 6-9: Oversikt over tillagingen av de ulike standardene med tilsatt mengde fosfatbuffer som fortynningsmiddel og mengde gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler. Avleste pH-verdier er angitt for de ulike konsentrasjonene.

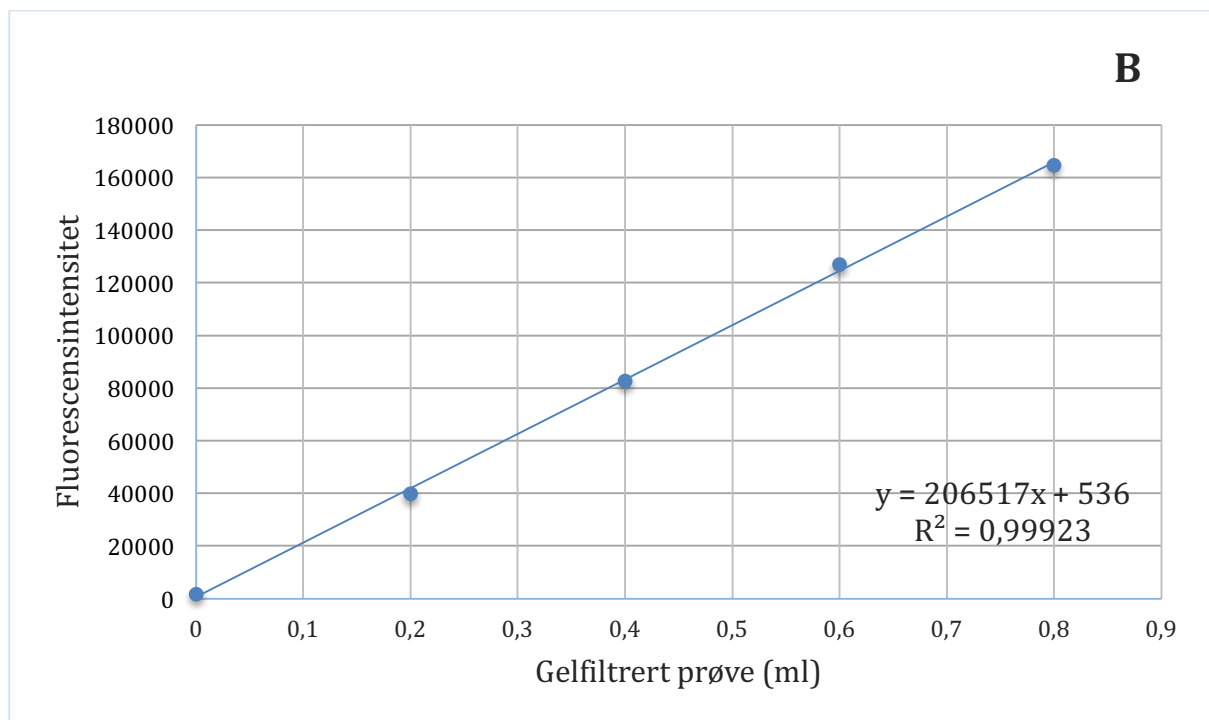
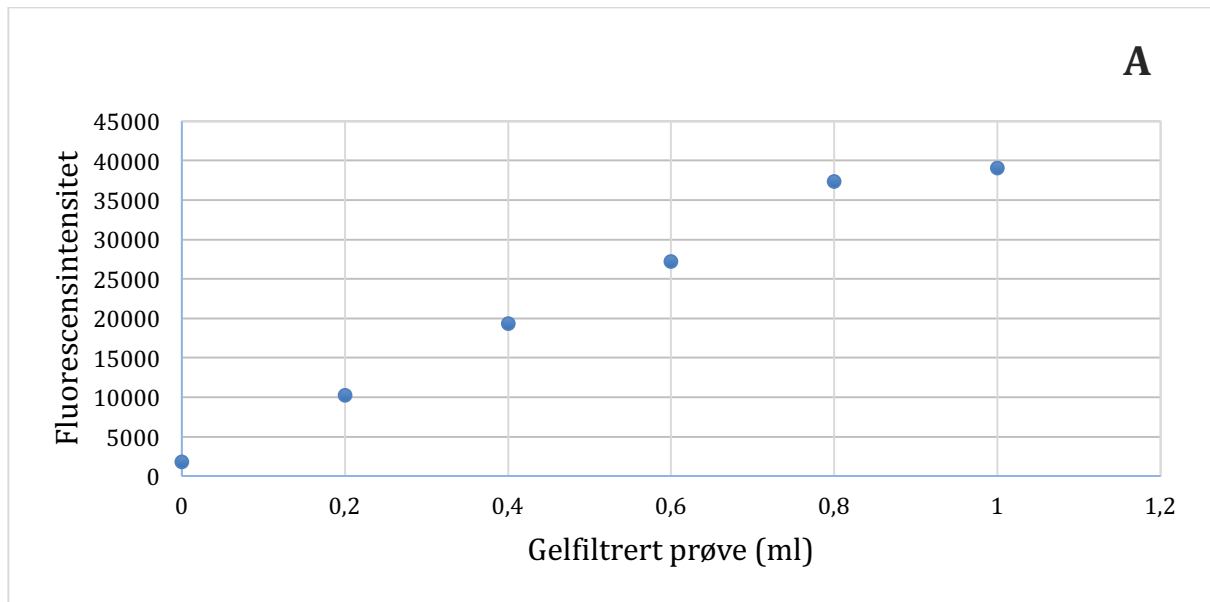
Standard (%)	Mengde gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler (ml)	Mengde fosfatbuffer (ml)	pH
100	1	0	2,83
80	0,8	0,2	3,07
60	0,6	0,4	3,53
40	0,4	0,6	4,22
20	0,2	0,8	6,4
0	0	1	6,88

pH-målinger viste at pH økte når mengden gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler ble redusert i forhold til mengden fosfatbuffer. Dette ga en uakseptabel kalibreringskurve (figur 6-13). For å oppnå kalibreringsløsninger med samme pH, ble det derfor forsøkt å erstatte fosfatbuffer med 0,05 M NaCl som løsningsmiddel i adsorpsjonseksperimentet. På denne måten var løsningsmiddelet den samme overalt i adsorpsjonsprosessen og ved gelfiltrering.

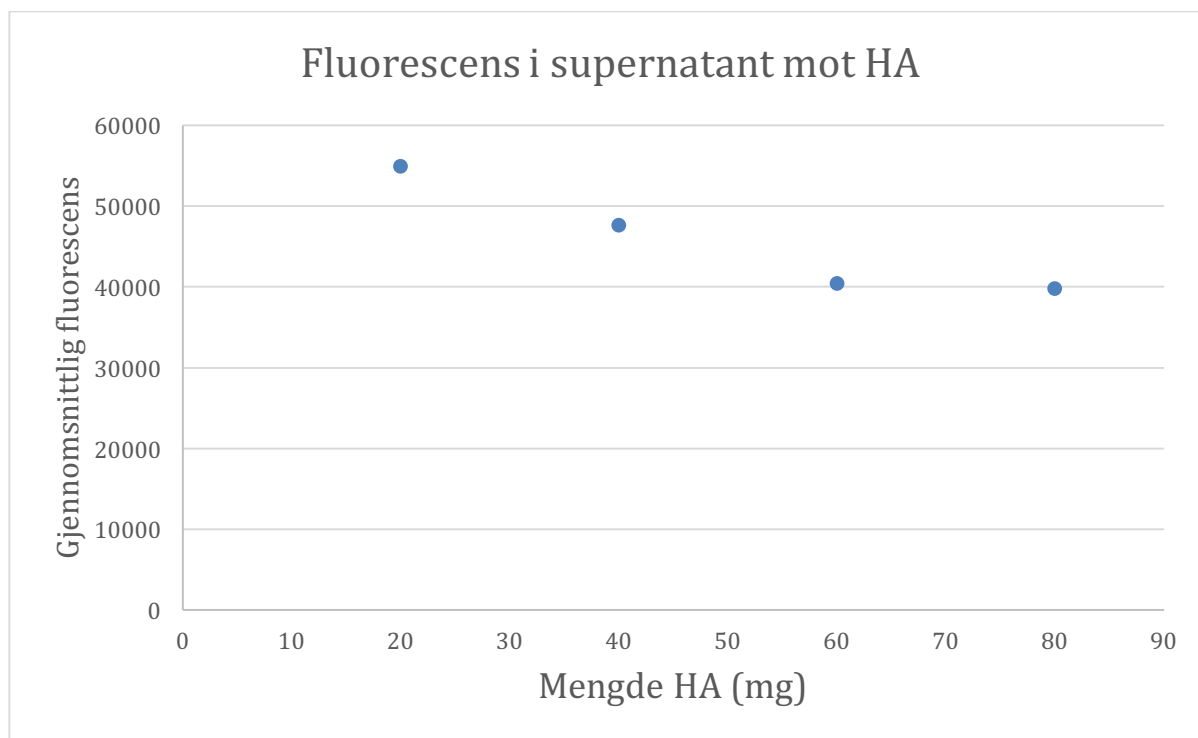


Figur 6-13: Kalibreringskurve av standarder med gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler og 10 mM fosfatbuffer pH 6,8 som fortynningsmiddel.

Det var mulig å oppnå en kalibreringskurve som var lineær ved bruk av 0,05 M NaCl som fortynningsmiddel (figur 6-14A). Det var likevel ikke mulig å benytte ligningen fra kalibreringskurven til å beregne mengde adsorbert nanopartikler til HA siden standardene og supernatantene var i to ulike pH-områder. Standardene hadde pH mellom 4 og 5, mens supernatantene hadde pH mellom 6 og 7. 0,1 M NaOH ble derfor benyttet for å pH-justere standardene slik at supernatantene og standardene var i samme pH-område, pH ~6. Figur 6-14B viser kalibreringskurve med 0,05 M NaCl som fortynningsmiddel og med pH-justerte standarder. Ligningen fra kalibreringskurven (figur 6-14B) viser en korrelasjonskoeffisient (R^2) tilnærmet 1. Det er en sterk sammenheng mellom fluorescens og konsentrasjonen av gelfiltrert prøve i standardene R^2 nærmer seg 1.



Figur 6-14: Kalibreringskurve med 0,05 M NaCl som løsningsmiddel uten pH-justerte standarder (A) og med pH-justerte standarder (B). Standardene ble pH-justert med 0,1 M NaOH slik at de var i samme pH-område som supernatantene, pH ~6.



Figur 6-15: Sammenhengen mellom mengde HA og gjennomsnittlig fluorescens hos supernatantene.

Estimering av andel nanopartikler adsorbert til HA

Ligningen fra kalibreringskurven (figur 6-11B) ble benyttet videre til å beregne hvor stor andel av kitosan-nanopartiklene som adsorberes til HA. Det høyeste punktet i figur 6-14B avviker fra linjen, og dette skyldes mest sannsynlig av at konsentrasjonen er så høy at det oppstår quenching. Punktet ble derfor utelatt ved beregning av ligningen for kurven. Resultatene viste at intensiteten av fluorescens var avtakende når mengden HA økte (figur 6-15). Beregningene viste at adsorpsjonen av nanopartiklene til HA økte jo mer HA som var tilstede (tabell 6-10).

Tabell 6-10: Oversikt over avlest fluorescensintensitet i supernatantene og blindprøvene B1 og B2 ved angitt HA tilsatt i prøvene.

HA (mg)	20	40	60	80	0	0
Prøve nr.	1	2	3	4	B1	B2
Parallell 1	55487	48799	41147	40348	26704	26808
Parallell 2	55317	47491	39991	39598	26813	26338
Parallell 3	53962	47532	40067	39347	26139	25959
Gjennomsnittlig fluorescens	54922	47641	40402	39764	26552	26368
Ikke-adsorberte nanopartikler	26%	22,27%	18%	18%	11%	11%
Adsorberte nanopartikler	74%	77,73%	82%	82%	89%	89%

Beregningen av andel nanopartikler som adsorberes til HA ble gjort ved hjelp av formelen angitt under kapittel 4.4.3. Det ble laget to blindprøver (B1 og B2) som inneholdt kun gelfiltrert prøve og 0,05 M NaCl. Blindprøvene skal teoretisk sett angi null adsorpsjon eller 100% nanopartikler i supernatanten. Beregningene viste at blindprøvene oppnådde en tilsynelatende høyere andel adsorberte nanopartikler på tross av fravær av HA enn supernatantene som inneholdt HA. I likhet med standardene som inneholdt ulik mengde av gelfiltrert prøve og NaCl, så burde blindprøvene også ha blitt pH-justert slik at de var i samme pH-område som supernatantene for at ligningen fra kalibreringskurven kunne bli benyttet. I dette tilfellet var ikke blindprøvene B1 og B2 pH-justert og andelen adsorberte nanopartikler vil derfor være misvisende.

7 Diskusjon

7.1 Utvikling av formulering

Det har tidligere blitt kartlagt betingelser for fremstilling av polymere nanopartikler med innkapslet natriumfluorid (NaF) (Nguyen, Escudero et al. 2017). Hensikten med denne oppgaven var å utvikle formuleringer med innkapslet tinnfluorid (SnF_2). Studier har vist at SnF_2 har en lovende effekt som profylakse mot karies og erosjon (Willumsen, Gaard et al. 2004, Hove, Holme et al. 2007, Rølla, Vik et al. 2011, John, Beata et al. 2013). Denne effekten henger blant annet sammen med at SnF_2 har en antibakteriell virkning som forhindrer videre dannelse av plakk og utvikling av karies (John, Beata et al. 2013). Syreangrep i forbindelse med utvikling av karies og erosjon kan forhindres ved tilførsel av SnF_2 siden det fremmer dannelsen av hydrogenfluorid (HF) i større grad enn ved tilførsel av NaF. HF er essensiell i dannelsen av det beskyttende laget CaF_2 på syreutsatte tannoverflater (Rølla, Vik et al. 2011). Det ble undersøkt om polymerer med negativ og positiv ladning sammen med kryssbindere av motsatt ladning kunne benyttes til å lage nanopartikler med innkapslet SnF_2 .

Nanopartikler av AM-pektin var vanskelig å fremstille og i enkelte formuleringer var det allerede små tegn til aggregater ved tillaging. Visuelle observasjoner av formuleringene foretatt dagen etter tillaging tyder på at viskositeten av prøvene økte jo høyere konsentrasjon av SnF_2 som var blitt benyttet under tillagingen. Det er kjent at LM (lav-metoksylert) pektin kan danne gel via en eggboks-struktur i nærvær av toverdige kationer som Ca^{2+} eller Zn^{2+} . AM-pektin danner gel på lignende måte som LM-pektin, men det har blitt observert at det trengs mindre av toverdig kation tilstede for at geling skal inntre. For AM-pektin er det også sannsynlig at hydrofobe interaksjoner og hydrogenbindinger er involvert i gelingsprosessen. Karboksylgruppene i pektin har en pK_a -verdi ca. 3,5, og pektin vil være ladet når pH er høyere enn pK_a . I rensset vann vil det derfor være frastøtende krefter mellom ioniserte polymerkjeder noe som bidrar til en utstrakt konformasjon av polymerkjedene hos LM-pektin (Sriamornsak 2011). Ved tilsetning av en kryssbinder som sinkklorid (ZnCl_2) skal man i teorien kunne danne nanopartikler via ionisk kryssbinding. Jonassen, Treves et al. klarte å fremstille nanopartikler med AM-pektin og ZnCl_2 (Jonassen, Treves et al. 2013). I denne oppgaven har det blitt forsøkt å innkapsle SnF_2 med den samme konsentrasjonen av pektin

(0,07%), og den samme ratio mellom pektin og ZnCl_2 (85:15) som nevnt i artikkelen. I likhet med artikkelen var det i denne oppgaven utfordrende å fremstille nanopartikler av pektin, ZnCl_2 og innkapslet SnF_2 i vann. I rensset vann vil polymerkjedene være utstrakte og bidra til å redusere overlappskonsentrasjonen. I tillegg vil pektins tilsynelatende molekylvekt øke som følge av intermolekylære bindinger. Dette vil igjen redusere overlappskonsentrasjonen ytterligere (Maleki, Kjøniksen et al. 2007, Al - Manasir, Kjøniksen et al. 2009). Ved tilsetning av ZnCl_2 kan polymerløsningen bli omdannet til en halvfortynnet polymerløsning istedenfor nanopartikler (Schillén, Brown et al. 1994). Disse reaksjonene kan forklare viskositeten som ble observert i prøvene. For å danne nanopartikler bør ionisk kryssbinding utføres i en fortynnet polymerløsning slik at det dannes en lokal gelingsprosess på innsiden av partikler (Schillén, Brown et al. 1994, Jonassen, Kjøniksen et al. 2012). Jonassen, Treves et al. klarte å fremstille nanopartikler med pektin og ZnCl_2 i NaCl. I artikkelen har de undersøkt om tilsetning av salt påvirker dannelsen av nanopartikler, og sammenlignet tillaging av nanopartikler i vann mot nanopartikler i 0,05 M NaCl. De oppdaget at tilsetning av salt redusert de frastøtende kreftene mellom polymerkjedene siden ladningene blir skjermet. Dette resulterer i færre intermolekylære bindinger mellom polymerkjedene og flere intramolekylære bindinger mellom de negativt ladde karboksylgruppene hos polymerkjeden. Det vil derfor være økt sannsynlighet for at polymerkjedene danner kompakte aggregater og eventuelle nanopartikler fremfor å være utstrakte (Jonassen, Treves et al. 2013). Ved tilsetning av SnF_2 er det derfor grunn til å tro at nanopartikler vil dannes som følge av at ladningene mellom polymerkjedene skjermes.

Det ble observert at formuleringene med 0,07% pektin var mer viskøse desto høyere konsentrasjon av SnF_2 som var tilstede i formuleringene. Som et forsøk på å fremstille nanopartikler og unngå geldannelse av prøvene, ble det prøvd ut formuleringer med lavere konsentrasjon av pektin og ZnCl_2 i kombinasjon med de to laveste konsentrasjonene av SnF_2 . Ved å redusere konsentrasjonen av pektin og den proporsjonale konsentrasjonen av ZnCl_2 , reduseres imidlertid også ionestyrken i løsningen. Jonassen, Treves et al. viste at zetapotensialet økte når konsentrasjonen av pektin økte. Det er en større sannsynlighet for at partikler vil danne aggregater og flokkulater når absolutt zetapotensial reduseres. En redusering av konsentrasjonen av pektin ga formuleringer som var mindre viskøse sammenlignet med de som var fremstilt med 0,07% pektin, i tråd med et som ble observert hos Jonassen, Treves et al.

I denne oppgaven viste alle formuleringer av pektin en økt viskositet ved visuelle observasjoner dagen etter fremstilling sammenlignet med prøvene fra fremstillingsdagen. Noen publikasjoner beskriver at LM-pektin geler ved sur pH (<3) (Lootens, Capel et al. 2003, Sriamornsak 2011). Den økte viskositeten som ble observert i prøvene kan skyldes tilstedeværelse av SnF_2 . Blindprøver av 0,05% pektin i rent vann hadde pH ca. 4,76, mens prøver av 0,2% og 0,1% SnF_2 tillagd i vann hadde pH til ca. 2,8. Målinger foretatt av formuleringer med 0,05% pektin, ZnCl_2 og SnF_2 (0,05% eller 0,1%) hadde pH ca. 3,14-3,15. Siden pH i formuleringen er lavere enn pektins pK_a (ca.3,5) vil dette bidra til at karboksylgruppene i pektin mister ladningen sin og dermed evnen til å danne bindinger med ZnCl_2 . Den observerte viskositeten i prøvene kan derfor tyde på at det er få eller ingen nanopartikler tilstede og dermed fritt SnF_2 som bidrar til å surgjøre løsningen. Dette reflekteres i intensitetsplottene av formuleringene som viste en multimodal størrelsesfordeling. PDI-verdiene var i tillegg høye (ingen var under 0,4). Måling av størrelse avslørte også at partiklene var store ($\sim 500\text{-}2000$ nm).

Det er vanskelig å si om tilsetning av SnF_2 fører til en konkurranse mellom kryssbinderen Zn^{2+} og Sn^{2+} , siden begge inneholder toverdige kationer. I tillegg er pektin en negativt ladet polymer i vann, noe som kan påvirke en eventuell innkapsling av SnF_2 siden fluoridionene også er negativt ladet. Dette kan i så fall bidra til at de negativt ladde ionene frastøter hverandre. Intensitetsplottene og PDI-verdiene viser at det er få partikler tilstede, selv ved redusert konsentrasjon av pektin.

Nanopartikler av kitosan var enklere å fremstille uavhengig av konsentrasjonen av SnF_2 . Det har tidligere blitt fremstilt vellykkede nanopartikler med 0,07% kitosan, der ratioen mellom kitosan og kryssbinderen TPP var 80:20, og NaF var innkapslet (Nguyen, Escudero et al. 2017). I denne oppgaven har den samme konsentrasjonen av kitosan, og ratio mellom kitosan og TPP blitt benyttet. Den eneste parameteren som det har blitt justert på under fremstillingen er konsentrasjonen av SnF_2 . Kitosan er en positiv ladet polymer i vann mens kryssbinderen tripolyfosfat (TPP) er negativt ladet. I likhet med pektin har kitosan også en utstrakt konformasjon i vann som følge av at det er frastøtende krefter mellom de protonerte amingruppene ($\text{pK}_a \approx 6\text{-}7$) hos kitosan. I motsetning til pektin var det ingen problemer med å fremstille nanopartikler med innkapslet SnF_2 med kitosan som polymer og TPP som

kryssbinder. Nanopartikler av kitosan:TPP og SnF_2 hadde lave pH-verdier (3-4), og dette var gunstig med tanke på at amingruppene i kitosan var ladet. Formuleringer med pektin hadde derimot pH (~ 3) rett under pektins pK_a (ca. 3,5), og dette bidro til en mindre grad av ionisering av amingruppene og dannelse av nanopartikler. Det er mulig at SnF_2 skjermer ladningen mellom de protonerte amingruppene hos kitosan i en større grad enn det gjorde mellom de protonerte karboksylgruppene hos pektin, og at det dermed er færre intermolekulære bindinger mellom polymerkjedene. Dette vil i større grad fremme tillagingen av nanopartikler som følge av at polymerkjedene kveiler seg og danner ionebindinger med TPP. De samme konsentrasjonene av SnF_2 (0,05%, 0,1%, 0,15%, og 0,2%) ble prøvd ut ved bruk av kitosan:TPP. Resultatene viste at kitosan dannet små nanopartikler (65-77 nm) med lave PDI (0,19-0,38) og unimodal størrelsesfordeling. Størrelsen på nanopartiklene ble mindre jo høyere konsentrasjon av SnF_2 som ble benyttet i tillagingen av formuleringene. Den samme tendensen til mindre nanopartikler var også reflektert i PDI-verdiene som ble lavere når konsentrasjonen av SnF_2 økte. Dette tyder på at økt ionestyrke fører til en mer effektiv skjerming av de ladede polymerkjedene hos kitosan, og dermed færre intermolekulære bindinger mellom polymerkjedene. En lignende effekt har også blitt beskrevet i publikasjoner, men i disse studiene har det blitt benyttet monovalente salter som for eksempel NaCl (Chen, Hsu et al. 2011, Jonassen, Kjøniksen et al. 2012). Dette kan tyde på at ionestyrken påvirker partikkelstørrelse ved bruk av ionisk kryssbinding som fremstillingsmetode for nanopartikler.

Kitosan:TPP med 0,2% SnF_2 som startkonsentrasjon ga de beste resultatene med hensyn til størrelse, PDI og intensitetsplott. For å undersøke om det var mulig å oppnå enda bedre nanopartikler, ble det forsøkt å fremstille nanopartikler med 0,25% SnF_2 . Chen, Hsu et al. rapporterte at det er en risiko for dannelse av aggregater dersom ionestyrken i suspensjonen blir for høy siden det fremmer intermolekulære bindinger mellom kitosanmolekylene. Jonassen, Kjøniksen et al. oppdaget også at partikkelstørrelsen øker ved økt ionestyrke, men som følge av aggregering fremfor kontraksjon av polymerkjedene. Ved å øke konsentrasjonen av SnF_2 til 0,25% ble det derimot observert høyere PDI-verdier ($\sim 0,250$) til tross for at partikkelstørrelsen ble meget redusert (~ 50 nm). Intensitetsplottet av kitosan:TPP med 0,25% SnF_2 viser to toppe (figur 6-3c). Det er derfor grunn til å tro at nanopartiklene som dannes ikke har en jevn størrelsesfordeling. Resultatene viser også at det kan være en sammenheng mellom ionestyrken på suspensjonen og partikkelstørrelsen. Det er usikkert om

valget av monovalente salt og divalent salt påvirker dannelsen av nanopartikler. På bakgrunn av en bedre PDI-verdi (0,187), en overlappende og unimodal fordeling av partiklene og en forholdsvis lav partikkelstørrelse (~60 nm), ble det derfor besluttet å benytte formuleringen med kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ for videre studier i denne oppgaven.

7.2 Forbedring av stabilitet

Det var ønskelig å måle partikkelstørrelse, PDI og pH en uke etter fremstillingen av nanopartikler med kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ for å undersøke *in vitro* stabiliteten av formuleringen. En uke etter fremstillingen ble det observert at prøveløsningene hadde aggregert og sedimentert slik at karakterisering ikke var mulig å gjennomføre. En mulig årsak til den dårlige stabiliteten kan være SnF₂. Hensikten med denne delen av oppgaven var å forbedre *in vitro* stabiliteten av formuleringen ytterligere. Gelfiltrering ble derfor benyttet som en metode for å fjerne ikke-innkapslet SnF₂. Gelfiltrering er blant et av de mest påliteligste metodene for å fjerne virkestoff som ikke er bundet til nanopartikler. Molekyler separeres fra hverandre som følge av forskjeller i partikkelstørrelse ved gelfiltrering. Ikke-innkapslet SnF₂ er mindre enn porestørrelsen i gelmatriks og vil fanges i porene slik at det tar lengre tid før de elueres ut av kolonnen (Kumari, Yadav et al. 2010, O'Fágáin, Cummins et al. 2011). Nanopartiklene vil derimot passere raskere gjennom kolonnen siden de er større enn porestørrelsen i gelmatriksen. For å undersøke om gelfiltrering var en effektiv metode, ble konduktivitet, pH og PDI målt før og etter gelfiltrering. Resultatene viste at konduktiviteten av prøveløsningen var lavere etter gelfiltreringen. Samtidig var pH av nanopartikkel-løsningen høyere etter gelfiltreringen (tabell 6-6). Dette tyder på at gelfiltrering klarer å fjerne SnF₂ som ikke er innkapslet, siden 0,2% SnF₂-løsning har pH ca. 2,8. Konduktiviteten var ytterligere redusert ved vask av samme kolonne tre ganger med 25 ml Milli-Q vann før prøve ble avsatt.

Det ble undersøkt om Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl kunne brukes som elueringsmiddel. Tillaging av nanopartikler i nærvær av monovalente og divalente salter har vist å gi bedre stabilitet av nanopartiklene i motsetning til nanopartikler som tillages i vann ((Jonassen, Treves et al. 2013). Elueringsmidlene ble evaluert ved hjelp av hver sine kolonner, og ved bruk av samme kolonne for parallellene var det store forskjeller i resultatene basert på måling av partikkelstørrelse, PDI, pH og konduktivitet før og etter gelfiltrering mellom parallell 1 og

parallel 2 for begge elueringsmidlene. Ved bruk av nye kolonner for hver gelfiltrering viste resultatene at det ikke var stor forskjell mellom de to parallellene og mellom de to ulike elueringsmidlene. Det ble derfor benyttet nye kolonner for hver gelfiltrering for å holde betingelsene mest mulig likt ved bruk av metoden. Gelfiltrering av prøvene viste lavere verdier av PDI, mens partikkelstørrelsene var noe økt. En ulempe ved bruk av gelfiltrering er fortynning av prøven, og dette kan påvirke partikkelstørrelsen. Lavere PDI etter gelfiltrering tyder på at store partikler holdes igjen i kolonnen. Intensitetsplottene av partikkelstørrelsene etter gelfiltrering viste fremdeles en unimodal fordeling. Det var ingen stor forskjell mellom Milli-Q vann eller 0,05 M NaCl som elueringsmiddel, fordi eluering med 0,05 M fører til at kolonnene tar til seg ionene. Dette vil igjen resultere i at nanopartiklene gelfiltreres på samme måte som ved bruk av Milli-Q vann som elueringsmiddel. Som tidligere nevnt i oppgaven har enkelte publikasjoner vist at man oppnår mer kompakte og stabile nanopartikler ved tilsats av salt (Jonassen, Kjøniksen et al. 2012, Pistone, Goycoolea et al. 2017). 0,05 M NaCl ble derfor benyttet videre som elueringsmiddel og kolonnen ble mettet før prøven ble avsatt for å unngå at saltet forsvinner i kolonnen. Ved å mette kolonnen med 0,05 M NaCl etter ekvibrering av kolonnen og før avsetting av prøveløsning, ble konduktiviteten ytterligere redusert og resultatet var en enda lavere PDI for nanopartiklene samt smalere partikkelfordeling i intensitetsplottene. Til tross for at kun små volum kan gelfiltreres av gangen og prøvene kan bli noe fortynnet ved metoden, er gelfiltrering en populær og mye anvendt separasjonsmetode som er forholdsvis enkel å utføre. Metoden er allsidig, krever ikke mye av utstyr, og utføres under milde forhold.

Stabilitetsstudier

Formuleringen med 0,07% kitosan:TPP og 0,2% SnF₂ som startkonsentrasjon hadde de beste resultatene med hensyn til partikkelstørrelse, PDI og pH, og ble benyttet videre for undersøkelse av *in vitro* stabilitet under lagring. *In vitro* stabiliteten av nanopartiklene ble evaluert ut i fra størrelse, PDI og pH. Endringer i disse parameterne reflekterer endring av nanopartiklenes fysiske egenskaper og kan tyde på stabilitetsproblemer. *In vitro* stabiliteten av både gelfiltrerte og ikke-gelfiltrerte nanopartikler ble undersøkt og målt i løpet av lagringsperioden. Formuleringene ble oppbevart i kjøleskap under stabilitetsstudiet.

For ikke-gelfiltrerte nanopartikler var *in vitro* stabiliteten kortvarig sammenlignet med de gelfiltrerte nanopartiklene (figur 6-9). Størrelsen til de gelfiltrerte nanopartiklene økte jevnt og holdt seg relativt stabil den første uken etter fremstilling (66-87 nm). Partikkelstørrelsen

økte enda mer i løpet av den andre uken (90-136 nm). Etter 14 dager viste intensitetsplottene at partikkelstørrelsen var noe redusert da toppen var mer forskjøvet mot venstre (figur 6-10C). Dette kan tyde på at de største partiklene viste tegn på begynnende aggregering og sedimentasjon under ekvibreringstiden i Nanosizeren. Mot slutten av lagringsperioden ble det observert en tilleggstoppe til venstre for hovedtoppen (figur 6-10D). Dette kan tyde på at nye strukturer dannes, mens den økte partikkelstørrelsen tyder på at partiklene aggregerer under lagring, noe som kan indikere dårlig *in vitro* stabilitet. I likhet med endring av partikkelstørrelse over tid, holdt PDI-verdiene for nanopartiklene seg tilnærmet uendret i litt over en uke. Etter ca. 12 dager kan man derimot observere at størrelsesfordelingen øker betraktelig noe som tyder på at det dannes nye strukturer og dannelse av aggregater under lagring (figur 6-11B). PDI-verdiene viser at størrelsesfordelingen ikke er homogen under stabilitetsstudiet, noe som ville ha vært mer sannsynlig dersom det ikke ble dannet nye strukturer under lagring.

pH-målinger av formuleringen viste at pH faller i løpet av de tre første dagene etter fremstilling for både de ikke-gelfiltrerte og de gelfiltrerte nanopartiklene (figur 6-12). pH for de gelfiltrerte partiklene er ca. en pH-enhet høyere (pH ~4,4) sammenlignet med pH for ikke-gelfiltrerte nanopartikler (pH ~3,3) den første dagen. Dette viser at gelfiltrering klarer å fjerne SnF₂ som ikke er innkapslet. pH-fallet for ikke-gelfiltrerte nanopartikler er høyere enn pH-fallet for de gelfiltrerte nanopartiklene. Dette kan tyde på at *in vitro* stabiliteten er noe bedre for de gelfiltrerte nanopartiklene kontra de ikke-gelfiltrerte nanopartiklene. pH-fallet som kan observeres over tid kan tyde på at det er lekkasje av SnF₂ under oppbevaring i kjøleskap siden 0,2% SnF₂-løsning hadde avmålt pH ca 2,8. Lekkasje av fluor kunne ha blitt bekreftet ved å måle mengde innkapslet fluor ved hjelp av en fluorelektrode.

Resultatene i denne oppgaven viste at de gelfiltrerte nanopartiklene hadde en bedre stabilitet sammenlignet med de ikke-gelfiltrerte nanopartikler. Endringer i både partikkelstørrelse, PDI og pH på samme tid for gelfiltrerte nanopartikler viser at formuleringen er stabil *in vitro* maks én uke. I likhet med denne oppgaven, oppdaget Jonassen, Kjøniksen et al. også i sin studie hvordan nanopartikler fremstilt av kitosan:TPP i nærvær av NaCl danner aggregater og sedimenterer etter en viss tidperiode (Jonassen, Kjøniksen et al. 2012). Resultatene i artikkelen viste også en økt partikkelstørrelse etter ca. én uke.

Den langsiktige stabiliteten av formuleringen kunne vært forbedret ved bruk av frysetørring, men dette innebærer bruk av kryoprotektorer (for eksempel mannitol) som vil påvirke nanopartiklenes fysikalske egenskaper. I frysetørring fjernes vann fra formuleringen ved sublimasjon fra frossen tilstand. Denne metoden benyttes ofte for å unngå dannelsen av aggregater og for å forhindre lekkasje av innkapslet virkestoff for mikro- og nanopartikkelsystemer (Morris, Castile et al. 2011). For polymerbaserte nanopartikler kan frysetørring medføre mekanisk stress på nanopartiklene siden kitosan vil danne inter- og intramolekylære bindinger hydrogenbindinger og hydrofobiske interaksjoner. Dette kan påvirke partiklenes fysikalske egenskaper som for eksempel viskositet, zetapotensial og evnen til å ta opp vann. Den polymere strukturen kan i tillegg ødelegges siden vann fjernes fra formuleringen (Rampino, Borgogna et al. 2013, Szymanska and Winnicka 2015). Metoden ble derfor ikke vurdert som et alternativ for å øke formuleringens lagringsstabilitet i denne oppgaven.

7.3 Adsorpsjon av nanopartikler til HA

Hensikten i denne delen av oppgaven var å bestemme mengde kitosan-nanopartikler som adsorberes til hydroksyapatitt (HA) ved hjelp av en fluorescensmarkør. Fluorescein isothiocyant (FITC) er en kjent fluorescensmarkør som har vært benyttet i nanopartikler (Loumaigne, Praho et al. 2010, Nair, Poulouse et al. 2011, Veeranarayanan, Cheruvathoor Poulouse et al. 2012, Hu, Tang et al. 2013).

Munnhulens pH reguleres av buffersystemer som opprettholder pH mellom 6,0 og 7,5 (Aframian, Davidowitz et al. 2006). Det var derfor hensiktsmessig å undersøke hydroksyapatitts adsorpsjonsevne av kitosanbaserte nanopartikler i munnhulens naturlige pH. I vann vil FITC være både nøytral, kationisk og anionisk, dette medfører at adsorpsjons- og fluorescensevnen vil være sterkt avhengig av pH (Sjoback, Nygren et al. 1995). 10 mM fosfatbuffer med pH 6,8 ble forsøkt som hydreringsmedie av hydroksyapatitt og som fortynningsmiddel for standardene. Det var utfordrende å få en akseptabel kalibreringskurve ved bruk av fosfatbuffer siden fluorescensen er pH-avhengig (Zhang, Gong et al. 2009, Liu, Maruyama et al. 2014). Standardene bestod av ulike forhold mellom fosfatbuffer og gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler, og hadde dermed ikke konstant pH. En eventuell pH-justering av standardene tillaget med fosfatbuffer hadde vært utfordrende. For å unngå

altfor store pH-forskjeller ble det ble derfor forsøkt å benytte 0,05 M NaCl som hydreringsmedie av hydroksyapatitt og som fortynningsmiddel for standardene siden dette også ble brukt under gelfiltrering av nanopartiklene. Estimering av andel fluorescerende nanopartikler adsorbert til HA er avhengig av en akseptabel kalibreringskurve. Med 0,05 M NaCl som løsningsmiddel ble det oppnådd en akseptabel kalibreringskurve, men det var en utfordring å estimere andel nanopartikler adsorbert til HA grunnet forskjellige pH-områder mellom supernatantene og standardene. pH-målinger viste at supernatantene (pH 6-7) hadde en høyere pH enn standardene (pH 4-5).

Siden fluorescensintensiteten avhenger av pH, er det kritisk at standardene er i samme pH-område som supernatantene. For å simulere miljøet i munnhulen ble standardenes pH justert med 0,1 M NaOH slik at pH ~6. Standardene var nå i samme pH-område som supernatantene. Resultatene i figur 6-11 viser at fluorescensintensiteten øker jo mer gelfiltrerte fluorescerende nanopartikler som var tilstede i standardene. Det var derimot ikke en like sterk økning av fluorescensintensiteten hos standarden med den høyeste konsentrasjonen av gelfiltrert prøve (1 ml) sammenlignet med økningen av fluorescensintensitet hos standarder med lavere konsentrasjoner av gelfiltrert prøve. Det er mest sannsynlig at konsentrasjonen er for høy slik at det oppstår quenching (Loumagne, Praha et al. 2010, Ko and Lim 2012). Det ble derfor sett bort i fra det høyeste punktet i kalibreringskurven ved beregning av likningskurven som benyttes for estimering av andel fluorescerende nanopartikler adsorbert til HA (figur 6-14B). Likningskurven hadde en korrelasjonskoeffisient R^2 tilnærmet 1, noe som bekrefter at det var en sterk sammenheng mellom fluorescens og konsentrasjon av gelfiltrert prøve i standardene.

Fluorescensmålingene viste at intensiteten av fluorescens i supernatantene var avtakende når mengden HA økte (figur 6-15). Dette stemmer overens med beregningene som viste at adsorpsjonen av nanopartiklene til HA var høyere jo mer HA som var tilstede (tabell 6-10). Intensiteten av fluorescensen reduseres altså når en større andel HA er tilgjengelig for nanopartiklene. I adsorpsjonsforsøket ble det i tillegg benyttet to blindprøver som ikke inneholdt noe HA, men kun 0,05 M NaCl som løsningsmiddel og gelfiltrert prøve. Siden blindprøvene ikke inneholder noe HA, er det forventet null adsorpsjon av nanopartikler til HA og at fluorescensintensiteten for disse prøvene vil være høyere enn prøvene som inneholdt HA og gelfiltrert prøve. I denne oppgaven var den avmålte fluorescensintensiteten

for blindprøvene lavere enn hos prøvene med HA tilstede (20-80 mg). Beregningene viser også at en større andel av nanopartiklene tilsynelatende adsorberes hos blindprøvene, til tross for at det ikke er noe HA tilstede. Dette skyldes av at blindprøvene som kun inneholdt gelfiltrert prøve og 0,05 M NaCl ikke var i samme pH-område som standardene og supernatantene. Det hadde vært interessant å justere pH i blindprøvene for å undersøke om adsorpsjonen av nanopartikler til HA tilsvarer null.

8 Konklusjon

I denne oppgaven ble det forsøkt fremstilt nanopartikler basert på biopolymerer med negativ ladning (pektin) og positiv ladning (kitosan) via ionisk kryssbinding med henholdsvis sink og TPP. Resultatene fra innledende forsøk viste at det var utfordrende å fremstille nanopartikler basert på pektin: Zn^{2+} og ulike startkonsentrasjoner av SnF_2 siden formuleringene viste synlige tegn på dannelsen av aggregater og gel allerede ved fremstilling. Nanopartikler av 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF_2 som startkonsentrasjon ga de mest tilfredsstillende nanopartiklene med hensyn til størrelse (50-80 nm) og PDI (0,1-0,2). Formuleringer basert på pektin ble derfor utelukket fra videre forsøk, mens den utvalgte formuleringen basert på 0,07% kitosan:TPP 80:20 og 0,2% SnF_2 ble undersøkt videre. Formuleringen var stabil i ca. 3-4 dager.

Forsøk viste at stabiliteten av de kitosanbaserte nanopartiklene økte ved fjerning av ikke-innkapslet SnF_2 ved gelfiltrering med 0,05 M NaCl som elueringsmiddel. Kolonnene ble mettet først for å unngå at salt ble værende igjen i kolonnen. I motsetning til ikke-gelfiltrerte nanopartiklene holdt partikkelstørrelse og PDI seg stabile i de gelfiltrerte prøvene i ca. en uke etter fremstilling. pH-målinger av både de ikke-gelfiltrerte nanopartiklene (pH ~3,3) og de gelfiltrerte partiklene (pH ~4,4) viste at pH synker i løpet av de tre første dagene før det stabiliserer seg. Dette kan være en indikasjon på lekkasje av SnF_2 fra nanopartiklene, siden 0,2% SnF_2 -løsning hadde pH ca. 2,8. Stabilitetsundersøkelsene viste også tegn på dannelsen av aggregater og nye strukturer i prøvene under lengre lagring i kjøleskap, noe som tyder på dårlig *in vitro* stabilitet.

Den mest stabile formuleringens evne til å adsorbere til hydroksyapatitt (HA) ble undersøkt ved hjelp av kitosan merket med fluorescensmarkøren fluorescein isothiocyant (FITC). Resultatene fra adsorpsjonsforsøket viste at fluorescensintensiteten avtok når mengden HA økte. Beregning av andel kitosanbaserte nanopartikler som adsorberte til HA viste at adsorpsjonen var bedre dersom det var mer HA tilstede i supernatantene. Dette er lovende siden hydroksyapatitt er en del av tennenes sammensetning, og det er ønskelig at de kitosanbaserte nanopartiklene med SnF_2 adsorberes til tannoverflaten.

Litteraturliste

- Aframian, D., T. Davidowitz and R. Benoliel (2006). "The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors." Oral Diseases **12**(4): 420-423.
- Agnihotri, S. A., N. N. Mallikarjuna and T. M. Aminabhavi (2004). "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery." Journal of Controlled Release **100**(1): 5-28.
- Al - Manasir, N., A. L. Kjøniksen and B. Nyström (2009). "Preparation and characterization of cross - linked polymeric nanoparticles for enhanced oil recovery applications." Journal of Applied Polymer Science **113**(3): 1916-1924.
- Alexis, F., E. Pridgen, L. K. Molnar and O. C. Farokhzad (2008). "Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles." Molecular Pharmaceutics **5**(4): 505-515.
- Beiswanger, B. B., V. H. Mercer, R. J. Billings and G. K. Stookey (1980). "A clinical caries evaluation of a stannous fluoride prophylactic paste and topical solution." Journal of dental research **59**(8): 1386.
- Beyer, M., J. Reichert, E. Heurich, K. D. Jandt and B. W. Sigusch (2010). "Pectin, alginate and gum arabic polymers reduce citric acid erosion effects on human enamel." Dental Materials **26**(9): 831-839.
- Brannon-Peppas, L. and J. Blanchette (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Adv. Drug Deliv. Rev. **64**: 206-212.
- Chang, Y., L. McLandsborough and D. J. McClements (2012). "Cationic antimicrobial (ϵ -polylysine)-anionic polysaccharide (pectin) interactions: influence of polymer charge on physical stability and antimicrobial efficacy." Journal of agricultural and food chemistry **60**(7): 1837.
- Chen, W., C. Hsu, J. Huang, M. Tsai and R. Chen (2011). "Effect of the ionic strength of the media on the aggregation behaviors of high molecule weight chitosan." Journal of Polymer Research **18**(6): 1385-1395.
- Colson, Y. L. and M. W. Grinstaff (2012). "Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery." Advanced Materials **24**(28): 3878-3886.

- Du, W.-L., S.-S. Niu, Y.-L. Xu, Z.-R. Xu and C.-L. Fan (2009). "Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions." Carbohydrate Polymers **75**(3): 385-389.
- Featherstone, J. (2004). "Topical effects of fluoride in the reversal and prevention of dental decay." J. Public Health Dent. **64**: 32-34.
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: A dynamic disease process. **53**: 286-291.
- Ganss, C., M. Hardt, A. Lussi, A. K. Cocks, J. Klimek and N. Schlueter (2010). "Mechanism of action of tin - containing fluoride solutions as anti - erosive agents in dentine - an in vitro tin - uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study." European Journal of Oral Sciences **118**(4): 376-384.
- Ganss, C., J. Klimek, V. Brune and A. Schürmann (2004). "Effects of Two Fluoridation Measures on Erosion Progression in Human Enamel and Dentine in situ." Caries Research **38**(6): 561-566.
- Ganss, C., J. Klimek and N. Schlueter (2014). "Erosion/Abrasion-Preventing Potential of NaF and F/Sn/Chitosan Toothpastes in Dentine and Impact of the Organic Matrix." Caries Research **48**(2): 163-169.
- Hove, L. H., B. Holme, A. Young and A. Bjrg Tveit (2007). "The erosion-inhibiting effect of TiF₄, SnF₂, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro." Acta Odontologica, 2007, Vol.65(5), p.259-264 **65**(5): 259-264.
- Hu, Z.-Y., J.-H. Tang, Z.-L. Ge, T.-M. Song, T. Qiu, H.-P. Xie and L.-P. Guo (2013). "Fluorescence Enhancement of IgG-FITC Based on Surface Plasmon Resonance of Ag@SiO₂ Nanoparticles as Application of Biomarker." Analytical Letters **46**(5): 844-855.
- Huysmans, M. C. D. N. J. M., D. H. J. Jager, J. L. Ruben, D. E. M. F. Unk, C. P. A. H. Klijn and A. M. Vieira (2011). "Reduction of Erosive Wear in situ by Stannous Fluoride-Containing Toothpaste." Caries Research **45**(6): 518-523.
- Johansson, A.-K. (2007). "Dental erosjon ; moderne tannslitasje og ny folkesykdom." Den norske tannlegeforenings tidende **117**(5): 260-265.
- John, W. N., C. Beata and T. Danielle (2013). "The Interaction of Stannous Fluoride with Synthetic Hydroxyapatite: Modeling the Anticaries Effect " Ceramics-Silikáty **57**(1): 1-6.
- Jonassen, H. (2014). Polysaccharide based nanoparticles for drug delivery applications.

- Jonassen, H., A.-L. Kjøniksen and M. Hiorth (2012). "Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles." Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere **290**(10): 919-929.
- Jonassen, H., A.-L. Kjøniksen and M. Hiorth (2012). "Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate." Biomacromolecules **13**(11): 3747.
- Jonassen, H., A. Treves, A.-L. Kjøniksen, G. Smistad and M. Hiorth (2013). "Preparation of ionically cross-linked pectin nanoparticles in the presence of chlorides of divalent and monovalent cations." Biomacromolecules **14**(10): 3523.
- Kang, M., S. Hong, Y. Seo, Y. Kim, H. Lee and J.-C. Kim (2012). "Chitosan microgel: Effect of cross-linking density on pH-dependent release." Korean Journal of Chemical Engineering **29**(1): 72-76.
- Kean, T. and M. Thanou (2010). "Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan." Advanced Drug Delivery Reviews **62**(1): 3-11.
- Ko, J. A. and H. B. Lim (2012). "Fluorescence quenching of dye-doped coreshell nanoparticles by metal ions." Anal. Methods **4**(7): 2009-2012.
- Kuchta, E. and J. Szymańska (2014). "Dental Erosion." Polish Journal of Public Health **124**(2).
- Kumari, A., S. K. Yadav and S. C. Yadav (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **75**(1): 1-18.
- Lee, H.-S., S. Tsai, C.-C. Kuo, A. W. Bassani, B. Pepe-Mooney, D. Miksa, J. Masters, R. Sullivan and R. J. Composto (2012). "Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion." Journal of Colloid And Interface Science **385**(1): 235-243.
- Liu, H., H. Maruyama, T. Masuda, A. Honda and F. Arai (2014). "Multi-fluorescent micro-sensor for accurate measurement of pH and temperature variations in micro-environments." Sensors & Actuators: B. Chemical **203**: 54-62.
- Liu, N., X.-G. Chen, H.-J. Park, C.-G. Liu, C.-S. Liu, X.-H. Meng and L.-J. Yu (2006). "Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli." Carbohydrate Polymers **64**(1): 60-65.
- Liu, Z., Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou and Z. Zhang (2008). "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems." Advanced Drug Delivery Reviews **60**(15): 1650-1662.

- Lootens, D., F. Capel, D. Durand, T. Nicolai, P. Boulenguer and V. Langendorff (2003). "Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin." Food Hydrocolloids **17**(3): 237-244.
- Loumagne, M., R. Praho, D. Nutarelli, M. H. V. Werts and A. Débarre (2010). "Fluorescence correlation spectroscopy reveals strong fluorescence quenching of FITC adducts on PEGylated gold nanoparticles in water and the presence of fluorescent aggregates of desorbed thiolate ligands." Physical chemistry chemical physics : PCCP **12**(36): 11004.
- Maleki, A., A.-L. Kjøniksen and B. Nyström (2007). "Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents." Carbohydrate Research **342**(18): 2776-2792.
- Malvern. (2013). "Zetasizer Nano Series User Manual." Retrieved 02.02.17, from https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern_Zetasizer_ZS_DLS_user_manual.pdf.
- Mendes, J. P., J. M. S. S. Esperança, M. J. Medeiros, A. Pawlicka and M. M. Silva (2017). "Structural, morphological, ionic conductivity, and thermal properties of pectin-based polymer electrolytes." Molecular Crystals and Liquid Crystals **643**(1): 266-273.
- Mitra, A., C. H. Lee and K. Cheng (2013). Advanced Drug Delivery. Hoboken, Wiley.
- Morris, G. A., J. Castile, A. Smith, G. G. Adams and S. E. Harding (2011). "The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles." Carbohydrate Polymers **84**(4): 1430-1434.
- Nair, R., A. Poulouse, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. Kumar (2011). "Uptake of FITC Labeled Silica Nanoparticles and Quantum Dots by Rice Seedlings: Effects on Seed Germination and Their Potential as Biolabels for Plants." Journal of Fluorescence **21**(6): 2057-2068.
- National Center for Biotechnology Information. (2017). "Stannous Fluoride." Retrieved 13.05.17, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tin_II_fluoride.
- Nguyen, S. (2015). "Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity." Therapeutic Delivery **6**(5): 595-608.
- Nguyen, S., C. Escudero, N. Sediqi, G. Smistad and M. Hiorth (2017). "Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery." European Journal of Pharmaceutical Sciences.

- No, H. K., N. Young Park, S. Ho Lee and S. P. Meyers (2002). "Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights." International Journal of Food Microbiology **74**(1): 65-72.
- O'Fágáin, C., P. M. Cummins and B. F. O'Connor (2011). "Gel-filtration chromatography." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **681**: 25.
- Ozak, S. T. and P. Ozkan (2013). "Nanotechnology and dentistry." European Journal of Dentistry **7**(1): 145-151.
- Padovani, G. C., V. P. Feitosa, S. Sauro, F. R. Tay, G. Durán, A. J. Paula and N. Durán (2015). "Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects." Trends in Biotechnology **33**(11): 621-636.
- Pessan, J. P., K. J. Toumba and M. A. R. Buzalaf (2011). "Topical Use of Fluorides for Caries Control." Fluoride and the Oral Environment **22**: 115-132.
- Petersen, P. E. and M. A. Lennon (2004). "Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach." Community Dentistry and Oral Epidemiology **32**: 319-321.
- Petersen, P. E. and H. Ogawa (2016). "Prevention of dental caries through the use of fluoride - the WHO approach." Community Dental Health **33**: 66-68.
- Pistone, S. (2016). Formulation and evaluation of polysaccharide and liposome-based nanosystems for improved targeting to the oral cavity.
- Pistone, S., F. M. Goycoolea, A. Young, G. Smistad and M. Hiorth (2017). "Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity." European Journal of Pharmaceutical Sciences **96**: 381-389.
- PubMed Health. (2017). "Tooth." Retrieved 02.02.17, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0023261/>.
- Quemeneur, F., M. Rinaudo and B. Pépin-Donat (2008). "Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles." Biomacromolecules **9**(1): 396.
- Rampino, A., M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich and A. Cesàro (2013). "Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability." International Journal of Pharmaceutics **455**(1-2): 219-228.
- Ricketts, D., G. Chadwick and A. Hall (2011). Management of dental caries.

- Ruzin, S. E. (1999). "Plant Microtechnique and Microscopy." Oxford University Press
- Rølla, G., A. Y. Vik and B. Øgaard (2011). "Om fluorideres virkningsmekanismer." Den norske tannlegeforenings tidende **121**(6): 366-370.
- Saxegaard, E., F. Lagerlöf and G. Rølla (1988). "Dissolution of calcium fluoride in human saliva." Acta odontologica Scandinavica **46**(6): 355.
- Schillén, K., W. Brown and R. M. Johnsen (1994). "Micellar sphere-to-rod transition in an aqueous triblock copolymer system. A dynamic light scattering study of translational and rotational diffusion." Macromolecules **27**(17): 4825-4832.
- Schlueter, N., J. Klimek and C. Ganss (2013). "Randomised in situ Study on the Efficacy of a Tin/Chitosan Toothpaste on Erosive-Abrasive Enamel Loss." Caries Research **47**(6): 574-581.
- Schlueter, N., J. Klimek and C. Ganss (2014). "Effect of a chitosan additive to a Sn ²⁺ - containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy—a controlled randomised in situ trial." Clinical Oral Investigations **18**(1): 107-115.
- Selwitz, R. H., A. I. Ismail and N. B. Pitts (2007). "Dental caries." The Lancet **369**(9555): 51-59.
- Shannon, I. L. and E. J. Edmonds (1979). "Topical applications of stannous fluoride: choice of concentration and duration of treatment." Journal of Dentistry **7**(1): 9-14.
- Singh, R. (2011). "Farmasøytisk nanoteknologi." Norsk farmaceutisk tidsskrift **119**(6): 24-28.
- Sjöback, R., J. Nygren and M. Kubista (1995). "Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein " Spectrosc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr. **51**(6): L7-L21.
- Sriamornsak, P. (2011). "Application of pectin in oral drug delivery." Expert Opinion on Drug Delivery **8**(8): 1009-1023.
- Szymanska, E. and K. Winnicka (2015). Stability of Chitosan-A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. Basel, MDPI AG. **13**: 1819-1846.
- Thanou, M., J. C. Verhoef and H. E. Junginger (2001). "Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives." Advanced Drug Delivery Reviews **52**(2): 117-126.

- Tovsen, M. L. (2013). "Nanomedisin i kreftterapi." Norsk Farmaceutisk Tidsskrift(5): 27-30.
- Veeranarayanan, S., A. Cheruvathoor Poullose, S. Mohamed, A. Aravind, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. Kumar (2012). "FITC Labeled Silica Nanoparticles as Efficient Cell Tags: Uptake and Photostability Study in Endothelial Cells." Journal of Fluorescence **22**(2): 537-548.
- West, N. X., S. M. Hooper, Amp, Apos, D. Sullivan, N. Hughes, M. North, E. L. Macdonald, M. Davies and N. C. A. Claydon (2012). "In situ randomised trial investigating abrasive effects of two desensitising toothpastes on dentine with acidic challenge prior to brushing." Journal of Dentistry **40**(1): 77-85.
- Wiegand, A., A. Young and N. Schlueter (2012). "Dental Erosion." International Journal of Dentistry **2012**: 1-2.
- Willumsen, T., B. Gaard, B. F. Hansen and G. Rlla (2004). "Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid." Acta Odontologica, 2004, Vol.62(5), p.278-281 **62**(5): 278-281.
- World Health Organization. (2003). "The World Oral Health Report 2003." Retrieved 21.02.17, from <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68506>.
- Young, A., G. Smistad, J. Karlsen, G. Rölla and M. Rykke (1997). "Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the Coulter DELSA 440." Advances in Dental Research **11**(4): 560-565.
- Zhang, Y., S. W. Y. Gong, L. Jin, S. M. Li, Z. P. Chen, M. Ma and N. Gu (2009). "Magnetic nanocomposites of Fe₃O₄/SiO₂-FITC with pH-dependent fluorescence emission." Chinese Chemical Letters **20**(8): 969-972.