

Znaczenie mukoadhezji w technologii farmaceutycznej. Część I. Opis zjawiska oraz techniki stosowane do jego oceny

The role of mucoadhesion in pharmaceutical technology. Part I. Description of the phenomena and testing techniques

Tomasz Osmalek, Anna Froelich, Barbara Jadach, Agnieszka Snela, Piotr Gadziński, Katarzyna Ancukiewicz

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

W terminologii farmaceutycznej mukoadhezję definiuje się jako przejściowe łączenie się danej postaci leku z błoną śluzową. Jest to zjawisko bardzo ważne, a zarazem niezwykle złożone. Sam proces łączenia opisywany jest przez sześć różnych teorii: zwilżania, elektronową, dyfuzyjną, adsorpcyjną, mechaniczną i złamania. Wiadomo, że za adhezję do błony śluzowej odpowiedzialne są głównie oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe, czy wiązania wodorowe, jednak samo zjawisko nie zostało do końca w pełni wyjaśnione. Jak dotąd trudno wskazać najodpowiedniejszą metodę badania mukoadhezji. W zależności od rodzaju analizowanego materiału i potrzeb eksperymentu stosowanych jest kilka technik pomiarowych. W niniejszej pracy przedstawiono zestawienie najczęściej opisywanych w literaturze metod oceny mukoadhezji takich jak analiza reologiczna, pomiary tensometryczne, mikroskopia sił atomowych, elipsometria, czy barwienie złotem koloidalnym. (*Farm Współ 2017; 10: 22-28*)

Słowa kluczowe: mukoadhezja, hydrożel, bioadhezja, polimery, błona śluzowa

Summary

In the pharmaceutical nomenclature the term mucoadhesion is defined as temporary connection and adherence of the dosage form to the mucosa. This phenomenon is very important and complex as well. It can be described by six various theories i.e. wetting, electron transfer, diffusion, adsorption, mechanical and fracture. Although it is known that bioadhesion is caused mainly by the occurrence of electrostatic forces, hydrophobic impacts and hydrogen bonding, the phenomena of mucoadhesion is still not fully explained. Depending on the type of the tested material and the purpose of the experiment, various measurement techniques are currently used. However, the best method for mucoadhesion evaluation has not been determined so far. This paper briefly presents the mucoadhesion measurement procedures most often described in the literature such as rheology and tensometric analysis, atomic force microscopy, ellipsometry or colloidal gold staining. (*Farm Współ 2017; 10: 22-28*)

Keywords: mucoadhesion, hydrogels, bioadhesion, polymers, mucous membrane

Wprowadzenie

Skuteczność działania większości formułacji podawanych lokalnie zależy w dużej mierze od czasu ich przebywania w miejscu aplikacji. W przypadku preparatów stosowanych na błony śluzowe kluczową rolę odgrywa zjawisko mukoadhezji [1,2]. Wykorzystanie polimerów o właściwościach mukoadhezyjnych przy projektowaniu

nowoczesnych postaci leku pozwala znacząco wydłużyć czas kontaktu formułacji z miejscem zmienionym chorobowo. Zapewnia to jednocześnie dłuższe działanie leku, a w przypadku substancji o aktywności ogólnoustrojowej, może poprawić dostępność biologiczną, w porównaniu z tradycyjnymi postaciami [3-6]. Pomimo, że pierwsze badania nad polimerami mukoadhezyjnymi

były prowadzone już w latach 80-tych ubiegłego stulecia, zjawisko to nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione [7]. Powstaje ono w wyniku bezpośredniego kontaktu polimeru z błoną śluzową. Mechanizm takiego oddziaływania jest złożony i zależy między innymi od występowania wiązań jonowych, kowalencyjnych, wodorowych, sił van der Waalsa oraz oddziaływań hydrofobowych [8-10]. Proces powstawania mukoadhezji można podzielić na dwie fazy. W pierwszej, polimer ulega zwilżeniu, po czym następuje jego wzajemne przenikanie się z mucyną obecną w błonie śluzowej. W drugim etapie połączenie zostaje utrwalone poprzez powstawanie wymienionych powyżej wiązań, pomiędzy łańcuchami obu polimerów [6]. Jak dotąd sformułowano sześć głównych teorii opisujących powstawanie mukoadhezji. Pierwsza, określana jako **zwilżania** odnosi się głównie do układów płynnych. Zakłada, że genezą procesu jest spontaniczne rozprzestrzenianie się badanego materiału adhezyjnego na powierzchni błony śluzowej oraz wnikanie w jej nierówności, co stanowi warunek konieczny do wystąpienia adhezji. Zdolność do rozprzestrzeniania oraz siła oddziaływania materiału z błoną zależą głównie od energii powierzchniowej obu układów. Według teorii **transferu elektronów**, warunkiem powstania oddziaływań pomiędzy błoną i polimerem jest różnica ich struktur elektronowych. Wówczas, w wyniku przeniesienia elektronów, powstaje podwójna warstwa ładunków różnoimiennych, czego efektem jest wzajemne przyciąganie się obu powierzchni. Teoria **dyfuzyjna** z kolei zakłada, że łańcuchy polimeru ulegającego mukoadhezji przenikają się i splątują z mucyną. Stopień przenikania zależy od długości łańcuchów, ich kompatybilności, powstającego gradientu stężeń oraz czasu kontaktu. Zgodnie z teorią **adsorpcyjną** łączenie się polimeru z błoną śluzową jest przede wszystkim wynikiem powstawania połączeń hydrofobowych oraz wiązań van der Waalsa. Teoria **mechaniczna** zakłada klinowanie się materiału adhezyjnego w nierównościach błony. Odnosi się to głównie do układów płynnych. Podstawą teorii **złamania** jest definiowanie wielkości mukoadhezji jako siły niezbędnej do oderwania materiału od powierzchni błony, przy czym rozerwaniu ulega struktura tego układu, który charakteryzuje się mniejszą wytrzymałością [1,6,9].

Metody badania mukoadhezji

Pierwszym, niezwykle ważnym etapem badania mukoadhezji jest dobór odpowiedniego układu modelowego, który umożliwi stworzenie

warunków jak najbardziej zbliżonych do tych, które panują w ustroju. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się hydrożele otrzymywane z błony śluzowej jelit wieprzowych. Przy jej pozyskiwaniu należy zwracać szczególną uwagę na usunięcie wszelkiego rodzaju zanieczyszczeń pochodzących z treści pokarmowej, fragmentów tkanek oraz wydzielin. Niewielkie fragmenty śluzówki homogenizuje się w warunkach izotonicznych, w obecności fluoru fenylometrylosulfonylu (PMSF), azydki sodowego, wersenianu disodowego lub chlorku sodu. Powstały homogenizat odwirowuje się w temp. 4°C i poddaje procesowi dializy przez 24 h. Następnie z błony dializacyjnej zbiera się warstwę powstałego hydrożelu, który po wysuszeniu można przechowywać w temp. -18°C. Tak przygotowany proszek wykorzystuje się następnie do przygotowania roztworów, hydrożeli lub dysków nasyconych mucyną [11-13]. Niekiedy jako tańszy zamiennik mucyny stosuje się żelatynę lub przeprowadza testy bezpośrednio na wypreparowanych fragmentach jelit. Niestety w pierwszym przypadku wyniki zazwyczaj nie odwzorowują dobrze rzeczywistych właściwości mukoadhezyjnych badanego materiału, w drugim natomiast charakteryzują się niezadowalającą powtarzalnością. W zależności od miejsca podania preparatu, do badań wykorzystuje się również śluzówkę policzków lub śluzówkę pochwy, najczęściej pochodzenia wieprzowego [14-16].

Metody badania mukoadhezji można podzielić na bezpośrednie i pośrednie. Pierwsze oceniają siłę konieczną do oderwania danego materiału, z uwzględnieniem czasu, jaki jest do tego potrzebny. W tym przypadku powstałe połączenie poddaje się zazwyczaj działaniu siły rozciągającej, ścinającej lub procesowi zdzierania. Natomiast pośrednie metody oceniają mechanizm powstawania zjawiska oraz rodzaj interakcji pomiędzy polimerem a błoną śluzową. Do najbardziej popularnych metod oceny mukoadhezji zalicza się analizę reologiczną, pomiar tensometryczny, pomiar z użyciem analizatora tekstury i cylindra rotacyjnego, elipsometrię, czy też metodę barwienia złotem koloidalnym [1,6,9,17-20]. Wybrane przykłady przedstawiono w tabeli 1.

Metody bezpośrednie w badaniach mukoadhezji

Pomiary reologiczne

Pomiar reologiczny jest stosowany głównie do oceny mukoadhezji formulacji płynnych lub półstałych. Polega najczęściej na ocenie zmian lepkości

badanego materiału (η_b), będących efektem łączenia się z mucyną [11]. Do obliczeń wykorzystuje się równanie:

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p \quad (1)$$

gdzie:

η_t – lepkość roztworu zawierającego mucynę i polimer,

η_m – lepkość roztworu mucyny,

η_p – lepkość roztworu polimeru.

Obliczona zmiana lepkości jest następnie wykorzystywana do obliczenia siły adhezji wg. równania:

$$F = \eta \times \dot{\gamma} \quad (2)$$

gdzie:

F – siła adhezji,

η – lepkość

$\dot{\gamma}$ – szybkość ścinania.

Bardziej dokładnych danych dostarcza analiza reologiczna w trybie oscylacyjnym. Skład badanych próbek jest analogiczny jak w przypadku pomiaru lepkości, jednak wielkościami mierzonymi są wartości modułu sprężystości (G'). Do obliczeń wykorzystuje się równanie:

$$\Delta G' = G'_{(\text{mix})} - G'_{(\text{polimer})} + G'_{(\text{mucyna})} \quad (3)$$

gdzie:

$G'_{(\text{mix})}$ – moduł sprężystości mieszaniny polimeru i mucyny,

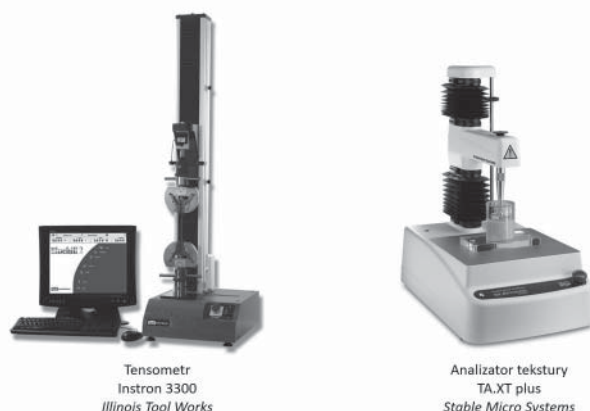
$G'_{(\text{polimer})}$ – moduł sprężystości dla polimeru,

$G'_{(\text{mucyna})}$ – moduł sprężystości dla mucyny [12,15,17,20].

Pomiar tensometryczny

Analiza tensometryczna polega na bezpośrednim pomiarze siły niezbędnej do oderwania badanego materiału od błony śluzowej lub jej syntetycznego zamiennika. Pierwszym etapem jest dociśnięcie próbki siłą w zakresie 0,1-10,0 N przez odpowiedni czas, wynoszący zazwyczaj 30-300 s. Podczas oddzielania obu warstw rejestruje się zależność siły od czasu lub drogi przebytej przez materiał oddzielany. Wynikiem otrzymanym jest praca adhezji w jednostce czasu (lub długości). Do tego rodzaju badań wykorzystuje się tensometry, analizatory tekstury (teksturometry) [11]. Na rycinie 1 widoczne są przykładowe fotografie tensometru Instron 3300 (*Illinois Tool Works*) oraz teksturometru TA.XT plus (*Stable Micro Systems*). Z kolei rycina 2 przedstawia przykładowy schemat zestawu wykorzystywanego do badań mukoadhezji metodą teksturometryczną z zastosowaniem śluzówki pochodzenia zwierzęcego [16].

Przykładem zastosowania tensometru w badaniach mukoadhezji może być doświadczenie opisane przez Shojaei i wsp. Autorzy analizowali właściwości kopolimerów kwasu akrylowego z pochodnymi glikolu polietylenowego. Pierwszy etap obejmował przygotowanie dysków polimerowych oraz przytwierdzenie ich do szklanych płytek za pomocą kleju cyjanoakrylowego. Następnie dyski zwilżano roztworem soli fizjologicznej i po 5 min dociskano do fragmentów błony śluzowej pochodzącej z policzków wieprzowych ciężarem równym 8,6 g. Po upływie 1 min platformę pomiarową podnoszono z szybkością 50 $\mu\text{m/s}$ i wykonywano pomiar wymaganej do tego



Rycina 1. Przykładowe fotografie tensometru Instron 3300 [21] oraz analizatora tekstury TA.XT plus [22]
Figure 1. Examples of tensometer (Instron 3300) [21] and texture analyzer (TA.XT plus) [22]

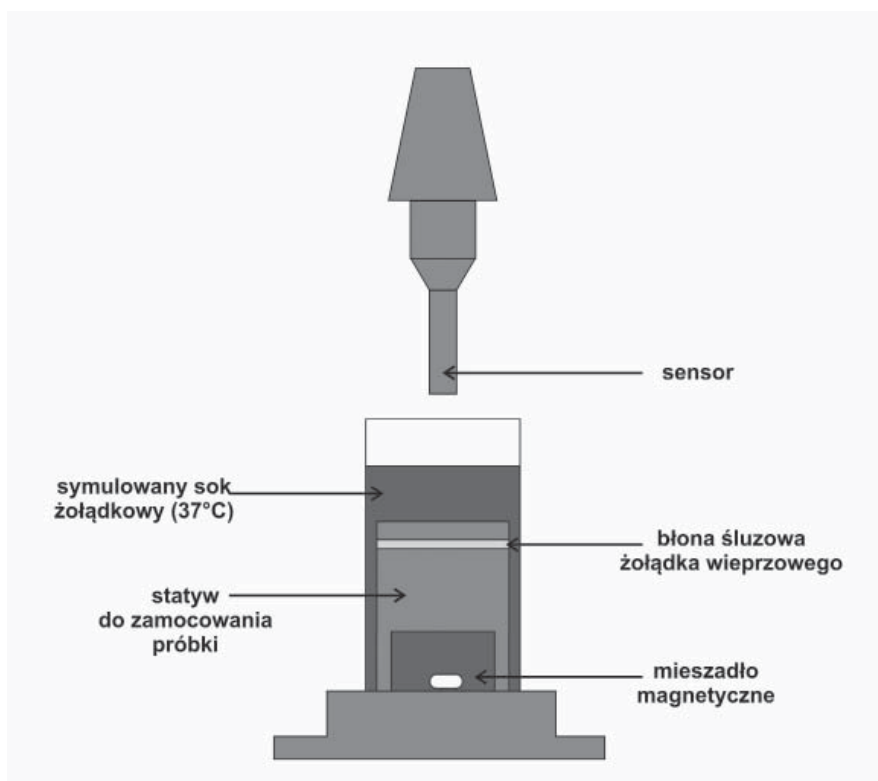
siły [23]. Inny rodzaj postępowania opisali Hauptstein i wsp. Celem prowadzonych badań była ocena zmian właściwości mukoadhezyjnych wybranych poliakrylanów po ich funkcjonalizowaniu grupami tiolowymi. W pierwszym etapie śluzówkę pozyskaną *ex tempore* z jelita wieprzowego przytwierdzano do dna zlewki za pomocą kleju cyjanoakrylowego i zalewano 0,1 M HCl lub buforem fosforanowym o pH 6,8. Następnie zlewkę umieszczano na wadze i dociskano do śluzówki przygotowane wcześniej dyski polimerowe. Po 20 min inkubacji dyski odrywano z prędkością 0,1 mm/s. Siłę potrzebną do podniesienia sensora obliczano na podstawie zmian obciążenia wagi [24].

Xu i wsp. oceniali z kolei właściwości mukoadhezyjne termowrażliwych aerozoli donosowych zawierających chlorowoderek fenylefryny. W tym celu przygotowane zostały dyski ze skompresowanej mucyny typu II, pochodzącej z żołądków wieprzowych. Następnie dyski przytwierdzano do sondy pomiarowej z uży-

ciem dwustronnej taśmy klejącej. Badane żele ogrzewano do temperatury 33°C i umieszczano w zlewce. Sondę z dyskiem mucynowym dociskano z siłą 5 g do powierzchni żeli przez 180 s, a następnie odciągano z prędkością 0,5 mm/s na odległość 5 mm [25]. Z kolei Gök i wsp. przedstawili wyniki badań właściwości mukoadhezyjnych tabletek dopochwowych na bazie kopolimerów skrobi z poliakrylanami zawierających progesteron, przeznaczonych do stosowania w weterynarii. Po przytwierdzeniu tabletek do sensora dociskano je do błony śluzowej o grubości 2 mm, wypreparowanej z owczej pochwy [26].

Pomiar z użyciem cylindra rotacyjnego

Do badania mukoadhezji można wykorzystać również aparat rotacyjny z cylindrami, wykorzystywany do oceny dostępności farmaceutycznej z plastrów transdermalnych. Iqbal i wsp. oceniali właściwości koniugatów poliakrylanów z cysteiną oraz kwasem



Rycina 2. Model zestawu do pomiaru mukoadhezji z wykorzystaniem analizatora tekstury (zmodyfikowano na podstawie [21])

Figure 2. The scheme of an experimental set for mucoadhesion testing with the use of texture analyzer (modified [21])

2-merkaptonikotynowym. Przed pomiarem, próbki polimerów prasowano otrzymując formę tabletek. Następnie do cylindrów wykonanych ze stali nierdzewnej przyklejano śluzówkę jelita wieprzowego, do której przyłączono tabletki. Tak przygotowane cylindry umieszczono w zlewkach aparatu rotacyjnego, wypełnionych buforem fosforanowym o pH=6,8. Szybkość rotacji cylindrów wynosiła 100 obr./min. Badanie polegało na wizualnej obserwacji i pomiarze czasu, po jakim tabletki ulegały oderwaniu od błony śluzowej [27].

Metody pośrednie w badaniach mukoadhezji

Mikroskopia sił atomowych

Zjawisko mukoadhezji może być także analizowane z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych

(ang. *Atomic Force Microscopy*; AFM). Metoda ta umożliwia wykonywanie zdjęć powierzchni badanego materiału z rozdzielczością do jednego atomu. Dzięki temu możliwa jest rejestracja wiązań wodorowych pomiędzy polimerem i mucyną, co według teorii adsorpcyjnej potwierdza istnienie zjawiska mukoadhezji. Metoda AFM została zastosowana między innymi do oceny oddziaływań pomiędzy mucyną a pektynami przez Srimala i wsp. W pierwszej kolejności przygotowano roztwory pektyn, mucyny oraz ich mieszanin w wodzie dejonizowanej. Analizę wykonywano po nałożeniu roztworów na szkiełka mikroskopowe i dokładnym wysuszeniu w temperaturze pokojowej. Oprócz wody dejonizowanej wykorzystano również 0,1 M HCl. Należy jednocześnie zauważyć, że ograniczeniem tej metody jest brak możliwości zastosowania

Tabela I. Wybrane przykłady technik stosowanych w badaniu mukoadhezji

Table I. Selected experimental techniques applied in mucoadhesion testing

Badany materiał	Technika pomiarowa	Dodatkowe informacje	Źródło
tiolowany poliakrylan oraz tiolowana polialilolamina	analiza reologiczna cylinder rotacyjny	wartości G' i G'' analizowano przy zmiennej częstotliwości w zakresie 0,1-20 Hz, stężenie mucyny: 1,5% do badań wykorzystano śluzówkę jelita cienkiego poch. wieprzowego	[29]
tiolowana pektyna	analiza reologiczna cylinder rotacyjny	badano przy naprężeniu ścinającym w zakresie 0,5-10 Pa; roztwór badanego polimeru mieszano ze śluzem pochodzącym z jelita cienkiego sprasowany polimer dociskano do fragmentu jelita cienkiego	[30]
hydrożel oraz mikrocząstki na bazie niskometylowanej pektyny z dodatkiem kwasu hialuronowego	analiza reologiczna	wartości G' i G'' analizowano przy zmiennej częstotliwości w zakresie 0,03-5 Hz;	[15]
kopolimery kwasu akrylowego i PEG	pomiar z użyciem tensometru	badano siłę potrzebną do zerwania wiązań mukoadhezyjnych przy szybkości poruszania się platformy - 50 μm/s	[23]
koniugaty Eudragitu®: Eu-SH i Eu-S-MNA	pomiar z użyciem tensometru	badano siłę potrzebną do zerwania wiązań mukoadhezyjnych przy szybkości odrywania polimeru od tkanki - 0,1 mm/s.	[24]
hydrożele na bazie poloksameru P407 i P188, ε-poliilizyny i hialuronianu sodu	pomiar z użyciem analizatora tekstury	oddalano sondę z dyskiem mucynowym od żelu z prędkością 0,5 mm/s na odległość 5 mm	[25]
pochodne kwasu akrylowego tj. PAAAs, PAAAs-cys i PAA-cys- 2MNA	pomiar z użyciem cylindra rotacyjnego	analizę wykonywano przez 24 h przy prędkości obrotowej cylindra - 100 rpm	[27]
pektyny	mikroskopia sił atomowych	zdjęcia mikroskopowe wykonywano z częstotliwością 2Hz; dodatkowo zmierzono potencjał zeta i rozmiar cząstek używając Zetasizer 3000HSA	[18]
hydrożele na bazie pochodnych celulozy (CMC, HEC)	elipsometria	---	[11]

buforów fosforanowych ze względu na zjawisko interferencji jonów. Po wykonaniu zdjęć porównano ilości zaadsorbowanych cząsteczek polimeru z ilością niezaadsorbowanych i na tej podstawie oceniono zdolność polimeru do łączenia się z mucyną [18].

Elipsometria

W metodzie elipsometrycznej wykorzystuje się zjawisko zmiany współczynnika załamania światła (n), będące efektem adsorpcji polimeru na powierzchni, na której znajduje się warstwa mucyny. Badania w tym zakresie prowadzili między innymi Ivarsson i wsp. Autorzy analizowali mukoadhezję wybranych polimerów do mucyny zaadsorbowanej na powierzchni metylowanej krzemionki. Zaproponowana w pracy procedura pomiarowa nie jest skomplikowana i została podzielona na 4 etapy obejmujące kolejno: *i*) pomiar współczynnika załamania światła metylowanej krzemionki w celu eliminacji tła, *ii*) wprowadzenie do kuwety pomiarowej 1% roztworu mucyny, *iii*) przepłukanie kuwety buforem w celu usunięcia nadmiaru niezaadsorbowanej mucyny, *iv*) wprowadzenie do kuwety roztworu polimeru mukoadhezyjnego. Przez cały czas trwania eksperymentu rejestrowano wartość współczynnika załamania światła. Wyniki przedstawiono w formie graficznej jako zależność n od czasu [11].

Barwienie złotem koloidalnym

Do oceny mukoadhezji można również zastosować pomiar spektrofotometryczny w zakresie światła widzialnego. W tym celu należy otrzymać kompleks mucyny ze złotem, a następnie zmierzyć wartość absorbancji przy długości fali równej 525 nm. Kolejnym etapem jest ocena zmian absorbancji zachodzących podczas stopniowego dodawania kompleksu do roz-

tworu polimeru. Wadą opisanej metody jest możliwość prowadzenia pomiaru jedynie w środowisku kwaśnym [28].

Podsumowanie

Mukoadhezja to zjawisko bardzo złożone, które, mimo że jest badane od prawie 40 lat, wciąż stanowi temat licznych dyskusji, zarówno w odniesieniu do teorii wyjaśniających jego naturę, jak również narzędzi wykorzystywanych do jego oceny. W niniejszej pracy przedstawiono jedynie niewielki wycinek z bardzo obszernej bazy literaturowej, który jednak jednoznacznie wskazuje na to, że pomimo opracowanych wielu technik pomiarowych, począwszy od prostej analizy mechanicznej, a skończywszy na niezwykle zaawansowanej analizie mikroskopowej, nie sposób wskazać tej najbardziej odpowiedniej. Wyniki uzyskane różnymi metodami lub chociażby z zastosowaniem różnych procedur pomiarowych mogą znacznie od siebie odbiegać. W kolejnej części zostaną opisane właściwości najbardziej znanych polimerów naturalnych (chitozan, guma guar, guma gellan) oraz syntetycznych (pochodne celulozy, alkoholu poliwinylowego oraz polihydroksymetakrylanu), wykorzystywanych w technologii preparatów mukoadhezyjnych.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Tomasz Osmałek

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

ul. Grunwaldzka 6; 60-780 Poznań

☎ (+48 61) 854 66 61

✉ tosmalek@ump.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Khutoryanskiy VV, ed. Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems. Chichester: John Wiley & Sons; 2014.
2. Mansuri S, Kesharwani P, Jain K i wsp. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React Funct Polym.* 2016;100:151-72.
3. Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;98:76-89.
4. Russo E, Selmin F, Baldassari S i wsp. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2015;1(13):113-25.
5. Bindu BM, Zulkar NKM, Ravinder A i wsp. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res* 2010;1:381-7.
6. Płaczek M, Sznitowska M. The mucoadhesion phenomena and importance in drug application. *Polim Med.* 2009;39:49-64.

7. Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7:259-71.
8. Shaikh R, Singh TRR, Garland MJ i wsp. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3:89-100.
9. Alexander A, Sharad C, Mohammed K. Theories and Factors Affecting Mucoadhesive Drug Delivery Systems: A Review. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1:381-7.
10. Vetchý D, Landová H, Gajdziok J i wsp. Determination of dependencies among in vitro and in vivo properties of prepared mucoadhesive buccal films using multivariate data analysis. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;86:498-506.
11. Ivarsson D, Wahlgren M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloid Surf B.* 2012;92:353-9.
12. Madsen F, Eberth K, Smart JD. A rheological examination of the mucoadhesive/ mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. *J Control Release.* 1998;50:167-78.
13. Cook MT, Khutoryanskiy VV. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials – A mini-review. *Int J Pharm.* 2015;495:991-8.
14. Caramella CM, Rossi S, Ferrari F i wsp. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev.* 2015;92:39-52.
15. Pliszczak D, Bordes C, Bourgeois S i wsp. Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements. *Colloid Surf B.* 2012;92:168-74.
16. Woertz C, Preis M, Breitzkreutz J i wsp. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85:843-53.
17. Hägerström H, Edsman K. Limitations of the rheological mucoadhesion method: The effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18:349-57.
18. Sriramaoansak P, Wattanakorn N, Takeuchi H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydr Polym.* 2010;79:54-9.
19. Nair AB, Kumria R, Harsha S i wsp. In vitro techniques to evaluate buccal films. *J Control Release.* 2013;166:10-21.
20. Carvalho FC, Calixto G, Hatakeyama IN i wsp. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39:1750-7.
21. www.instron.pl/pl-pl/products/testing-systems/universal-testing-systems/electromechanical/3300 (stan z dn. 21-02-2017).
22. www.texturetechnologies.com/texture-analyzers/ta-xtplus-texture-analyzer (stan z dn. 21-02-2017).
23. Shojaei AH, Li X. Mechanisms of buccal mucoadhesion of novel copolymers of acrylic acid and polyethylene glycol monomethylethermonomethacrylate. *J Control Release.* 1997;47:151-61.
24. Hauptstein S, Bonengel S, Rohrer J i wsp. Preactivated thiolated poly(methacrylic acid-co-ethyl acrylate): Synthesis and evaluation of mucoadhesive potential. *Eur J Pharm Sci.* 2014;63:132-9.
25. Xu X, Shen Y, Wang W i wsp. Preparation and in vitro characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88:998-1004.
26. Gök MK, Özgümüş S, Demir K i wsp. Development of starch based mucoadhesive vaginal drug delivery systems for application in veterinary medicine. *Carbohydr Polym.* 2016;136:63-70.
27. Iqbal J, Shahnaz G, Dünnhaupt S i wsp. Preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery. *Biomaterials.* 2012;33:1528-35.
28. Park K. A new approach to study mucoadhesion: colloidal gold staining. *Int J Pharm.* 1989;53:209-17.
29. Duggan S, O'Donovan O, Owens E i wsp. Comparison of the mucoadhesive properties of thiolated polyacrylic acid to thiolated polyallylamine. *Int J Pharm.* 2016;498:245-53.
30. Hintzen F, Hauptstein S, Perera G i wsp. Bernkop-Schnürch A. Synthesis and in vitro characterization of entirely S-protected thiolated pectin for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85:1266-73.