



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

*Σύνθεση πολυμερικών βιοδιασπώμενων μικρο-σφαιριδίων και μελέτη
απελευθέρωσης ενθυλακωμένης υδρόφιλης ουσίας*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Μαρίας – Φωτεινής
Καλογερίνη

Επιβλέπων: Κ. Χαριτίδης

Ερευνητικός Επιβλέπων: Κ.Χαριτίδης Ίδρυμα : ΕΜΠ	Ακαδημαϊκός Επιβλέπων: Κ.Χαριτίδης Ίδρυμα: ΕΜΠ
--	---

Αθήνα
2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

*Σύνθεση πολυμερικών βιοδιασπώμενων μικρο - σφαιριδίων και μελέτη
απελευθέρωσης ενθυλακωμένης υδρόφιλης ουσίας*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Μαρίας – Φωτεινής
Καλογερίνη

Ερευνητικός Επιβλέπων: Κ. Χαριτίδης Ακαδημαϊκός Επιβλέπων: Κ. Χαριτίδης

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 25/10/2017

Κ. Χαριτίδης	Ι. Ράπτης	Ε. Χριστοφόρου

Αθήνα 2017

.....
Καλογερίνη Μαρία - Φωτεινή

© (2017) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα Προηγμένων, Σύνθετων, Νάνο Υλικών και Νανοτεχνολογίας (R-NanoLab) του Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. , κατά το χρονικό διάστημα 2016-2017.

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κ. Χαριτίδη, Καθηγητή του Ε.Μ.Π., για τη δυνατότητα εξέλιξης που μου έδωσε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την επίβλεψη, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όλο αυτό το διάστημα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Ράπτη, κ. Χριστοφόρου και κ. Χαριτίδη , για την τιμή που μου έκαναν να αξιολογήσουν την μεταπτυχιακή μου εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως , τον Δρ. Ηλία Κούμουλο, για τη συνεχή καθοδήγηση, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τις επιστημονικές γνώσεις που μου προσέφερε, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και της συγγραφής. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Δέσποινα Μπρασινίκα για τη συμβολή της, στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Οι συμβουλές κατά τη πειραματική διαδικασία και οι εύστοχες παρατηρήσεις κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας, ήταν πολύτιμες. Ευχαριστώ ακόμα, τον Δρ. Ιωάννη Καρτσωνάκη για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε, ιδιαιτέρως κατά τη διαδικασία της σύνθεσης του υλικού.

Ευχαριστώ ακόμα, τον κ. Αργυρούση , Αναπληρωτή Καθηγητή του Ε.Μ.Π για την άδεια που μου έδωσε, να χρησιμοποιήσω τη συσκευή υπερήχων εργαστηρίου του.

Θα ήθελα ακόμα, να ευχαριστήσω ξεχωριστά κάθε μέλος του R-NanoLAB, για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας, την έμπρακτη συμπαράσταση και την προθυμία για την άμεση επίλυση κάθε προβλήματος.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά το οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον, για τη συμπαράσταση και κατανόηση όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η **ανάπτυξη βιοδιασπώμενων πολυμερικών μικρο-σφαιριδίων, με ταυτόχρονη ενθυλάκωση υδρόφιλης ουσίας (πολυγαλακτικό οξύ, methyl orange)**. Οι δομές αυτές, αναπτύχθηκαν και εξετάστηκαν ως φαρμακευτικοί φορείς ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Αρχικά, **βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι σύνθεσης**, ακολούθησε ο **χαρακτηρισμός** των παραγόμενων δομών και τέλος πραγματοποιήθηκε **μελέτη απελευθέρωσης της ενθυλακωμένης ουσίας**. Επιπλέον, έγινε **χρήση μαθηματικών μοντέλων κινητικής απελευθέρωσης**, ώστε να προσδιοριστούν οι μηχανισμοί αποδέσμευσης της υδρόφιλης ουσίας από το πολυμερές.

Για τη δημιουργία των παραπάνω δομών, εφαρμόστηκε η **τεχνική του διπλού γαλακτώματος**: υδάτινη φάση₁ / σε οργανική φάση/ σε υδάτινη φάση₂ (Water₁/in Oil/in Water₂). Το πολυμερές που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων, και η υδρόφιλη ουσία που ενθυλακώθηκε ήταν το methyl orange, το οποίο ανήκει στη κατηγορία των αζωτούχων ενώσεων.

Κατά τη σύνθεση των πολυμερικών σφαιριδίων, με την τεχνική του διπλού γαλακτώματος, μελετήθηκε η επίδραση τριών παραμέτρων στο μέγεθος των δομών: **1) της ισχύος των υπερήχων** που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της γαλακτωματοποίησης, **2) του χρόνου έκθεσης του υλικού σε υπέρηχους**, και τέλος **3) της ποσότητας της επιφανειοδραστικής ένωσης** που χρησιμοποιήθηκε. Ακολούθησαν πειράματα συσχέτισης των παραπάνω μεγεθών, ώστε να μελετηθούν **οι μηχανισμοί δημιουργίας** των σφαιριδίων και να επιλεγούν οι τιμές που αντιστοιχούν στη **μικρότερη διάμετρο** και στο **στενότερο εύρος κατανομής μεγεθών**.

Οι βέλτιστες τιμές που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν για την **τελική σύνθεση του υλικού**, του οποίου μελετήθηκε η δομή και η σύσταση. Προκειμένου να αξιολογηθεί το παραγόμενο υλικό, χρησιμοποιήθηκαν: **1) η μέθοδος φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)**, **2) η μέθοδος φασματοσκοπίας ενεργειακής διασποράς ακτίνων X**

(EDS), και **3**) η οπτική παρατήρηση **μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)**.

Το δεύτερο στάδιο της επεξεργασίας, περιελάμβανε τη **μορφοποίηση του παραγόμενου υλικού σε σχήμα δισκίων** και την προσαρμογή των βασικών φυσικών χαρακτηριστικών του, στις απαιτήσεις της φαρμακευτικής τεχνολογίας. Στη συνέχεια, **μελετήθηκε το προφίλ απελευθέρωσης της υδρόφιλης ουσίας από τα πολυμερικά σφαιρίδια, όταν εισήχθησαν σε ρυθμιστικά διαλύματα** προσομοίωσης των τιμών του pH του αίματος, (7,4) και του στομάχου (5,4). Τέλος, ακολούθησε η **μαθηματική μοντελοποίηση της κινητικής απελευθέρωσης της υδρόφιλης ουσίας**, σύμφωνα με την εξίσωση Korsmeyer-Peppas.

Συνοψίζοντας, επιτεύχθηκε η **σύνθεση μικρο-σφαιριδίων από PLA, ως φορείς methyl orange**, η μελέτη αποδέσμευσης των οποίων έδειξε ότι ο κύριος μηχανισμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας είναι η διάχυση τύπου “Fickian”.

Λέξεις - φράσεις κλειδιά : Μικρο-σφαιρίδια, πολυγαλακτικό οξύ, διπλό γαλάκτωμα, δισκία, προφίλ αποδέσμευσης.

Abstract

The objective of this work was **the synthesis of biodegradable polymer micro-spheres with the simultaneous encapsulation of a hydrophilic substance (polylactic acid, methyl orange)**. These structures have been synthesized and characterized with the perspective of being used as drug delivery and release carriers. After the **initial optimization of the synthesis parameters**, the resulting structures have been characterized. Finally, **studies on the release profile** of the encapsulated substance have been conducted. **The release mechanisms** of the hydrophilic substance from the polymer have been further determined with the **use of mathematical models**.

Microspheres have been fabricated with the double emulsion technique: Water₁ / in Oil / in Water₂. Polylactic acid (PLA), which belongs to the aliphatic polyester group, was the polymer employed, and methyl orange, which belongs to the class of nitrogen compounds, was the encapsulated hydrophilic substance.

During the synthesis of the polymer spheres with the double emulsion technique, the effect of the following three parameters upon the structure size has been investigated: **1) the power of the ultrasound** used in the emulsification stage, **2) the exposure time of the material to ultrasound**, and **3) the amount of surface-active agent used**. Correlation experiments of the above mentioned parameters were carried out, in order to study the **spheres generation mechanisms** and to select the values corresponding to the **smallest diameter** and **narrower range of size distribution**.

The optimal values obtained from the above study, have been employed for **the synthesis of the final material**, the structure and composition of which have been studied. In order to evaluate the resulting material, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) have been used.

The second stage of the process involved **the molding of the resulting material into the shape of a tablet** and the adaptation of its fundamental physical characteristics according to the requirements of pharmaceutical technology. **The release profile of the hydrophilic substance from the polymer spheres has been**

investigated, once introduced into buffers simulating the pH values of blood (7,4), and stomach (5,4). Finally, **the mathematical modeling of the kinetic release of the hydrophilic substance**, according to the Korsmeyer-Peppas equation has been realised.

In summary, **the synthesis of PLA micro- spheres containing methyl orange, has been achieved**. According to the release study, **“Fickian” diffusion has been found to be the main release mechanism** of methyl orange.

Keywords: Micro- spheres, polylactic acid, double emulsion, tablets, release profile.

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή.....	5
1. Θεωρητικό Μέρος.....	7
1.1 Βιοϋλικά : Ορισμός και κατηγορίες.....	9
1.1.1 Βιοπολυμερή.....	11
1.1.2 Βιοδιασπώμενα Πολυμερή.....	12
1.2 Βιοδιασπώμενα πολυμερή ως φορείς φαρμάκων ελεγχόμενης αποδέσμευσης	13
1.2.1 Χρησιμότητα πολυμερικών φορέων	15
1.2.2 Μηχανισμοί αποδόμησης πολυμερικών φαρμακευτικών φορέων.....	20
1.2.2.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκου από αλειφατικούς πολυεστέρες	23
1.2.2.2 Φαινόμενο στιγμιαίας απελευθέρωσης	24
1.3 Προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκων.....	25
1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα ως μέσα διαλυτοποίησης δισκίων.....	28
1.5 Κινητική Απελευθέρωσης φαρμάκων.....	29
1.5.1 Μοντέλο μηδενικής τάξης.....	30
1.5.2 Μοντέλο πρώτης τάξης.....	31
1.5.3 Μοντέλο Higuchi	32
1.5.4 Μοντέλο Korsmeyer – Peppas.....	32
1.6 Πολυγαλακτικό Οξύ: Ιδιότητες, σύνθεση και χαρακτηριστικά.....	33
1.7 Methyl orange	39
1.8 Μέθοδοι ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε πολυμερικά μικρο - σφαιρίδια.....	39
1.8.1 Μέθοδος του διπλού γαλακτώματος.....	43
1.8.2 Γαλακτωματοποιητές , Επιφανειοδραστικές Ενώσεις	45

2. Πειραματικό Μέρος	49
2.1 Πρώτες ύλες - Αντιδραστήρια	51
2.2 Οργανολογία – Πειραματικός εξοπλισμός	51
2.2.1 Συσκευή υπερήχων.....	51
2.2.2 Φυγόκεντρος.....	52
2.2.3 Συσκευή λυοφιλίωσης.....	52
2.2.4 Συσκευή δισκιοποίησης (Tablet press)	53
2.2.5 Συσκευή μέτρησης σκληρότητας δισκίων (Hardness test).....	54
2.2.6 Διάταξη διαλυτοποίησης δισκίων (Dissolution test).....	55
2.2.7 Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατής ακτινοβολίας.....	56
2.2.8 Φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier (FTIR).....	57
2.2.9 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)	58
2.2.10 Φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς ακτίνων Χ (EDS).....	59
2.3 Μελέτη σύνθεσης μικρο-σφαιριδίων	60
2.3.1 Μεθοδολογία σύνθεσης μικρο-σφαιριδίων.....	60
2.3.2 Διερεύνηση βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης.....	64
2.3.2.1 Βέλτιστο εύρος ισχύος των υπερήχων.....	64
2.3.2.2 Βέλτιστος χρόνος έκθεσης σε υπέρηχους.....	65
2.3.2.3 Βέλτιστη ποσότητα επιφανειοδραστικής ουσίας.....	65
2.3.2.4 Χαρακτηρισμός δοκιμαστικών σφαιριδίων με SEM.....	66
2.3.2.5 Διαγράμματα επιλογής παραμέτρων σύνθεσης και αποτελέσματα.....	69
2.3.3 Χαρακτηρισμός βελτιστοποιημένων μικρο-σφαιριδίων	73
2.3.3.1 Χαρακτηρισμός μικρο-σφαιριδίων με SEM.....	73
2.3.3.2 Χαρακτηρισμός μικρο-σφαιριδίων με FTIR.....	75
2.3.3.3 Χαρακτηρισμός μικρο-σφαιριδίων με EDS.....	79

2.4 Μελέτη απελευθέρωσης δραστικής ουσίας.....	81
2.4.1 Δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	81
2.4.2 Βαθμονόμηση του UV.....	82
2.4.3 Δημιουργία δισκίων....	85
2.4.4 Συνθήκες διαλυτοποίησης δισκίων.....	87
2.4.5 Διαγράμματα απελευθέρωσης δραστικής ουσίας.....	89
2.4.6 Μοντελοποίηση κινητικής απελευθέρωσης δραστικής ουσίας.....	92
2.4.7 Υπολογισμός εκθέτη της απελευθέρωσης (n).....	94
2.5 Σύνοψη και συμπεράσματα.....	96
2.5.1 Σύνοψη και συμπεράσματα μελέτης σύνθεσης μικρο- σφαιριδίων.....	96
2.5.2 Σύνοψη και συμπεράσματα μελέτης απελευθέρωσης.....	97
2.6 Μελλοντική Έρευνα.....	98
2.7 Παράρτημα.....	99

Εισαγωγή

Οι μελέτες στα συστήματα παράδοσης και απελευθέρωσης φαρμάκων (drug delivery and release systems), επικεντρώνονται τόσο στη στοχευμένη χορήγηση σε κάποιο όργανο ή ιστό, όσο και στον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσής τους, με απώτερο στόχο τη βελτιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας ενός φαρμάκου. Για την επίτευξη των παραπάνω, μελετώνται συστήματα χορήγησης στη νανο και μικρο – κλίμακα, όπου ο κύριος μηχανισμός απελευθέρωσης φαρμάκου, έγκειται αρχικά στην ενθυλάκωση του σε μια διαλυτή σφαιρική μεμβράνη, στην προοδευτική διάλυση της μεμβράνης και τελικά, στη διάχυση του φαρμάκου.

Η αναγκαιότητα ανάπτυξης των παραπάνω δομών, προέκυψε από μελέτες σχετικές με τη θεραπεία του καρκίνου, τη βελτιστοποίηση απεικονιστικών μεθόδων, την παράδοση και απελευθέρωση πρωτεϊνών και γονιδίων ιδιαίτερα στο νευρολογικό σύστημα, και άλλων.

Ως ιδανικά υλικά-μεμβράνες για τα παραπάνω συστήματα απελευθέρωσης, μελετώνται βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, κύριος εκπρόσωπος των οποίων είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου, περιλαμβάνουν τις χημικές και φυσικές ιδιότητες που συνδέονται με το πολυμερές, όπως η διαλυτότητα και η ευαισθησία στο pH, παράμετροι οι οποίες μελετώνται στην παρούσα εργασία.

Κατ' επέκταση, στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας, είναι η ανάπτυξη βιοδιασπώμενων πολυμερικών και μικρο- σφαιριδίων, με ταυτόχρονη ενθυλάκωση υδρόφιλης ουσίας καθώς και η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης της ουσίας αυτής από το εσωτερικό των σφαιριδίων στο εκάστοτε εξωτερικό περιβάλλον.

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Βιοϋλικά : Ορισμός και κατηγορίες

Η επιστημονική προσέγγιση της δομής και των ιδιοτήτων των βιοϋλικών αποτέλεσαν επιτεύγματα των τελευταίων δεκαετιών, αν και αποτελούν συστατικό της ζωής του ανθρώπου από την αρχή της ιστορίας του. Η αναγκαιότητα της ανάπτυξης τους, έγκειται στη φυσική, βιολογική και χημική συμβατότητα με το βιολογικό τους περιβάλλον, όπως είναι κύτταρα, ιστοί και όργανα [1].

Ένα βιοϋλικό μπορεί να οριστεί ως υλικό προοριζόμενο να διασυνδέεται με βιολογικά συστήματα για την αξιολόγηση, θεραπεία, αύξηση ή αντικατάσταση οποιουδήποτε ιστού, οργάνου ή λειτουργία του σώματος. Είναι μη φαρμακευτικά υλικά αιχμής και μπορούν να είναι βιο- απορροφήσιμα, ένθετα ή χειρουργικά υλικά. Η βασική προϋπόθεση για να θεωρηθεί ένα υλικό ως βιοϋλικό είναι να εμφανίζει βιοσυμβατότητα, δηλαδή την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον ανθρώπινο ιστό χωρίς την εκδήλωση αξιόλογων κλινικά αντιδράσεων, όπως είναι η θρομβογένεση, οι αλλεργικές ή φλεγμονώδεις αντιδράσεις, η βλάβη των παρακείμενων ιστών, η καρκινογένεση και άλλα [1].

Με βάση το υλικό κατασκευής τους, τα βιοϋλικά μπορούν κατηγοριοποιηθούν ως εξής [2] ,[3]:

i) Βιοκεραμικά (π.χ. οξείδιο του αργιλίου, φωσφορικό ασβέστιο). Είναι υλικά τα οποία παρουσιάζουν αντίσταση στην τριβή και τη διάβρωση και μπορούν να είναι αδρανή ή ενεργά. Τα αδρανή βιοκεραμικά υλικά, τα οποία δεν εμφανίζουν διεπιφανειακή σύνδεση με τον ιστό, είναι ανθεκτικά σε χαμηλές τιμές pH για μεγάλο χρονικό διάστημα, εμφανίζουν υψηλή βιοσυμβατότητα και μηχανική αντοχή και συνεπώς προορίζονται για μόνιμη χρήση. Σε αντίθεση, τα βιοενεργά βιοκεραμικά υλικά χαρακτηρίζονται ως προσωρινά βιοϋλικά, καθώς παραμένουν στην περιοχή της εμφύτευσης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο απαιτείται μέχρι τη φυσική ανάπλαση του νέου ιστού, από τον οργανισμό.

ii) Μέταλλα (π.χ. Τιτάνιο, κράματα Co- Cr). Υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για ορθοπεδικές εφαρμογές, παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση σε τριβή και μπορούν να είναι, επίσης βιοαδρανή ή βιοενεργά.

Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η εξαιρετική θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητά τους, ωστόσο είναι επιρρεπή στη διάβρωση και στη δημιουργία αλλεργικών αντιδράσεων.

iii) Βιοπολυμερή (π.χ. PLA, PMMA, PET, Silicones). Είναι υλικά τα οποία μπορούν να είναι βιοαπορροφήσιμα ή βιοδιασπώμενα, έχουν εύκολα προσαρμόσιμες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες, αν και παρουσιάζουν μειωμένη ανοχή στις υψηλές θερμοκρασίες. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φυσικά βιοπολυμερή και τα τεχνητά βιοπολυμερή.

iv) Σύνθετα βιοπολυμερή (π.χ. επόξυ-γραφίτης, καρβίδια του κοβαλτίου), υλικά τα οποία είναι ετερογενή σε μακροκλίμακα και κατασκευάζονται από δύο ή περισσότερα υλικά, χωρίς να αναπτύσσουν μεταξύ τους χημικούς δεσμούς. Επιπλέον, μπορούν εύκολα να μορφοποιηθούν στα επιθυμητά σχήματα, που τα απλά υλικά δεν μπορούν να ανταποκριθούν, έχουν προσαρμόσιμες φυσικές και μηχανικές ιδιότητες και είναι βιοαπορροφήσιμα. Το κίνητρο για την ανάπτυξη σύνθετων βιοπολυμερών ήταν η επιθυμία δημιουργίας συγκεκριμένων ιδιοτήτων, τις οποίες δεν εμφανίζουν τα απλά υλικά [4].

Μια ακόμα κατηγοριοποίηση των βιοϋλικών, αφορά την αλληλεπίδραση τους με τους ιστούς. [5]. Στη πρώτη κατηγορία ανήκουν τα βιοαδρανή βιοϋλικά, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά αντικατάστασης οργάνων. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα βιοενεργά και τα βιοαπορροφήσιμα υλικά που προορίζονται για αποκατάσταση, και όχι αντικατάσταση, των οργάνων. Τέλος, υπό ανάπτυξη και στη τρίτη κατηγορία, ανήκουν τα καινοτόμα υλικά τα οποία προάγουν την ανάπτυξη νέου ιστού, λόγω αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα. Δρουν σε μοριακό επίπεδο, οδηγούν τα κύτταρα προς επιθυμητές κατευθύνσεις και στοχεύουν στην αναγέννηση των ιστών.

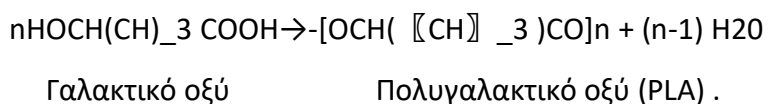
1.1.1 Βιοπολυμερή

Τα βιοπολυμερή για περίπου 40 χρόνια χρησιμοποιούνται στον τομέα των βιοϋλικών και ιατρικών συσκευών. Τα υλικά αυτά παίρνουν εύκολα το επιθυμητό σχήμα και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στις διαβρωτικές συνθήκες του βιολογικού περιβάλλοντος. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα φυσικά βιοπολυμερή και τα τεχνητά βιοπολυμερή. Στα φυσικά βιοπολυμερή συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, η κελουλόζη (πολυσακχαρίτες) και το φυσικό λάστιχο (πολυισοπρένιο). Στα συνθετικά βιοπολυμερή ανήκει μία ευρεία κατηγορία υλικών, όπως πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροπυλένιο (PP), πολυ-τετρα-φθορο αιθυλένιο (PTFE), πολυ-μεθυλακρικό (PMMA)-τετραφθαλικό οξύ, και άλλα.

Τα συνθετικά βιοπολυμερή ταξινομούνται περαιτέρω σε διάφορες κατηγορίες, σύμφωνα με τον μηχανισμό πολυμερισμού (ομοπολυμερή, συμπολυμερή), της δομής τους και της φυσικοχημικής συμπεριφοράς τους [2]. Τρεις είναι οι γενικοί τρόποι σύνθεσης:

- α) η προσθήκη ριζών άνθρακα σε διπλούς ή τριπλούς δεσμούς,
- β) σχάση του δακτυλίου του μονομερούς και
- γ) πολυμερισμός με βήμα ανάπτυξης ή συμπύκνωσης,

Στην τελευταία κατηγορία συμπεριλαμβάνονται μόρια όπως το γαλακτικό οξύ. Στην περίπτωση αυτή, από ένα μόριο το οποίο περιέχει περισσότερες από δύο διαφορετικές ομάδες αποβάλλεται ένα μικρότερο μόριο και παράγεται ένα διμερές. Το γαλακτικό οξύ, με θέρμανση αποβάλλει ένα μόριο νερού και σχηματίζεται το πολυγαλακτικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση



Μερικές από τις εφαρμογές των βιοπολυμερών συνοψίζονται στο παρακάτω πίνακα

Βιοπολυμερή	Εφαρμογή
Πολυεστέρες	Μεταφορά φαρμάκων, ράμματα, επικαλύψεις, στενες, μικρο-νανοσωματίδια
Πολυαιθυλενιμίνες	Γονιδιακή μεταφορά, ιστική μηχανική
Πολυαμίδια	Επικάλυψη τραύματος
Πολυγλυκολικό οξύ (PGA)	Απορροφήσιμα ράμματα, απορροφήσιμες συσκευές οστεοσύνθεσης
Πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA)	Οστικά τσιμέντα, φακοί επαφής, ενδοφθάλμιοι φακοί, προσθετικές οδοντιατρικές εργασίες
Σιλικόνες	Εμφυτεύματα μαλακών ιστών (breast implants), αποτυπωτικά οδοντιατρικά βιοϋλικά
Πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)	Αγγειακά εμφυτεύματα, καρδιακές βαλβίδες, μη απορροφήσιμες μεμβράνες ιστικής αναγέννησης
Πολυμεθακρυλικά	Φακοί επαφής
Πολυπεπτίδια	Γονιδιακή μεταφορά, βιο-ιατρική απεικόνιση, μεταφορά φαρμάκων
Πολυσακχαρίτες	Ιστική μηχανική, νανοσωματίδια
Πολυνουκλεοτίδια	Βιο-ιατρική απεικόνιση

Πίνακας 1 : Παραδείγματα εφαρμογών των βιοπολυμερών [2]

1.1.2 Βιοδιασπώμενα πολυμερή

Ο τομέας της ανάπτυξης βιοδιασπώμενων πολυμερικών υλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές, έχει παρουσιάσει σημαντική πρόοδο τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, καθώς τα παραγόμενα υλικά είναι υποψήφια για τη δημιουργία και τη βελτιστοποίηση συστημάτων χορήγησης φαρμάκων . Προσωρινά προσθετικά μέλη, ικρίσματα για τον τομέα της μηχανικής ιστών και φυσικά φορείς ελεγχόμενης χορήγησης δραστικών ουσιών στον οργανισμό, είναι δομές που αναπτύσσονται χάρη στην εκτεταμένη μελέτη των βιοϋλικών. Κάθε εφαρμογή από τις παραπάνω, απαιτεί υλικά με συγκεκριμένες φυσικές, χημικές, βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική θεραπεία.

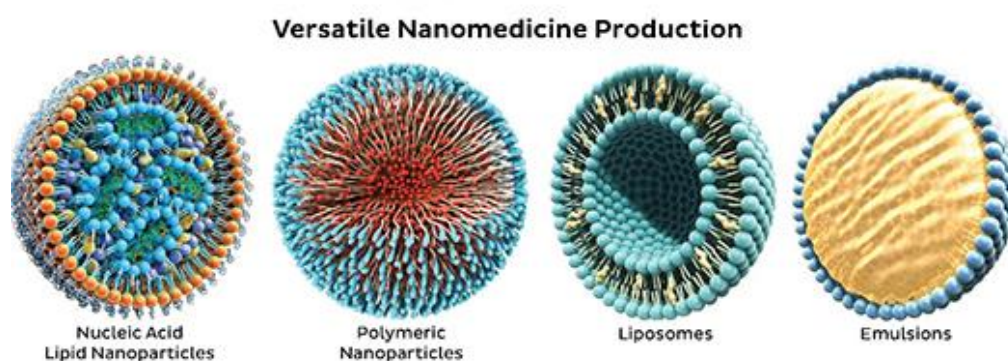
Κυριαρχεί η πρόβλεψη ότι τα επόμενα χρόνια πολλές από τις μόνιμες προσθετικές συσκευές που χρησιμοποιούνται ακόμα για προσωρινές θεραπευτικές εφαρμογές, θα αντικατασταθούν από αντίστοιχες βιοδιασπώμενες, οι οποίες θα

βοηθούν το σώμα να αναπαράγει και να αντικαταστήσει τους κατεστραμμένους ιστούς. Η κινητήρια δύναμη για την παραπάνω προσδοκία είναι τα προβλήματα συμβατότητας των μόνιμων εμφυτευμάτων με τον ιστό [3].

1.2 Βιοδιασπώμενα πολυμερή ως φορείς φαρμάκων ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Η ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερικών συστημάτων έχει επιφέρει σημαντικές εξελίξεις στον κλάδο της ιατρικής τις τελευταίες δεκαετίες, οδηγώντας σε βελτιστοποιήσεις που αφορούν την παράδοση και αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών (drug delivery, drug release). Αφ ενός οι σύντομοι χρόνοι ημι-ζωής πολλών ισχυρών θεραπευτικών δομών, όπως των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και άλλων βιοενεργών μορίων και αφετέρου η ανάγκη στοχευμένης και ελεγχόμενης φαρμακευτικής δράσης υπήρξε κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη βιοσυμβατών φορέων παροχής φαρμάκων [1].

Στα πολυμερικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ανήκουν μακρομοριακές δομές που κυμαίνονται από μικκύλια και γαλακτώματα μέχρι σύνθετες δομές που ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Η δραστική ουσία μπορεί να ενσωματωθεί φυσικά στη μήτρα ή την εξωτερική επιφάνεια του πολυμερούς, ή ακόμα μπορεί να συνδεθεί με το πολυμερές με ομοιοπολικούς δεσμούς [6].



Εικόνα 1 : Δομές πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων [6].

Η διαφορετικότητα και η ποικιλία των σχημάτων που μπορούν να πάρουν οι πολυμερικές δομές είναι από τα κυριότερα πλεονεκτήματα τους συγκριτικά με άλλα συστήματα χορήγησης δραστικών ουσιών. Οι πολυμερικές αρχιτεκτονικές δομές παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα των φορέων, καθώς αν υπάρξουν μικρές αλλαγές στη δομή, μπορούν να επάγουν αλλαγές τόσο στην ικανότητα πρόσληψης φαρμάκου όσο και στον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του πολυμερούς.

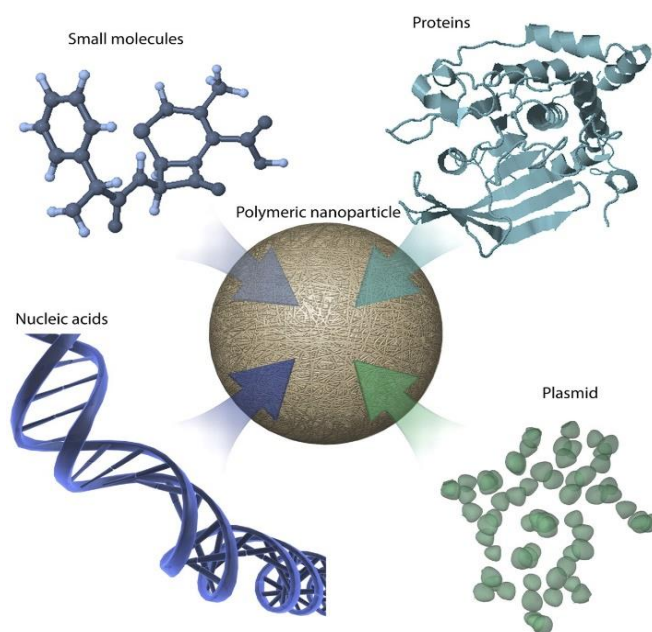
Στις πρώτες μελέτες ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε πολυεστέρες, χρησιμοποιήθηκε το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), ενώ τα τελευταία χρόνια μελετάται και το πολυ γαλακτικό-συν γλυκολικό οξύ (PLGA), καθώς ο χρόνος αποσύνθεσης του πληρεί τα κριτήρια απελευθέρωσης φαρμάκων στον οργανισμό [7]. Άλλοι λόγοι για την εκτεταμένη χρήση των παραπάνω υλικών είναι η έγκριση για χρήση σε πολλά βιοϊατρικά και φαρμακευτικά προϊόντα καθώς και η χρήση στον άνθρωπο, η εμπορική του διαθεσιμότητα και η εύκολη διαλυτότητα του σε οργανικούς διαλύτες.

Παρ' όλα αυτά η επιλογή του κατάλληλου πολυμερούς εξαρτάται κυρίως α) από την οδό χορήγησης (πεπτική, ενδομυϊκή, αναπνευστική ενδοφλέβια, κλπ) που πρόκειται να ακολουθήσει, καθώς και το περιβάλλον που έρχεται σε επαφή το πολυμερές επηρεάζει τον ρυθμό αποδόμησης του, και β) από την αλληλεπίδραση της δραστικής ουσίας με το πολυμερές. Επιπλέον, πρέπει να εξεταστούν: το μοριακό του βάρος, η ακραία ομάδα του πολυμερούς και η κρυσταλλικότητα του [7].

Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει το μέσο διάλυσης του φορέα, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η *in vivo* αποικοδόμηση του πολυμερούς είναι πιο γρήγορη σε σύγκριση με την *in vitro*, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Επιπλέον, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συσσωμάτωση μικροσωματιδίων στον ιστό, μπορεί να αυξήσει τη συγκράτηση των όξινων προϊόντων και συνεπώς να επιταχυνθεί η αυτοκαταλυτική σχάση της πολυμερικής αλυσίδας [7].

1.2.1 Χρησιμότητα πολυμερικών φορέων

Τα πολυμερικά συστήματα χορήγησης δραστικών ουσιών έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν σταθερές τις θεραπευτικές ιδιότητες του φαρμάκου και παράλληλα να μειώνουν τις επιβλαβείς παρενέργειες. Επιπλέον, παρέχουν τη δυνατότητα ελαχιστοποίησης της ποσότητας της δραστικής ουσίας καθώς επίσης και μείωσης του αριθμού των φαρμακευτικών δόσεων. Η επιτυχής κλινική εφαρμογή των παραπάνω φορέων οδήγησε στην έρευνα και δημιουργία αντίστοιχων δομών στη νάνο-κλίμακα που είναι ικανές να ξεπεράσουν αρκετούς φαρμακολογικούς περιορισμούς των συμβατικών μορφών δοσολογίας. Η χρησιμότητα των νανοσωματιδίων έγκειται στο γεγονός ότι μπορούν να ενθυλακώσουν φάρμακα και να τα προστατεύουν από την υδρόλυση και την ενζυματική αποικοδόμηση στο γαστρεντερικό σύστημα, καθώς και να παραμένουν στη κυκλοφορία του αίματος για μεγάλη διάρκεια. Επιπλέον, τα προστατευμένα από το πολυμερές φάρμακα μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, και να απελευθερώνονται στοχευμένα, σε ειδικά οργανίδια εντός του κυττάρου [8]. Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων των πολυμερικών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης, οι δομές αυτές έχουν βρει πληθώρα εφαρμογών σε μεταφορά και στοχευμένη παράδοση (targeting) μικρών μορίων, πρωτεϊνών, γενετικού υλικού και άλλων [9].



Εικόνα 2 : Παραδείγματα χρήσης πολυμερικών μικρο- νανο φορέων [48].

Μικρά μόρια φαρμάκων

Η χορήγηση μικρών μορίων φαρμάκων μέσω πολυμερικών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης παρουσιάζει πληθώρα εφαρμογών, ιδιαίτερα στον τομέα των νευροεπιστημών, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας του καρκίνου του νευρικού συστήματος και τη χορήγηση νευροδιαβιβαστικών ουσιών. Διάφορα είδη μικρών μορίων έχουν ήδη ενσωματωθεί με επιτυχία σε πολυμερικά συστήματα [8]. Μερικά τέτοια φάρμακα που ενσωματώνονται σε συστήματα παράδοσης, είναι α) οι νευρικοί ιχνηθέτες, β) οι αγωνιστές - δηλαδή φάρμακα που αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα προκαλούν βιολογικό αποτέλεσμα, γ) οι ανταγωνιστές, δηλαδή φάρμακα που αλληλεπιδρούν με έναν υποδοχέα και εμποδίζουν τη δράση ενός αγωνιστή, χωρίς να ενεργοποιούν τον υποδοχέα. Οι υποδοχείς των φαρμάκων μπορεί να είναι πρωτεΐνες και παραλλαγές αυτών (λίποπρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες κλπ)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά μικρά μόρια φαρμάκων που έχουν ενσωματωθεί σε βιοϋλικά και έχει γίνει μελέτη και αξιοποίηση του ρυθμού αποδέσμευσης τους.

Φάρμακο	Βιοϋλικό	Εφαρμογή
Πακλιταξέλη	PEG-PLA microspheres	Αντιμικροσωληναριακό φάρμακο. Αποδέσμευση in vitro.
Καρβοπλατίνη	PLGA microspheres	Αντινεοπλασματική δράση, in vivo. Ενδοεγκεφαλική απελευθέρωση.
Ισονιαζίδη	PLGA microspheres	Βακτηριοκτόνος παράγων έναντι των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης.
Ντοπαμίνη	Ethylene vinyl alcohol copolymer	Κατεχολαμίνη
Βρωμοδεσοξουριδίνη	PLGA microspheres	In vivo επισήμανση κυττάρων

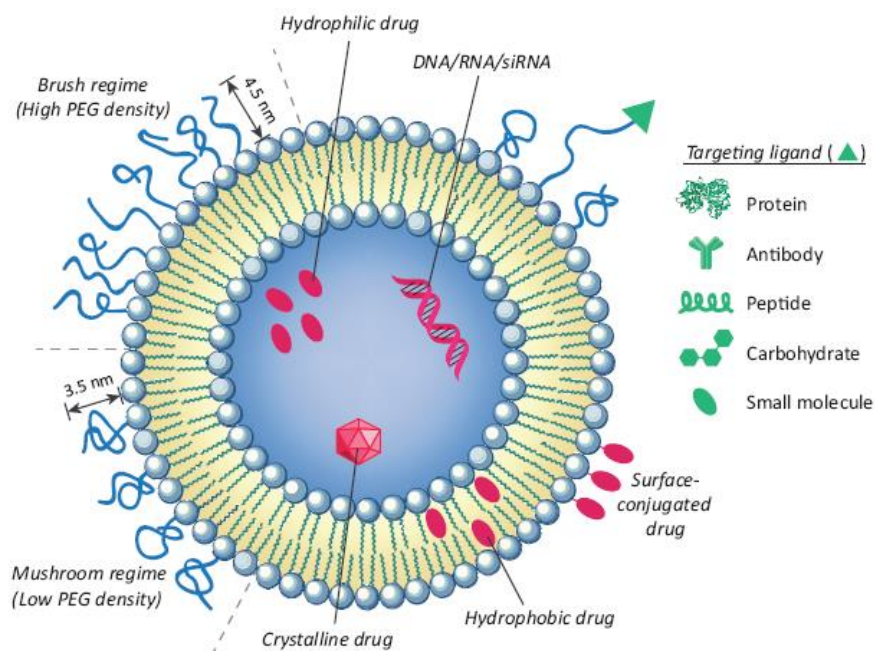
Πίνακας 2: Παραδείγματα φαρμακευτικών μορίων που έχουν ενσωματωθεί σε μικρόσφαιρες βιοϋλικών [9].

Παράδοση - απελευθέρωση πρωτεϊνών

Η εξωγενής απελευθέρωση πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση ενός εξειδικευμένου κυτταρικού πληθυσμού ή για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας. Έτσι, μονοκλωνικά αντισώματα, ένζυμα αποικοδόμησης μήτρας και διάφορες άλλες πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Πολυμερικά συστήματα μπορούν να ενθυλακώσουν τις πρωτεΐνες, μέσω υδατικών διαλυμάτων που υφίστανται επεξεργασία με διπλό γαλάκτωμα ή ως στερεά μετά από λυοφιλοποίηση, διευκολύνοντας τη θεραπευτική τους δράση, και ξεπερνώντας τα εμπόδια που σχετίζονται με χαμηλές -από του στόματος και διαδερμικές - βιοδιαθεσιμότητες. Τα πολυμερικά σκευάσματα προστατεύουν την πρωτεΐνη από την αποικοδόμηση ή απομάκρυνση βοηθώντας έτσι να διατηρηθεί η συγκέντρωση σε θεραπευτικά επίπεδα όπου υπάρχει η δυνατότητα τοπικής ή συστημικής παράδοσης [9].

Παράδοση - απελευθέρωση γονιδίων

Η ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών μεθόδων για την παροχή γενετικού υλικού σε συγκεκριμένα κύτταρα εντός του σώματος υπήρξε ένας περιοριστικός παράγοντας στην εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας. Οι μεθοδολογίες παράδοσης περιελάμβαναν τη χρήση ανασχεδιασμένων ιών και συνθετικών υλικών, ενώ παράλληλα τα βιοπολυμερή παρουσίαζαν πολλές ιδιότητες περιλαμβανομένης της πολύ ευέλικτης χημείας, των δυνατοτήτων βιοσυμβατότητας, της απλότητας και της οικονομίας, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν εξαιρετικούς υποψήφιους για μέσα παράδοσης γονιδίων. Πολυμερικά συστήματα απελευθέρωσης μπορούν να διευκολύνουν την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας στη νευροεπιστήμη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη νευρική αναγέννηση ή για την πρόληψη του εκφυλισμού, δίνοντας τη δυνατότητα ελέγχου της παραγωγής πρωτεΐνης μετά την εμφύτευση, με χρήση ειδικά διαμορφωμένων_φορέων [10], [14].



Εικόνα 3 : Δομικές και σχεδιαστικές εκτιμήσεις για τη χορήγηση λιποσωμικών φαρμάκων [14] .

Μελέτη για τη θεραπεία του καρκίνου

Ένα από τα πιο διαδεδομένα πεδία έρευνας των νανοσωματιδίων ως φορείς δραστικών ουσιών, είναι η μελέτη για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι συμβατικοί φορείς χημικοθεραπευτικών φαρμάκων κατανέμονται εξίσου στους ιστούς και επηρεάζουν τόσο τα καρκινικά όσο και τα υγιή κύτταρα. Ως αποτέλεσμα αυτού, αφενός περιορίζεται η ποσότητα της δραστικής ουσίας που φτάνει στα καρκινικά κύτταρα και αφετέρου επιτυγχάνεται υποβέλτιστη θεραπεία καθώς αυξάνεται το ποσοστό τοξικότητας. Ως λύση αυτού του προβλήματος μελετάται η χρήση νανοσωματιδίων, τα οποία, χρησιμοποιώντας τόσο παθητικές όσο και ενεργητικές στρατηγικές στόχευσης, μπορούν να ενισχύσουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα, αποφεύγοντας ταυτόχρονα την τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι μικρο- και νάνο-κάψουλες που περικλείουν τις δραστικές ουσίες, μπορούν να φτάσουν στο σημείο του όγκου και δεχόμενες ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον του, να παρουσιάσουν ενισχυμένη διαπερατότητα ή κατακράτηση ουσιών, από το εσωτερικό τους, προς και από το περιβάλλον . Επιπλέον, όταν τα νανοσωματίδια δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς και

στη συνέχεια εισέρχονται στο κύτταρο, συνήθως περιβάλλονται από ενδοσώματα (κοιλότητα που απαντάται στην κυτταρική μεμβράνη κύτταρων), παρακάμπτοντας έτσι την αναγνώριση της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, ενός από τους κύριους μηχανισμούς αντίστασης σε φάρμακα [11].

Αιματοεγκεφαλικός φραγμός: *Μεταφορά φαρμάκων στον εγκέφαλο για νευρολογικές παθήσεις.*

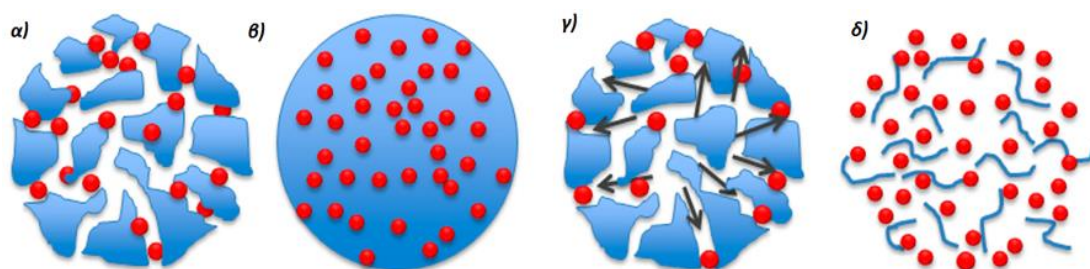
Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι μια μεμβράνη που προστατεύει τον νευρικό ιστό του εγκεφάλου από τις μεταβολές της σύνθεσης του αίματος του εξωκυτταρικού υγρού. Είναι ένα εξαιρετικά επιλεκτικό ημιπερατό φράγμα που σχηματίζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου και επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο των ουσιών που εισέρχονται ή εξέρχονται από τον εγκέφαλο. Οι μεταβολικές διεργασίες εντός των τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση αίματος – εγκεφάλου. Οι περισσότεροι νευροδιαβιβαστές που υπάρχουν στο αίμα καθώς επίσης και φαρμακευτικοί φορείς, δεν εισέρχονται στον εγκέφαλο εξαιτίας της χαμηλής λιπιδικής διαλυτότητάς τους και της έλλειψης ειδικών φορέων μεταφοράς στη μεμβράνη του τριχοειδούς ενδοθηλιακού [12].

Ως παράδειγμα, αναφέρεται η ντοπαμίνη που είναι ένα μόριο που συντίθεται φυσικά στους νευρώνες του εγκεφάλου, η ανεπάρκεια του οποίου αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της νευροεκφυλιστικής νόσου του Parkinson. Στη περίπτωση αυτή, η έγχυση ντοπαμίνης στον ανθρώπινο εγκέφαλο δεν είναι εφικτή λόγω της ύπαρξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ως λύση στο πρόβλημα αυτό, μελετάται η ανάπτυξη πολυμερικών νανοσωματιδίων παροχής ντοπαμίνης τα οποία θα είναι διαπερατά από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ενθυλάκωση της ντοπαμίνης σε νανοσωματίδια, μπορεί να επιφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η παράδοση της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο με σταθερό και ελεγχόμενο τρόπο. Επιπλέον, είναι δυνατόν να περιοριστεί η αλληλεπίδραση της δραστικής ουσίας με άλλους φορείς του αίματος που υποβαθμίζουν την αποτελεσματικότητά της.

Ακόμα, με αυτό τον τρόπο χορήγησης μειώνεται η ανοχή του οργανισμού στο φάρμακο, γεγονός που συναντάται συχνά σε χρόνιες παθήσεις. Τέλος, γίνεται εφικτή η μείωση της ανάγκης επανάληψης χορήγησης φαρμάκων και η μείωση της τοξικότητας σε υγιείς ιστούς [13].

1.2.2. Μηχανισμοί αποδόμησης πολυμερικών φαρμακευτικών φορέων

Στα πολυμερικά συστήματα, η φράση “απελευθέρωση φαρμάκου” αναφέρεται στη διαδικασία που ακολουθείται από τα μόρια του φαρμάκου ώστε να μεταφερθούν από τη μήτρα του πολυμερούς στην εξωτερική επιφάνεια του, καθώς επίσης και στη διαδικασία απελευθέρωσης στον περιβάλλοντα χώρο. Τα μόρια των φαρμάκων μπορούν να απελευθερωθούν από τα συστήματα χορήγησης, μέσω διάχυσης από πόρους που είναι γεμάτοι με νερό. Μια διαδικασία η οποία υποκινείται από τυχαίες κινήσεις των μορίων του φαρμάκου και καθοδηγείται από τις βαθμίδες του χημικού δυναμικού (chemical potential gradients) καθώς και μέσω της διάδοσης θερμότητας (convection) του προέρχεται από την οσμωτική πίεση. Εκτός από τη διάχυση, τα μόρια των φαρμάκων μπορούν να απελευθερωθούν από τη πολυμερική μήτρα, μέσω διάβρωσης, η οποία οδηγεί σε φαινόμενα σχηματισμού πόρων και στη συνέχεια σε διαβρωτικά φαινόμενα και συνήθως παρατηρείται μετά από μια αρχική περίοδο με ελεγχόμενη διάχυση. Πιο αναλυτικά, οι κύριοι μηχανισμοί ελεγχόμενης απελευθέρωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής [7], [15] :



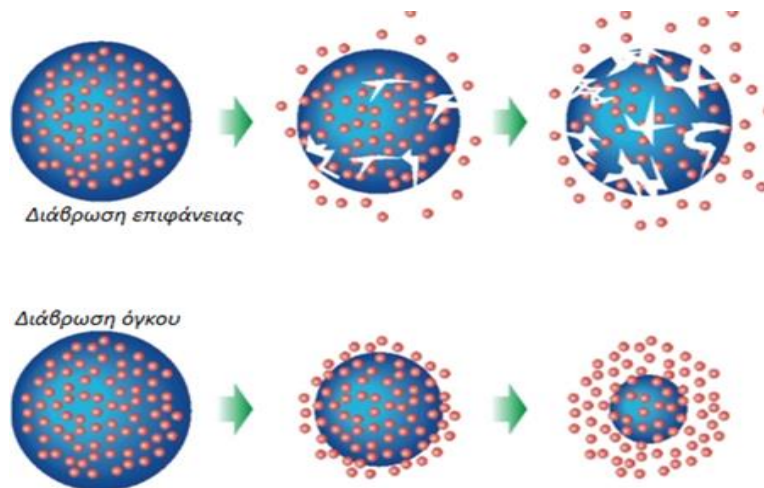
Εικόνα 4: Κύριοι μηχανισμοί απελευθέρωσης δραστικών ουσιών από βιοπολυμερή. α) Διάχυση φαρμάκου μέσω πόρων, β) Διάχυση του φαρμάκου από τη πολυμερική μήτρα, γ) Οσμωτική άντληση του φαρμάκου, δ) Διάβρωση του πολυμερούς [7].

α) Διάχυση του φαρμάκου μέσω πόρων. Σε αποικοδομήσιμα πολυμερικά συστήματα, ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκου ελέγχεται με διάχυση μέσω ενός δικτύου πόρων με εξελισσόμενες δομές, καθώς το πολυμερές επίσης αποικοδομείται. Το νερό που βρίσκεται μέσα στο πολυμερές διέρχεται μέσα από πόρους του πολυμερούς, το μέγεθος των οποίων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, δημιουργώντας, τελικά, πόρους αρκετά μεγαλύτερου μεγέθους, διευκολύνοντας έτσι την απελευθέρωση του φαρμάκου. Η ταχύτητα με την οποία το νερό εισέρχεται στους πόρους είναι μεγαλύτερη από αυτήν της κίνησης του φαρμάκου προς το εξωτερικό του πολυμερούς.

β) Διάχυση του φαρμάκου από την πολυμερική μήτρα. Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια των φαρμάκων διαχέονται από τη μήτρα του πολυμερούς. Σε μη αποικοδομήσιμες δομές απελευθέρωσης φαρμάκου, η διάχυση είναι η κύρια κινητήρια δύναμη για την απελευθέρωσή του. Ο ρυθμός απελευθέρωσης παραμένει σταθερός και δεν επηρεάζεται από βαθμίδες συγκέντρωσης αλλά από τις ιδιότητες της πολυμερικής μεμβράνης, όπως είναι η διαπερατότητα και το πάχος της.

γ) Οσμωτική άντληση του φαρμάκου. Ένας άλλος τρόπος απελευθέρωσης φαρμάκου μέσω των πόρων του πολυμερούς, είναι η οσμωτική πίεση που προκαλείται από τη μεταφορά θερμότητας (convection). Η εισροή ύδατος σε ένα μη διογκωμένο σύστημα προκαλείται από οσμωτική πίεση και η μεταφορά φαρμάκου ως αποτέλεσμα της παραγόμενης δύναμης αναφέρεται ως οσμωτική άντληση.

δ) Διάβρωση του πολυμερούς. Η διάβρωση του πολυμερούς χωρίζεται σε δύο κατηγορίες όσον αφορά την εκκίνηση της διάβρωσης. Η πρώτη περιλαμβάνει τη διάβρωση της επιφάνειας του πολυμερούς, ενώ η δεύτερη τη διάβρωση του όγκου του.



Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση της διάβρωσης της επιφάνειας και του όγκου πολυμερούς [15].

Η επιφανειακή διάβρωση εμφανίζεται όταν τα πολυμερή αποικοδομούνται ξεκινώντας από την επιφάνεια της μήτρας τους, μειώνοντας αργά το μέγεθος της, από το εξωτερικό προς το εσωτερικό. Αυτό συμβαίνει όταν ο ρυθμός διάβρωσης είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό διείσδυσης νερού στον όγκο του πολυμερούς. Το φαινόμενο της διάβρωσης της επιφάνειας είναι ιδανικό για πολλές εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων, καθώς η κινητική της διάβρωσης και συνεπώς η απελευθέρωση του φαρμάκου είναι ελεγχόμενη και επαναλήψιμη. Επιπλέον, ο αργός ρυθμός διείσδυσης νερού είναι ιδανικός για την παράδοση φαρμάκων, καθώς προστατεύονται τα ευαίσθητα στο νερό, φάρμακα.

Η μαζική διάβρωση (bulk erosion), δηλαδή η διάβρωση του όγκου του πολυμερούς, συμβαίνει όταν το νερό διεισδύει στο μεγαλύτερο μέρος του πολυμερούς, πράγμα που οδηγεί σε ομογενή αποδόμηση ολόκληρης της μήτρας. Ο ρυθμός με τον οποίο διεισδύει το νερό στον κύριο όγκο είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό διάβρωσης και ως αποτέλεσμα αυτού, τα τμήματα του πολυμερούς εντός του μεγαλύτερου μέρους της μήτρας είναι πιθανό να υδρολυθούν. Το γεγονός ότι η διάβρωση του όγκου είναι λιγότερο προβλέψιμη από τη διάβρωση της επιφάνειας και δεν προστατεύει τα φάρμακα από το περιβάλλον, καθιστά τον μηχανισμό αυτό ως μη βέλτιστο μηχανισμό για την ελεγχόμενη παράδοση φαρμάκων [15].

1.2.2.1 Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκου από αλειφατικούς πολυεστέρες

Οι πολυ (εστέρες) όπως PLGA ή το PLA τείνουν να υφίστανται διάβρωση στον όγκο τους, χωρίς όμως η απελευθέρωση φαρμάκου να περιορίζεται μόνο στην αποικοδόμηση. Οι δύο κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων PLA είναι η διάχυση και η διάβρωση. Αρχικά, οι βαθμίδες συγκέντρωσης καθώς και το σχήμα της δομής χορήγησης φαρμάκου παίζουν κύριο ρόλο στην απελευθέρωση του φαρμάκου, ενώ η αποικοδόμηση της πολυμερικής μήτρας αρχίζει να υπερισχύει στα μεταγενέστερα στάδια απελευθέρωσης.

Πιο αναλυτικά, η απορρόφηση νερού οδηγεί σε σχηματισμό πόρων στην μήτρα ταχύτερα από ό, τι η απελευθέρωση του φαρμάκου. Με την πάροδο του χρόνου, η απορρόφηση προκαλεί τη διόγκωση του πολυμερούς, δημιουργώντας πόρους αρκετά μεγαλύτερους για τη μεταφορά του φαρμάκου. Η υδρόλυση εστερικών δεσμών στο PLA λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την επαφή με το νερό και οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, που καταλύει περαιτέρω την υδρόλυση. Η διάσπαση δεσμού εστέρος είναι μια αυτοκαταλυτική διεργασία η οποία οδηγεί σε ετερογενή αποικοδόμηση εντός της μήτρας [7].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρολυτική συμπεριφορά αποικοδόμησης των βιοαποικοδομήσιμων πολυεστέρων είναι οι εξής :

- Διαπερατότητα του νερού και διαλυτότητα (υδροφιλικότητα / υδροφοβικότητα)
- Χημική σύνθεση
- Μηχανισμός υδρόλυσης (μη καταλυτικός , αυτοκαταλυτικός , ενζυματικός)
- Πρόσθετα (όξινη ή βασική ουσία , διαλύτες, φάρμακα)
- Μορφολογία (κρυσταλλική, άμορφη)
- Διαστάσεις δομής (μέγεθος, σχήμα, αναλογία επιφάνειας προς όγκο)
- Πορώδες
- Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg)
- Μοριακό βάρος και κατανομή μοριακού βάρους
- Φυσικοχημικοί παράγοντες (ανταλλαγή ιόντων, ιοντική ισχύς, pH)

Το PLA υφίσταται διάβρωση λόγω της ταχείας ενυδάτωσης και η διάλυση των προϊόντων αποικοδόμησης του πολυμερούς δημιουργεί ακόμη περισσότερους

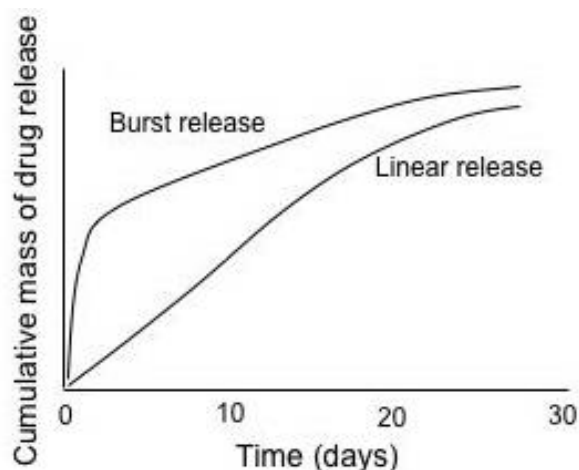
πόρους. Αυτοί οι πόροι αναπτύσσονται έπειτα σε μέγεθος, καθώς η περαιτέρω επαφή με το νερό οδηγεί σε υδρόλυση και οι τοπικές διαβαθμίσεις του οξέος καταλύουν περαιτέρω την αποικοδόμηση του πολυμερούς. Οι μικρότεροι πόροι συγχωνεύονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερους πόρους, μια διαδικασία που ελέγχεται από την κινητικότητα των πολυμερικών αλυσίδων, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την Tg. Όσο πιο υαλοειδής είναι η μήτρα, τόσο πιο αργή είναι η υδρόλυση και επομένως η απορρόφηση νερού [16]. Εκτός από τον σχηματισμό πόρων, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση φαρμάκου περιλαμβάνουν τη διάλυση του φαρμάκου, τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-φαρμάκου και τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου.

1.2.2.2 Φαινόμενο στιγμιαίας απελευθέρωσης

Στα πολυμερικά συστήματα παροχής φαρμάκου ελεγχόμενης αποδέσμευσης, όταν το σύστημα παροχής αρχικά βυθίζεται στο μέσο απελευθέρωσης, παρατηρείται μια ταχεία και μικρή χρονικά, αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, η οποία γρήγορα ελαττώνεται και έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα παραμένει σταθερή στη μέγιστη τιμή της. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως 'Burst Release Effect' και δυσχεραίνει τον έλεγχο της αποδέσμευσης του φαρμάκου. Ορισμένα αίτια για την στιγμιαία αυτή αποδέσμευση είναι τα εξής: α) η δραστική ουσία να έχει απομακρυνθεί από το εσωτερικό του πολυμερούς και να έχει διαχυθεί στην επιφάνεια του, με αποτέλεσμα να εκρήγνυται προς τα έξω όταν τοποθετηθεί για πρώτη φορά στο μέσο απελευθέρωσης, β) οι διεργασίες ξήρανσης να οδηγούν σε φαινόμενα απελευθέρωσης, καθώς τα μόρια νερού μετακινούνται στην επιφάνεια του πηκτώματος, μεταφέροντας μόρια φαρμάκου και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στην επιφάνεια του φορέα, γ) ετερογενείς πολυμερικές μήτρες και κατασκευαστικά ελαττώματα [16].

Μια τεχνική για την αποφυγή της στιγμιαίας αποδέσμευσης είναι η προσθήκη μιας επικάλυψης χωρίς φάρμακο στην εξωτερική στιβάδα του συστήματος απελευθέρωσης φαρμάκου. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι το φαινόμενο

της στιγμιαίας αποδέσμευσης θα μπορούσε να μειωθεί με τη χρήση πολυμερών υψηλότερου μοριακού βάρους [16]. Επιπλέον, η ομοιόμορφη φόρτωση του φαρμάκου στο πολυμερές και η μείωση της υδροφιλικότητας του πολυμερούς μπορεί επίσης να επηρεάσει την απελευθέρωση της αποδέσμευσης ελαχιστοποιώντας την είσοδο ύδατος στο σύστημα, η οποία αλλάζει τα μεγέθη των πόρων του πολυμερούς, μειώνοντας την κινητικότητα του ωφέλιμου φορτίου. Πολλοί παράγοντες πρέπει να διερευνηθούν, ανάλογα με την περίπτωση, συμπεριλαμβανομένης της μορφολογίας και του μοριακού βάρους του πολυμερούς, της αρχικής συγκέντρωσης μονομερούς, της υδροφοβικότητας των πολυμερών υπερθερμαντικών ομάδων, της φύσης και του μεγέθους της δραστικής ουσίας καθώς και της μεθόδου κατασκευής και ξήρανσης.



Εικόνα 6: Γράφημα στιγμιαίας και γραμμικής αποδέσμευσης [16].

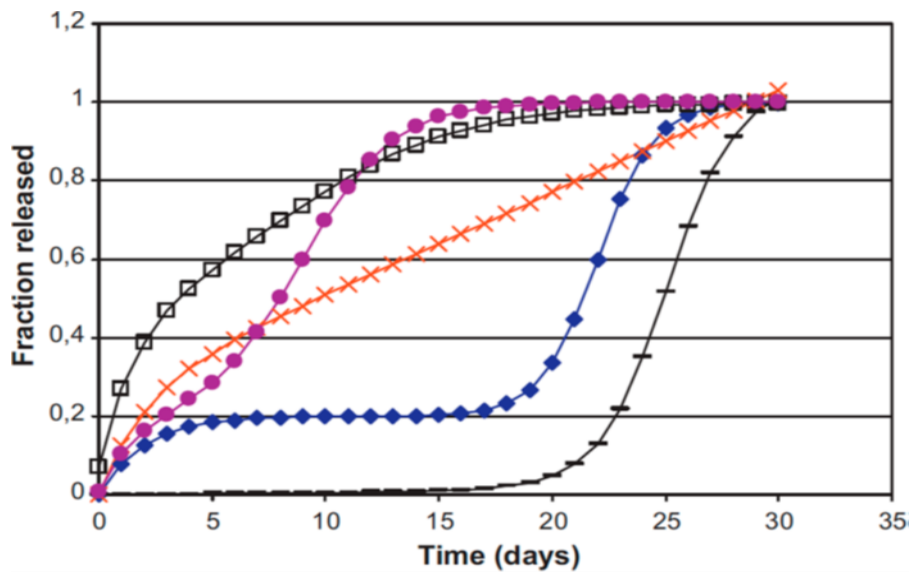
1.2.3 Προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκων

Η ελεγχόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας είναι ένα εφικτό και επιθυμητό χαρακτηριστικό για τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Ο ρυθμός απελευθέρωσης φαρμάκων από πολυμερικά συστήματα ποικίλει και εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών παραμέτρων. Είναι προτιμητέο ένα προφίλ απελευθέρωσης μηδενικής τάξης, σύμφωνα με το οποίο η αποδέσμευση του φαρμάκου από συστήματα παροχής απελευθερώνεται αργά και με σταθερό ρυθμό, ωστόσο τα προφίλ αυτά είναι εξιδανικευμένες καταστάσεις απελευθέρωσης. Το πιο συνηθισμένο προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου αποτελείται από τρεις φάσεις, ενώ

για μικρότερα σωματίδια ο ρυθμός απελευθέρωσης μπορεί να είναι διφασικός. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αρχή και το τέλος κάθε φάσης δεν είναι πάντοτε προφανής, ενώ πολλές φορές παρατηρείται και αλληλοεπικάλυψη των φάσεων [7], [16].

Η πρώτη φάση περιλαμβάνει το φαινόμενο στιγμιαίας απελευθέρωσης (burst effect) και αφορά την ταχεία απελευθέρωση μορίων φαρμάκου που βρίσκονται κοντά στη διεπιφάνεια πολυμερούς - μέσου διάλυσης. Η δεύτερη φάση της απελευθέρωσης ή φάση υστέρησης είναι πιο σταθερή και ελεγχόμενη. Παρατηρείται βραδεία απελευθέρωση που διέπεται από αργή διάχυση φαρμάκου μέσω της πολυμερικής μήτρας ή μέσω υφιστάμενων πόρων και ταυτόχρονα παρατηρείται υδρόλυση και αποικοδόμηση του πολυμερούς. Η τελευταία φάση μπορεί να είναι μια ταχύτερη φάση απελευθέρωσης, καθώς αρχίζει η διάβρωση, αποτέλεσμα της αποσύνθεσης πολυμερών ή ρωγμών στη μήτρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο οι βαθμίδες συγκέντρωσης όσο το σχήμα και το μέγεθος της διάταξης χορήγησης φαρμάκου είναι κυρίαρχοι παράγοντες στην απελευθέρωση, ενώ αργότερα η απελευθέρωση ρυθμίζεται από τον ρυθμό αποικοδόμησης του πολυμερούς. Η υδροφιλικότητα της δραστικής ουσίας επηρεάζει επίσης την απελευθέρωση καθώς τα υδρόφοβα φάρμακα τείνουν να ακολουθούν απελευθέρωση μηδενικής τάξεως, ενώ τα υδρόφιλα φάρμακα παρουσιάζουν ένα τριφασικό μοτίβο.

Το προφίλ απελευθέρωσης των πολυμερικών συστημάτων παροχής φαρμάκου, είναι χρήσιμο κυρίως για να εξακριβωθεί και να βελτιστοποιηθεί ο ρυθμός παρατεταμένης απελευθέρωσης. Για την ακριβέστερη πρόβλεψη και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας *in vivo*, απαιτούνται εξειδικευμένες μέθοδοι παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο με τις προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση να έχουν, πρόσφατα, ξεκινήσει [17].



Εικόνα 7 : Διαφορετικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου [7].

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται οι διαφορετικοί ρυθμοί απελευθέρωσης και οι σχετικές φάσεις. Πιο αναλυτικά παρατηρούμε:

- ▣ : στιγμιαία αποδέσμευση και ταχεία φάση II
- : τριφασική απελευθέρωση με σύντομη φάση II
- ✕ : στιγμιαία αποδέσμευση και απελευθέρωση μηδενικής τάξης
- ◆ : τριφασική απελευθέρωση
- ⚡ : διφασική απελευθέρωση χωρίς απελευθέρωση ριπής - Burst Release Effect

Η απορρόφηση νερού σε συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων με βάση το PLA και συνεπώς ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου εξαρτάται από 1) το μοριακό βάρος του πολυμερούς, 2) την κάλυψη ακραίας ομάδας του πολυμερούς, συνήθως με εστέρα ή οξύ, 3) τη φύση του ωφέλιμου φορτίου, 4) πρόσθετα (τασιενεργά, άλατα κλπ.), 5) το μέγεθος και το σχήμα του συστήματος χορήγησης, 6) την πυκνότητα και το πορώδες του συστήματος 7) τη μάζα του ενθυλακωμένου φαρμάκου 8) τον λόγο επιφάνειας προς όγκο, μια σημαντική παράμετρος που διευκολύνει την επαφή με το νερό. 9) τη θερμοκρασία, καθώς η κινητικότητα των πολυμερικών αλυσίδων αυξάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, 10) το pH του μέσου διάλυσης. Ως αποτέλεσμα, οι ρυθμοί απελευθέρωσης του φαρμάκου *in vitro*

και *in vivo* είναι διαφορετικοί, ενώ ο τελευταίος είναι πιο πιθανό να παρουσιάσει ταχύτερους ρυθμούς [19].

1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα ως μέσα διαλυτοποίησης δισκίων

Τα διαλύματα, τα οποία έχουν την ιδιότητα να διατηρούν πρακτικά αμετάβλητο το pH τους, όταν μια μικρή ποσότητα οξέων ή βάσεων προστίθεται σε αυτά, ονομάζονται ρυθμιστικά διαλύματα. Τα διαλύματα αυτά συνήθως περιέχουν ένα ασθενές οξύ και τη συζυγή του βάση (HA / A^-) ή μια ασθενή βάση και το συζυγές της οξύ (B / BH^+) και δημιουργούνται με μερική εξουδετέρωση ασθενούς οξέος από ισχυρή βάση ή με ανάμιξη περισσειας ασθενούς βάσης με ισχυρό οξύ. Κάθε ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει ένα συζυγές ζεύγος οξέος/βάσης. Η όξινη μορφή αυτού του ζεύγους εξουδετερώνει τις προστιθέμενες βάσεις, ενώ η βασική μορφή τα προστιθέμενα οξέα. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η προσθήκη επιπλέον διαλυμάτων να οδηγεί σε πολύ μικρή μεταβολή του pH. Αν αναμιχτεί ένα ασθενές οξύ (HA) με τη συζυγή του βάση (A^-), αμφότερα τα συστατικά οξέος και βάσης θα παραμείνουν στο διάλυμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υφίστανται οποιεσδήποτε αντιδράσεις που να μεταβάλλουν σημαντικά τις συγκεντρώσεις τους. Η βάση και το οξύ μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους, $HA + A^- \rightarrow A^- + HA$, αλλά οι συγκεντρώσεις $[HA]$ και $[A^-]$ δεν αλλάζουν. Επιπλέον, τα HA και A^- σπάνια αντιδρούν με το νερό ως ασθενή οξέα ή βάσεις παραμένοντας στο διάλυμα σε υψηλές συγκεντρώσεις, όμως είναι πολύ πιθανό να αντιδράσουν με οποιαδήποτε προστιθέμενη ισχυρή βάση ή ισχυρό οξύ. Εάν μια ισχυρή βάση προστεθεί σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το ασθενές οξύ θα εγκαταλείψει το υδρογόνο του, προκειμένου να μετατραπεί η βάση (OH^-) μέσα σε νερό. Δεδομένου ότι η προστιθέμενη OH^- καταναλώνεται από αυτή την αντίδραση, το pH θα αλλάξει μόνο ελαφρώς. Το αντίστοιχο ισχύει εάν προστεθεί ισχυρό οξύ [43].

1.5 Κινητική Απελευθέρωσης φαρμάκων

Η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης δραστικών ουσιών στοχεύει στην πρόβλεψη τόσο του ρυθμού απελευθέρωσης φαρμάκων όσο και στη συμπεριφορά διάχυσης τους. Οι πληροφορίες αυτές βοηθούν στην κατανόηση των φυσικών και χημικών μηχανισμών που συμμετέχουν στη μεταφορά δραστικών ουσιών, συσχετίζουν διάφορες παραμέτρους του φαρμάκου όπως σχήμα, μέγεθος και σύνθεση με τον ρυθμό αποδέσμευσης και έτσι βοηθούν στη βελτιστοποίηση της κινητικής της απελευθέρωσης. Είναι λοιπόν δυνατόν να βελτιωθεί η συνολική θεραπευτική αποτελεσματικότητα των προϊόντων, καθώς επίσης να υπάρξει σημαντική μείωση του κόστους και του χρόνου παραγωγής τους.

Ένα σύνολο εμπειρικών / ημι-εμπειρικών ή μηχανικών μαθηματικών μοντέλων έχουν προταθεί για να εξηγήσουν και να προβλέψουν την απελευθέρωση δραστικών ουσιών από πολυμερικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Τα εμπειρικά μοντέλα επικεντρώνονται στην περιγραφή των δεδομένων με τον προσδιορισμό ελάχιστων υποθέσεων σχετικά με τα δεδομένα που αναλύονται. Από την άλλη πλευρά, τα μηχανικά μοντέλα καθορίζουν υποθέσεις και προσπαθούν να ενσωματώσουν γνωστά στοιχεία για τα συστήματα που περιβάλλουν τα δεδομένα στο μοντέλο, καθώς περιγράφουν τα διαθέσιμα δεδομένα [7].

Τα μηχανικά μοντέλα βασίζονται στους νόμους του Fick, ο πρώτος εκ των οποίων συνδέει τη ροή διάχυσης (J) με τη συγκέντρωση της ουσίας (Φ), υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει μια σταθερή κατάσταση με κατεύθυνση ροής από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης, που είναι ανάλογη με τη βαθμίδα συγκέντρωσης σύμφωνα με τη παρακάτω σχέση,

$$J = -D \nabla \Phi \quad (1)$$

όπου D είναι ο συντελεστής διάχυσης.

Σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο του Fick, η διάχυση προκαλεί αλλαγή της συγκέντρωσης με τον χρόνο σύμφωνα με τη μερική διαφορική εξίσωση

$$\frac{\partial \Phi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} \quad (2).$$

Οι δομές χορήγησης φαρμάκων συνήθως αντιστοιχούν σε μία από τις δύο κατηγορίες που περιγράφουν τη διάχυση της διαλυμένης ουσίας: Fickian, όταν ο χρόνος διάχυσης του πολυμερούς (t_r) είναι μεγαλύτερος από τον χρόνο διάχυσης της δραστικής ουσίας (t_d) και Non-Fickian λαμβάνει χώρα όταν $t_r \approx t_d$ και δεν μπορεί να μοντελοποιηθεί με τους νόμους διάχυσης του Fick.

Είναι γνωστό ότι ένα υδροδιαλυτό φάρμακο που έχει ενσωματωθεί σε πολυμερές απελευθερώνεται μέσω διάχυσης, ενώ ο κύριος μηχανισμός απελευθέρωσης για μη υδατοδιαλυτά φάρμακα είναι διάβρωση του πολυμερούς. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, είναι απαραίτητη η μελέτη των σχετικών κινητικών διαγραμμάτων.

Κάποια από τα κύρια μαθηματικά μοντέλα που μπορούν να περιγράψουν μέσω προσαρμογής των δεδομένων (fitting) τα διαγράμματα αποδέσμευσης, είναι τα εξής : 1) Μοντέλο μηδενικής τάξης, 2) Μοντέλο πρώτης τάξης, 3) Μοντέλο Higutsi, 4) Μοντέλο Korsmeyer – Peppas [20] , [21].

1.5.1 Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order kinetics)

Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται για να περιγράψει περιπτώσεις, όπου η δραστική ουσία απελευθερώνεται από συστήματα παροχής αργά και με σταθερό ρυθμό, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του φαρμάκου.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η έγχυση φαρμάκου, η σταδιακή και ελεγχόμενη απελευθέρωση από συστήματα χορήγησης, όπως στην περίπτωση ορισμένων διαδερμικών συστημάτων, καθώς επίσης και πολυμερικές μήτρες που περιέχουν φάρμακα χαμηλής διαλυτότητας. Ο τύπος που περιγράφει ένα τέτοιο μοντέλο είναι

$$\frac{Q_t}{Q_0} = K_0 t \quad (3)$$

όπου

Q_t : είναι η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύθηκε σε χρόνο t

Q_0 : είναι η ολική διαλυμένη ποσότητα του φαρμάκου

K_0 : είναι η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης

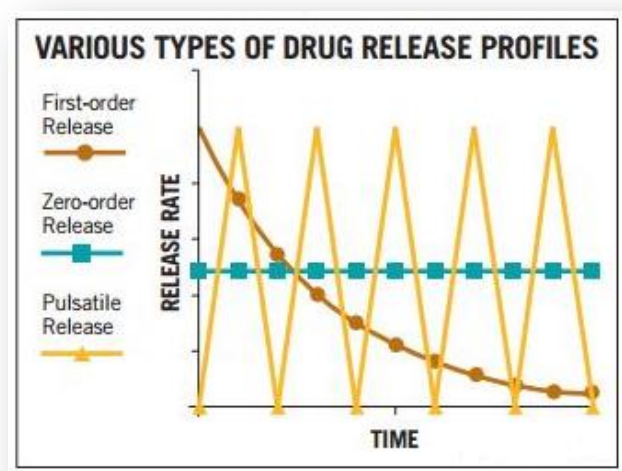
Για τη μελέτη της κινητικής απελευθέρωσης του φαρμάκου, τα δεδομένα που λαμβάνονται από *in vitro* μελέτες, απεικονίζονται ως η αθροιστική ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώνεται συναρτήσει του χρόνου.

1.5.2 Μοντέλο πρώτης τάξης (First order kinetics)

Το προφίλ αποδέσμευσης, που ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης περιγράφει την απελευθέρωση του φαρμάκου από συστήματα παροχής όπως είναι οι πορώδεις μήτρες που περιέχουν υδατοδιαλυτά φάρμακα, και μπορεί να περιγραφεί από τη συνάρτηση:

$$\frac{Q_t}{Q_0} = e^{-Kt} \quad (4)$$

όπου K η σταθερά ρυθμού απελευθέρωσης πρώτης τάξης. Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας.



Εικόνα 8 : Διαφορετικοί τύποι απελευθέρωσης φαρμάκων [15].

1.5.3 Μοντέλο Higuchi

Το μοντέλο αυτό περιγράφει την αποδέσμευση του φαρμάκου, με βάση τον νόμο του Fick, ως μια διαδικασία διάχυσης που εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα του χρόνου. Περιγράφει ιδανικά την απελευθέρωση του φαρμάκου από διάφορους τύπους συστημάτων μεταφοράς, όπως στην περίπτωση ορισμένων διαδερμικών συστημάτων ή συστημάτων μήτρας με υδατοδιαλυτά φάρμακα [7]. Η απλοποιημένη μορφή του μοντέλου δίνεται από την παρακάτω σχέση, όπου K_H είναι ο συντελεστής Higuchi.

$$Q_t = K_H \sqrt{t} \quad (5)$$

Η πρώτη ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου με στόχο να περιγράψει την απελευθέρωση υδροδιαλυτών και ημι- υδροδιαλυτών φαρμάκων από συστήματα μήτρας προτάθηκε από τον Higuchi το 1961. Μια πρώτη προσέγγιση αφορούσε επίπεδα συστήματα, αλλά στην συνέχεια επεκτάθηκε σε διάφορα γεωμετρικά σχήματα [7]. Μερικές προϋποθέσεις για να ισχύει το μοντέλο είναι: η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου στη μήτρα να είναι χαμηλότερη από ότι η διαλυτότητα του, τα σωματίδια του φαρμάκου να είναι πολύ μικρότερα από ότι το πάχος του συστήματος, η διόγκωση και αποδόμηση της μήτρας να είναι αμελητέα και η ικανότητα διάχυσης του φαρμάκου να παραμένει σταθερή με τον χρόνο.

1.5.4 Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Το 1983 ο Korsmeyer πρότεινε ένα ημι- εμπειρικό μοντέλο, το οποίο περιγράφει την απελευθέρωση φαρμάκου από ένα πολυμερικό σύστημα παροχής, συσχετίζοντας την απελευθέρωση φαρμάκου και τον χρόνο μέσω εκθετικής συνάρτησης. Η σχέση που περιγράφει το μοντέλο είναι

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \alpha t^n \quad (6)$$

όπου n είναι η σταθερά που σχετίζεται με τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος δοσολογίας, και n είναι ο εκθέτης της απελευθέρωσης, που καθορίζει το μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου [7]. Για να προσδιοριστεί ο εκθέτης χρειάζονται δεδομένα όπου $\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6$ σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Εκθέτης Απελευθέρωσης (n)	Μηχανισμός απελευθέρωσης δραστικής ουσίας	Ιδιότητες μηχανισμού απελευθέρωσης
≤ 0.5	<u>Fickian</u> Release	<ul style="list-style-type: none"> • Απελευθέρωση με διάχυση
$0.5 < n < 1.0$	<u>Anomalous</u> Release	<ul style="list-style-type: none"> • Διάχυση ανάλογη του χρόνου • Διόγκωση Υλικού • Πρώτης τάξης , Non <u>Fickian</u>
$= 1.0$	Case II Transport	<ul style="list-style-type: none"> • Απελευθέρωση μηδενικής τάξης
> 1.0	Super Case II Transport	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Relaxational</u> απελευθέρωση

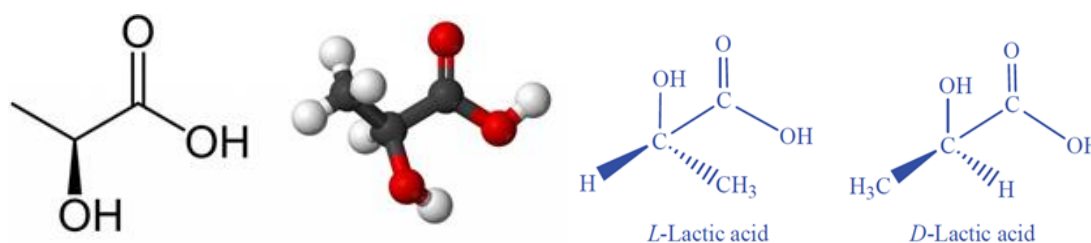
Πίνακας 3 : Εκθέτες απελευθέρωσης στο μοντέλο Korsmeyer – Peppas [7].

1.6 Πολυγαλακτικό Οξύ: Ιδιότητες, σύνθεση και χαρακτηριστικά

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι σήμερα ένα από τα πιο ελπιδοφόρα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, παρουσιάζει υψηλό δυναμικό ανάπτυξης και έχει αποτελέσει κύριο αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Το PLA μπορεί να επεξεργαστεί με μεγάλο αριθμό τεχνικών και έχει αρκετές αξιοσημείωτες ιδιότητες, που το καθιστούν κατάλληλο για πολλές διαφορετικές εφαρμογές [24] .

Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ, κατά IUPAC 2-υδροξυ-προπανικό οξύ, είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$. Ανήκει στη κατηγορία των καρβοξυλικών οξέων και πιο συγκεκριμένα είναι α -υδροξυοξύ (AHA, A-HydroxyAcid), δηλαδή διαθέτει μια υδροξυλομάδα (OH) ενωμένη σε άτομο άνθρακα που βρίσκεται δίπλα στην καρβοξυλομάδα του (COOH). Το καθαρό, άνυδρο γαλακτικό οξύ είναι στερεό, λευκό, άοσμο υδατοδιαλυτό και κρυσταλλικό. Λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητάς του, στο εμπόριο διατίθεται ως διάλυμα σε νερό με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 22-90%. Μπορεί να παραχθεί τόσο φυσικά όσο και τεχνητά. Το 2-υδροξυ-προπανικό οξύ είναι χειρόμορφο και έχει δυο οπτικά ισομερή, το ένα είναι γνωστό ως L-Lactic acid ή S-2-υδροξυπροπανικό οξύ και ο κατοπτρικός αντίποδάς του είναι γνωστός ως D- Lactic acid ή R-2-υδροξυπροπανικό οξύ. Ο πολυμερισμός μίγματος L- και D-λακτιδίων συνήθως οδηγεί στη σύνθεση πολυ- DL-λακτιδίου (PDLLA), όπου η αναλογία μεταξύ L- και D- εναντιομερών μορφών ρυθμίζεται από τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου.



Εικόνα 9 : Γαλακτικό οξύ και ισομερή [24].

Πολύ- γαλακτικό οξύ (PLA)

Το πολυ (γαλακτικό οξύ) (PLA) είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας, τα προϊόντα του οποίου έχουν εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για άμεση επαφή με βιολογικά υγρά από τη δεκαετία του '70. Μερικά από τα ελκυστικότερα πλεονεκτήματα της ευρείας χρήσης του είναι η δυνατότητα επαναλαμβανόμενης χρήσης του ίδιου υλικού (renewability) , η βιοσυμβατότητα, η δυνατότητα επεξεργασίας και η εξοικονόμηση ενέργειας. Το PLA

προέρχεται από ανανεώσιμους και αποικοδομήσιμους πόρους και τα προϊόντα αποικοδόμησής του, το H₂O και το CO₂, δεν είναι τοξικά ή καρκινογόνα για το ανθρώπινο σώμα, καθιστώντας το έτσι ένα εξαιρετικό υλικό για εφαρμογές βιοϊατρικής συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων. Αντί της καύσης, θερμοπλαστικά όπως το πολυγαλακτικό οξύ υγροποιούνται, γεγονός που τους επιτρέπει να χυτεύονται εύκολα και στη συνέχεια να ανακυκλώνονται [23].

Σύνθεση PLA

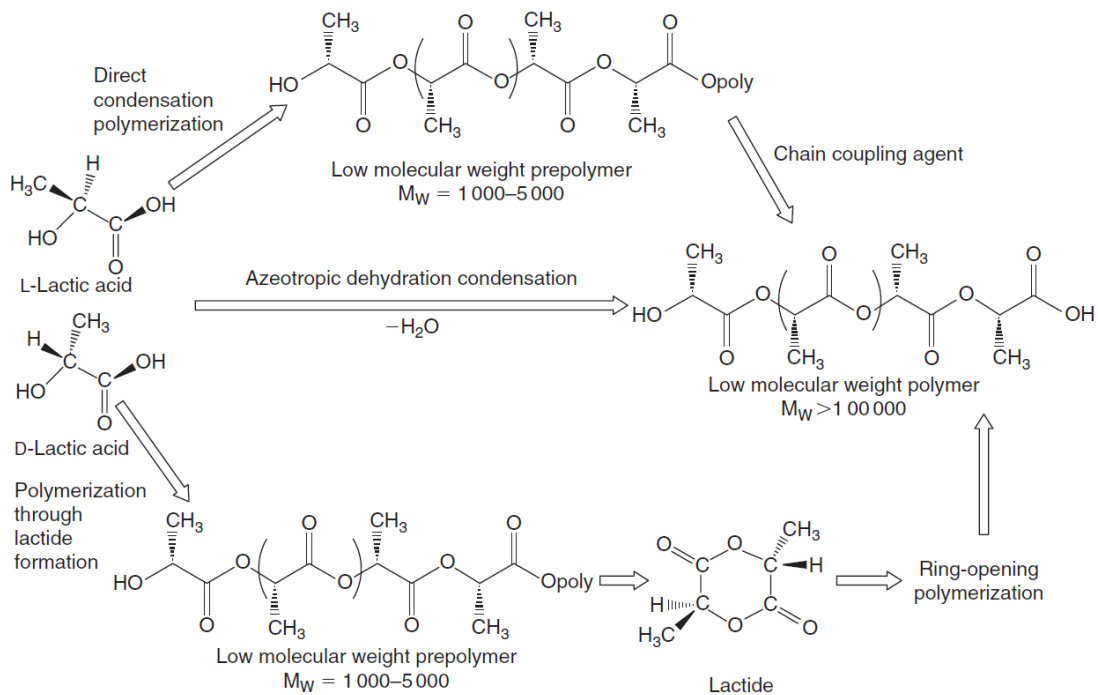
Η σύνθεση του PLA είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που ξεκινά από την παραγωγή γαλακτικού οξέος και τελειώνει με πολυμερισμό, με ένα ενδιάμεσο βήμα που είναι συχνά ο σχηματισμός λακτιδίου. Η σύνθεση του PLA μπορεί να γίνει μέσω τριών διαφορετικών διεργασιών.

Την πολυσυμπύκνωση του γαλακτικού οξέος, η οποία δίνει ένα εύθραυστο πολυμερές, χαμηλού μοριακού βάρους που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο εάν προστεθούν εξωτερικοί παράγοντες σύζευξης ώστε να αυξήσουν το μήκος της αλυσίδας. Στην περίπτωση πολυσυμπύκνωσης διαλύματος, προστίθεται ένας οργανικός διαλύτης ικανός να διαλύσει το PLA χωρίς παρεμβολή στην αντίδραση. Το μίγμα θερμαίνεται έως τους 180°C υπό κάθετο ψυκτήρα με παράλληλη απομάκρυνση του νερού που παράγεται στη διαδικασία πολυσυμπύκνωσης. Σε αντίθεση με τη πολυσυμπύκνωση του διαλύματος, η πολυσυμπύκνωση τήγματος μονομερών μπορεί να προχωρήσει χωρίς οποιοδήποτε οργανικό διαλύτη, αλλά μόνο εάν η θερμοκρασία της αντίδρασης παραμένει πάνω από το σημείο τήξης του πολυμερούς.

Δεύτερος τρόπος σύνθεσης του PLA είναι η αζεοτροπική αφυδάτωση γαλακτικού οξέος, μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για να ληφθούν μεγάλα μήκη αλυσίδας χωρίς τη χρήση παραγόντων επέκτασης αλυσίδας ή πρόσθετων ουσιών. Το γαλακτικό οξύ και ένας καταλύτης αφυδατώνονται σε έναν απρωτικό διαλύτη υπό μειωμένη πίεση. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία περιλαμβάνει την απόσταση -υπό μειωμένη πίεση- του γαλακτικού οξέος ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο

μέρος της υγρασίας και στη συνέχεια προστίθεται ο καταλύτης και ο διφαινυλαιθέρας. Στο δοχείο αντιδράσεως προσαρτάται ένας σωλήνας με μοριακά κόσκια, μέσα από τον οποίο επιστρέφεται ο διαλύτης κατά τη διάρκεια 30-40 ωρών στους 130 ° C. Αυτός ο πολυμερισμός δίνει σημαντικά υπολείμματα καταλύτη λόγω της υψηλής συγκέντρωσης που απαιτείται για την επίτευξη ενός επαρκούς ρυθμού αντίδρασης. Για τις περισσότερες βιοϊατρικές εφαρμογές, η τοξικότητα του καταλύτη είναι ένα πολύ ευαίσθητο ζήτημα, ωστόσο οι υπολειμματικές περιεκτικότητες του μπορούν να μειωθούν με την προσθήκη φωσφορικού οξέος [22] , [24].

Η τρίτη και πιο κοινή τεχνική πολυμερισμού είναι γνωστή ως πολυμερισμός ανοίγματος δακτυλίων (Ring Opening Polymerization, ROP), μια σημαντική και αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή PLA υψηλού μοριακού βάρους. Το ROP του λακτιδίου επιδείχθηκε για πρώτη φορά από τον Carothers το 1932, αλλά τα υψηλά μοριακά βάρη δεν ελήφθησαν μέχρι να αναπτυχθούν βελτιωμένες τεχνικές καθαρισμού λακτιδίου από τον DuPont το 1954. Αυτή η αντίδραση απαιτεί αυστηρή καθαρότητα του μονομερούς λακτιδίου, που λαμβάνεται με διμερισμό του μονομερούς γαλακτικού οξέος. Το PLA λαμβάνεται με τη χρήση καταλύτη με το μονομερές υπό κενό ή αδρανή ατμόσφαιρα. Με τον έλεγχο του χρόνου αλληλεπίδρασης και των θερμοκρασιών σε συνδυασμό με τον τύπο καταλύτη και τη συγκέντρωση, είναι δυνατόν να ελεγχθεί η αναλογία και η αλληλουχία των μονάδων D- και L-γαλακτικού οξέος (LA) στο τελικό πολυμερές. Είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιεί μεταλλικούς καταλύτες για τη δημιουργία των μεγαλύτερων μορίων PLA.



Εικόνα 10 : Διεργασίες σύνθεσης πολυγαλακτικού οξέος [24] .

Χαρακτηριστικά του πολυγαλακτικού οξέος: Κρυσταλλικότητα, θερμικές ιδιότητες, επιφανειακή ενέργεια και μηχανικές ιδιότητες

Οι ιδιότητες του PLA εξαρτώνται από τα μοριακά χαρακτηριστικά του, καθώς και από την παρουσία διαταγμένων δομών, όπως το κρυσταλλικό πάχος, η κρυσταλλικότητα, το μέγεθος σφαιριδίων, η μορφολογία και ο βαθμός προσανατολισμού της αλυσίδας. Οι φυσικές ιδιότητες του πολυλακτιδίου σχετίζονται με την εναντιομερική καθαρότητα των στερεο-συμπολυμερών γαλακτικού οξέος.

Το PLA μπορεί να παραχθεί σε μια τελείως άμορφη ή έως και 40% κρυσταλλική δομή. Για να προσδιοριστούν τα επίπεδα κρυσταλλικότητας με θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC), η τιμή που αναφέρεται συχνότερα στη βιβλιογραφία σχετικά με την ενθαλπία τήγματος PLA με 100% κρυσταλλικότητα, είναι 93 Jg⁻¹. Η κρυσταλλοποίηση του άμορφου PLA, μπορεί να ξεκινήσει σε θερμοκρασίες μεταξύ 75 ° C και του σημείου τήξεως.

Η τυπική θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του PLA (T_g) κυμαίνεται από 50 °C έως 80 °C, ενώ η θερμοκρασία τήξης (T_m) κυμαίνεται από 130 °C έως 180 °C. Για το ημι-κρυσταλλικό PLA, το T_m είναι συνάρτηση των διαφορετικών παραμέτρων επεξεργασίας και της αρχικής δομής PLA και μειώνεται με την παρουσία μεσο-λακτιδικών μονάδων στη δομή του. Τόσο ο βαθμός κρυσταλλικότητας όσο και η θερμοκρασία τήξης των υλικών με βάση το PLA μπορούν να μειωθούν με τυχαίο συμπολυμερισμό με διαφορετικά μονομερή.

Η επιφανειακή ενέργεια είναι σημαντική σε διεργασίες όπως η εκτύπωση και επηρεάζει τη διεπιφανειακή τάση. Η επιφανειακή ενέργεια PLA που αποτελείται από 92% L-λακτίδιο και 8% μεσον-λακτίδιο βρέθηκε να είναι $49 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$, γεγονός που υποδηλώνει μια σχετικά υδρόφοβη δομή σε σύγκριση με αυτή άλλων βιοπολυεστέρων.

Οι μηχανικές ιδιότητες του PLA μπορούν να ποικίλουν, κυμαινόμενες από μαλακά και ελαστικά υλικά μέχρι άκαμπτα και υψηλής αντοχής υλικά, ανάλογα με παραμέτρους όπως κρυσταλλικότητα, δομή πολυμερούς και μοριακό βάρος, και επεξεργασία (π.χ. προσανατολισμός). Οι μηχανικές ιδιότητες μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν ώστε να ικανοποιήσουν διαφορετικές εφαρμογές. Η μηχανική συμπεριφορά μπορεί επίσης να τροποποιηθεί με την παρασκευή κατάλληλων συμπολυμερών [24].

Συστήματα παράδοσης με βάση το PLA

Όλο και περισσότερες μελέτες έρχονται στο φως της δημοσιότητας, που αφορούν τη στοχευόμενη παροχή βιοδραστικών ενώσεων σε περιοχές του σώματος, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί το θεραπευτικό δυναμικό και να ελαχιστοποιηθούν οι παρενέργειες. Πολλοί τύποι σωματιδίων έχουν δοκιμαστεί ως εργαλεία διανομής για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως λιποσώματα, στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια και βιοαποδομήσιμοι πολυεστέρες όπως PLA και PLGA. Με την εξαιρετική βιοσυμβατότητα, τη βιοαποικοδομησιμότητα, τη μηχανική αντοχή, τη θερμική κατεργασία και τη διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες, το PLA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παράγει δομές προς χορήγηση, όπως σφαιρίδια, μικροκάψουλες, μικροσωματίδια, νανοσωματίδια, τροποποιημένα ή μη. Τέτοιου

είδους δομές διερευνούνται όλο και περισσότερο με στόχο εφαρμογές παρατεταμένης απελευθέρωσης και στοχευόμενης χορήγησης φαρμάκων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και RNA ή DNA.

Όσον αφορά την απελευθέρωση φαρμάκου από MPs ή NPs, ο ρυθμός ελέγχεται τόσο με τη διάχυση του φαρμάκου όσο και με την αποικοδόμηση του πολυμερούς. Για να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα της χορήγησης φαρμάκου, ο έλεγχος του μεγέθους των σωματιδίων και της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων είναι κρίσιμος, καθώς τα μικρότερα σωματίδια και οι μικρότερες κατανομές μεγέθους διευκολύνουν τον σχεδιασμό στοχευμένων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων [24].

1.7 Methyl orange

Η υδρόφιλη ουσία που χρησιμοποιήθηκε αντί φαρμάκου, ανήκει στις αζωενώσεις, είναι ευδιάλυτη στο νερό και έχει μοριακό τύπο $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ και % w/w σύσταση C 51,37%, H 4,31%, N 12,84%, Na 7,02%, O 14,66%, S 9,80%. Χρησιμοποιείται κυρίως ως δείκτης σε ογκομετρήσεις ασθενών βάσεων από ισχυρά οξέα, καθώς παρουσιάζει μεταβολή χρώματος από το ερυθρό προς το κίτρινο καθώς αυξάνεται η αλκαλικότητα του διαλύματος.

1.8 Μέθοδοι ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε πολυμερικά μικρο-νάνο σφαιρίδια

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι για την ενθυλάκωση θεραπευτικών ουσιών σε πολυμερικά μικρο- και νάνο- σωματίδια, η επιλογή των οποίων εξαρτάται από τις ιδιότητες του πολυμερούς και του φαρμάκου καθώς και από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Οι επαγωγικές μέθοδοι ('bottom – up') περιλαμβάνουν τη δημιουργία μικρο-νανο φορέων, μέσω διεπιφανειακών πολυμερισμών και πολυμερισμών καθίζησης. Σύμφωνα με τις μεθόδους πολυμερισμού, χρησιμοποιείται ένα μονομερές ως εκκινητής. Παρά το γεγονός ότι δημιουργούνται φορείς με ακριβές μέγεθος και σχήμα, τέτοιου είδους τεχνικές

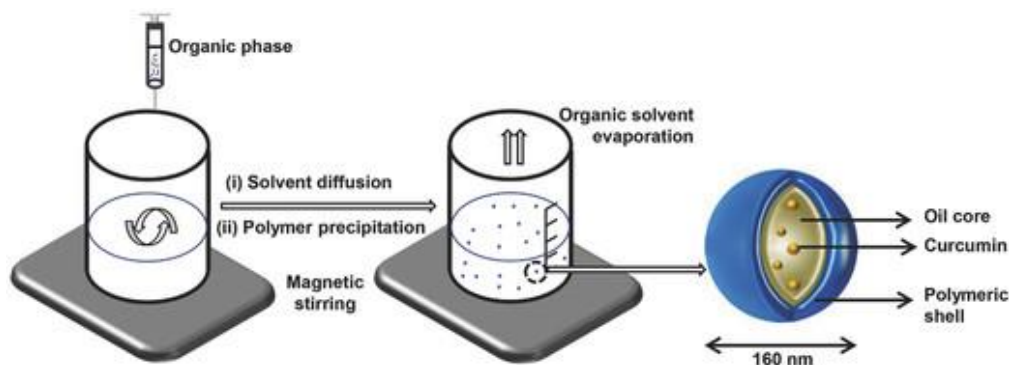
περιορίζονται καθώς δεν είναι όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται βιοαποικοδομήσιμα, έτσι υπολείμματα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι πιθανό να παραμείνουν στις δομές. Η λύση στο πρόβλημα είναι η χρήση ήδη συντεθειμένων και επαρκώς χαρακτηρισμένων πολυμερών, με πρόσθετες λειτουργίες. Αυτή η τεχνική ανήκει στη κατηγορία των απαγωγικών μεθόδων ('top - down') και περιλαμβάνει μεθόδους παρασκευής φορέων μέσω της αυτο-οργάνωσης (self-assembling) μπλοκ συμπολυμερών, η οποία μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της νανοκαταβύθισης, της γαλακτωματοποίησης και της εξάτμισης. Τεχνικές όπως η Prolease, τεχνικές ηλεκτροψεκασμού και τεχνικές με βάση μικρορευστοειδή συστήματα αναλύονται παρακάτω, ωστόσο τρεις από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους παρασκευής μεγάλης ποικιλίας μικρο- και νάνο-σωματιδιακών φορέων είναι η νανοκαταβύθιση, η γαλακτωματοποίηση ελαίου σε νερό (Oil / Water) δηλαδή η δημιουργία απλού γαλακτώματος, και η γαλακτωματοποίηση νερού-σε έλαιο-σε νερό (Water / Oil / Water) δηλαδή η δημιουργία διπλού γαλακτώματος [25].

Τεχνική ProLease

Η ανάγκη διατήρησης της ακεραιότητας των βιολογικών φαρμάκων, όπως των πρωτεϊνών, οδήγησε στην ανάπτυξη αυτής της τεχνικής, η οποία αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης rhGH. Στόχος ήταν η δημιουργία πολυμερικών μικροσφαιρών αργής απελευθέρωσης. Σύμφωνα με την τεχνική ProLease παράγονται μικροσφαίρες σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, όπου και ενσωματώνονται βιοδραστικά πολυμερή, τα οποία με τη σειρά τους διευκολύνουν την αναστολή της βιολογικής δραστηριότητας. Το πολυμερές και το ωφέλιμο φορτίο ψεκάζονται σε ένα δοχείο, όπου ψυχρό υγροποιημένο αέριο αναγκάζει τα σταγονίδια του πολυμερούς να καταψυχθούν αμέσως, με παράλληλη εξαγωγή του διαλύτη.

Νανοκαταβύθιση / Απομάκρυνση διαλύτη

Η νανοκαταβύθιση είναι μια απλή τεχνική δημιουργίας σφαιριδίων μικρού μεγέθους (<100 nm), που απαιτεί ήπια ανάδευση κάτω από ελάχιστη πίεση. Συγκεκριμένα, το πολυμερές και το φαρμακευτικό προϊόν διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη ο οποίος έχει αναμιχθεί με νερό. Το διάλυμα στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην σε ένα υδατικό διάλυμα υπό ανάδευση. Χρησιμοποιώντας τις εγγενείς ιδιότητες διαλυτότητας και πηκτωματοποίησης των πολυμερών, μπορούν να δημιουργηθούν αυθόρμητα μικρο- και νανο- σωματίδια. Στη συνέχεια, η προσθήκη ενός διαλύματος πολυμερών και φαρμάκων σε μια φάση μη διαλυτή, οδηγεί σε διαχωρισμό φάσεων και επομένως σε νανοκαταβύθιση ή συσσωμάτωση των πολυμερών σε σωματίδια. Η καταβύθιση του υδρόφοβου πολυμερούς οδηγεί στιγμιαία στην αυτο-οργάνωση σφαιρών πυρήνα-κελύφους, οι οποίες είναι οι πλέον ενεργειακά σταθερές δομές. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το φάρμακο παγιδεύεται μέσα στον πολυμερικό πυρήνα. Τέλος, ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται είτε με τη βοήθεια μειωμένης πίεσης είτε με περαιτέρω ανάδευση του διαλύματος στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι σχετικά πτητικός [25].

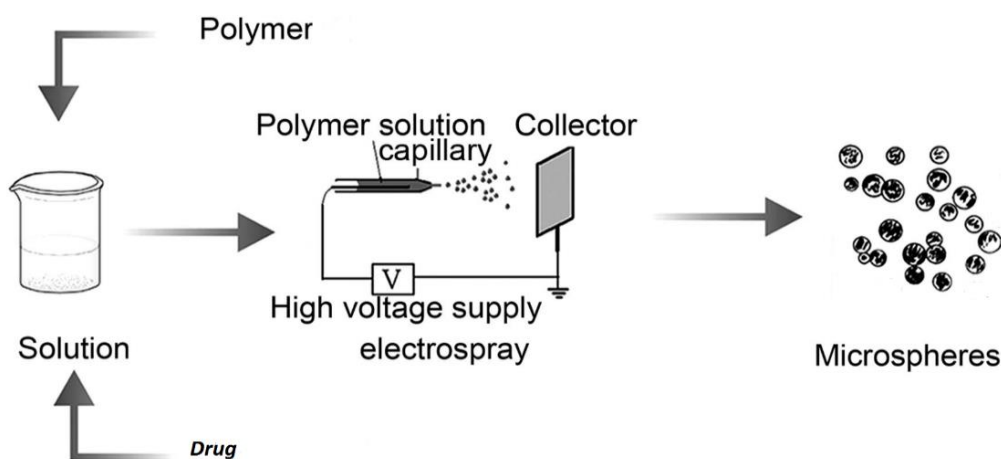


Εικόνα 11: Σχηματική περιγραφή της νανοκαταβύθισης ως τεχνική δημιουργίας σφαιριδίων μικρού μεγέθους [25].

Ένας περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι η ανεπαρκής παγίδευση των υδρόφιλων φαρμάκων που μπορούν να παραμείνουν στην υδατική φάση. Παρατηρούνται χαμηλότερες αποδόσεις της παγίδευσης σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται στη δημιουργία γαλακτωμάτων.

Τεχνικές ηλεκτροψεκασμού (Electrospraying Methods)

Οι μέθοδοι ηλεκτροψεκασμού αναφέρονται σε τεχνικές που χρησιμοποιούν ηλεκτροστατικές δυνάμεις ως κινητήρια δύναμη, για την κατασκευή νάνο- ή μικροσωματιδίων και ινών, στις οποίες περιέχονται δραστικές ουσίες. Η αρχή της τεχνικής αυτής βασίζεται στη δημιουργία ενός φορτισμένου πίδακα υγρού μέσω υψηλής διαφοράς δυναμικού, ο οποίος μπορεί -υπό συνθήκες- να σπάσει σε μικρά σταγονίδια με καθορισμένα μεγέθη και σχήματα. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιείται ένα διάλυμα πολυμερούς και φαρμάκου διαλυμένο σε έναν αγώγιμο διαλύτη ενώ παράλληλα ρυθμίζονται οι παράμετροι της συγκέντρωσης, του ρυθμού ροής και της εφαρμοζόμενης τάσης. Οι ρυθμοί απελευθέρωσης του φαρμάκου μπορούν να ελεγχθούν μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις πολυμερούς, την ταχύτητα ροής, το μέγεθος σωματιδίων και το πάχος του κελύφους, προς μια κατεύθυνση δημιουργίας προφίλ απελευθέρωσης μηδενικής τάξης. Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου περιλαμβάνονται οι υψηλές αποδόσεις φορτίου, οι στενές κατανομές μεγέθους σωματιδίων, καθώς και η εύκολη σύνθεση των σωματιδίων λόγω της επεξεργασίας που περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο [25], [26].



Εικόνα 12 : Σχηματική περιγραφή ηλεκτροϋδροδυναμικών τεχνικών για δημιουργία σφαιριδίων μικρού μεγέθους [25].

Μικρορρευστοειδή συστήματα

Τα μικρορρευστοειδή συστήματα με βάση τα σταγονίδια είναι μια δημοφιλής μέθοδος σύνθεσης φαρμακευτικών φορέων που μπορεί να παράγει ομοιογενή σωματίδια φορτισμένα με φάρμακο, μικροκάψουλες, μικροφουσαλίδες και μικροπήγματα. Η διατμητική τάση σε συνδυασμό με τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ μη αναμίξιμων ρευστών επιτρέπει την παραγωγή σταγονιδίων, το μέγεθος των οποίων μπορεί να ελεγχθεί ρυθμίζοντας τις ταχύτητες ροής, το ιξώδες διαλύματος και την επιφανειακή τάση. Σε σύγκριση με τις μεθόδους αυτοσυναρμολόγησης, τα σωματίδια που παράγονται είναι τυπικά μεγαλύτερα (δηλαδή μικρο-κλίμακα). Τέτοιοι φορείς είναι ικανοί να παρέχουν υψηλή φόρτωση ή ενθυλάκωση φαρμάκου και να διατηρούν την παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου για σχετικά μεγάλες περιόδους. Η ρύθμιση του προφίλ απελευθέρωσης του φαρμάκου μπορεί επίσης να επιτευχθεί προσαρμόζοντας την εσωτερική δομή τέτοιων σταγονιδίων (π.χ. διπλά ή πολλαπλά γαλακτώματα) που επιτρέπουν την ταυτόχρονη χορήγηση πολλαπλών φαρμάκων [26].

1.8.1 Μέθοδος του διπλού γαλακτώματος

Ο όρος γαλακτώμα περιγράφει ένα σύστημα δύο μη αναμίξιμων ουσιών όπου η μία φάση (εσωτερική), είναι διασπαρμένη με τη μορφή σταγόνων μέσα στην άλλη φάση (συνεχής ή εξωτερική). Τα γαλακτώματα ανάλογα με τις διαστάσεις των διεσπαρμένων σταγονιδίων χωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες, καθώς επίσης ανάλογα με τη σύσταση της κάθε φάσης διακρίνονται σε Oil in Water: λάδι σε νερό O/W , σε Water in Oil: νερό σε λάδι W/O ή σε διπλά γαλακτώματα Water in Oil ,in Water W/O/W ή Oil in Water in Oil O/W/O. Σε τέτοιου είδους τεχνικές είναι βασικός ο ρόλος του γαλακτωματοποιητή, ο οποίος προσδένεται στην επιφάνεια των σχηματισμένων σφαιρών, αποτρέποντας την επανασύνδεση τους .

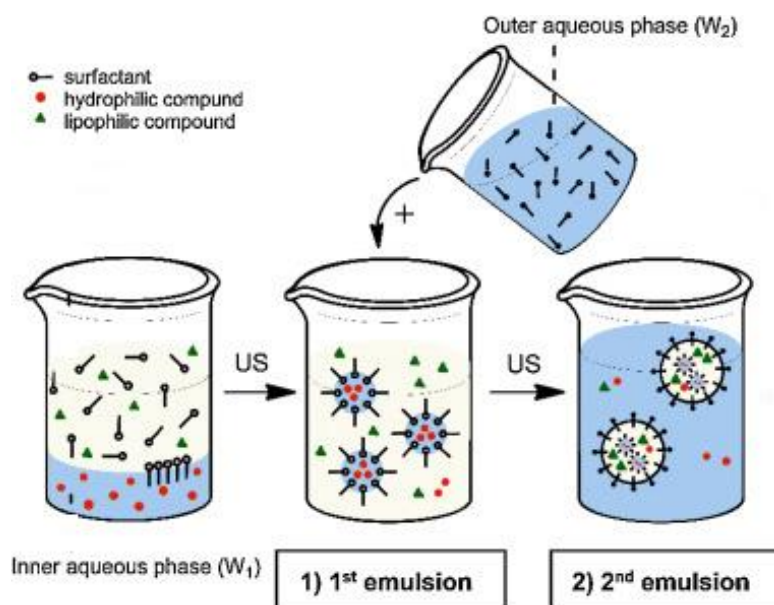
Η τεχνική γαλακτωματοποίησης O/W είναι κατάλληλη για παγίδευση υδρόφοβων φαρμάκων και έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη

αποτελεσματικότητα φόρτωσης φαρμάκου και ενθυλάκωσης σε σύγκριση με τη νανοκαταβύθιση, καθώς επίσης είναι δυνατή η πλήρης αφαίρεση του διαλύτη. Στη τεχνική των απλών γαλακτωμάτων απαιτείται το φάρμακο να είναι διαλυτό σε ένα, μη αναμίξιμο με το νερό οργανικό διαλύτη, όπως το διχλωρομεθάνιο ή ο οξικός αιθυλεστέρας, και η οργανική φάση γαλακτωματοποιείται υπό έντονη διατμητική τάση σε υδατική φάση, που περιέχει κατάλληλες ποσότητες μιας επιφανειοδραστικής ουσίας. Ο οργανικός διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί επιτρέποντας την αυτο-οργάνωση των μικρο- και νάνο- σωματιδίων. Ωστόσο, απαιτείται μια πρόσθετη εισροή ενέργειας, όπως η παραμονή σε υπερήχους ή ομογενοποίηση.

Βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένου του τομέα των τροφίμων και των καλλυντικών, δείχνουν ενδιαφέρον για την τεχνολογική ανάπτυξη τέτοιων σύνθετων συστημάτων, ενώ ο τομέας των φαρμακευτικών προϊόντων είναι ο κύριος τομέας εφαρμογής τους, καθώς τα διπλά γαλακτώματα W/O/W έχουν ερευνηθεί κυρίως ως μέσα μεταφοράς για διάφορα υδρόφιλα φάρμακα (εμβόλια, βιταμίνες, ένζυμα, ορμόνες). Οι εσώκλειστες δραστικές ουσίες μπορούν να μεταναστεύσουν από την εξωτερική στην εσωτερική φάση των γαλακτωμάτων πολλαπλού τύπου, με ελεγχόμενη απελευθέρωση [27].

Τα διπλά γαλακτώματα παρασκευάζονται με δύο γαλακτωματοποιητές αντίθετης διαλυτότητας (υδατοδιαλυτούς και ελαιοδιαλυτούς) και παρουσιάζουν πολλές ενδιαφέρουσες δυνατότητες για την ελεγχόμενη απελευθέρωση χημικών ουσιών που είναι παγιδευμένες στα εσωτερικά σταγονίδια. Συγκεκριμένα, το διπλό γαλάκτωμα (W/O/W) χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση υδρόφιλων φαρμάκων και πρωτεϊνών. Μπορούν να διακριθούν διαφορετικές φάσεις, οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα λεπτό υμένιο, το γαλακτωματοποιητή. Σε αυτή τη μέθοδο, το φάρμακο διαλύεται σε ένα μικρό όγκο μιας υδατικής φάσης και γαλακτωματοποιείται με ή χωρίς επιφανειοδραστικές ουσίες, σε μια οργανική φάση που περιέχει το πολυμερές. Το γαλάκτωμα W/O που σχηματίζεται στη συνέχεια διασκορπίζεται σε μεγαλύτερο όγκο υδατικής φάσης μαζί με μια επιφανειοδραστική ουσία, για να σχηματιστεί το διπλό γαλάκτωμα W/O/W. Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη δημιουργία σταθερών μικρο- και νάνο-δομών με ενθυλακωμένη δραστική ουσία είναι δύο. Πρώτον να προσδωθεί μεγάλη ποσότητα

ενέργειας ανά μονάδα χρόνου ώστε να διασπαστούν οι μεγάλες σφαίρες του γαλακτώματος σε μικρότερες και να υπάρξει καλή διασπορά των σφαιριδίων, και δεύτερον να προστεθεί κατάλληλη ποσότητα σταθροποιητή ώστε να δημιουργηθούν σταθερές δομές. Τέλος είναι απαραίτητο, το διάλυμα να υποβληθεί σε εξάτμιση του παραμένοντος οργανικού διαλύτη, αποδίδοντας μικρο-νανοσωματίδια στα οποία βρίσκεται ενθυλακωμένη η δραστική ουσία [28].

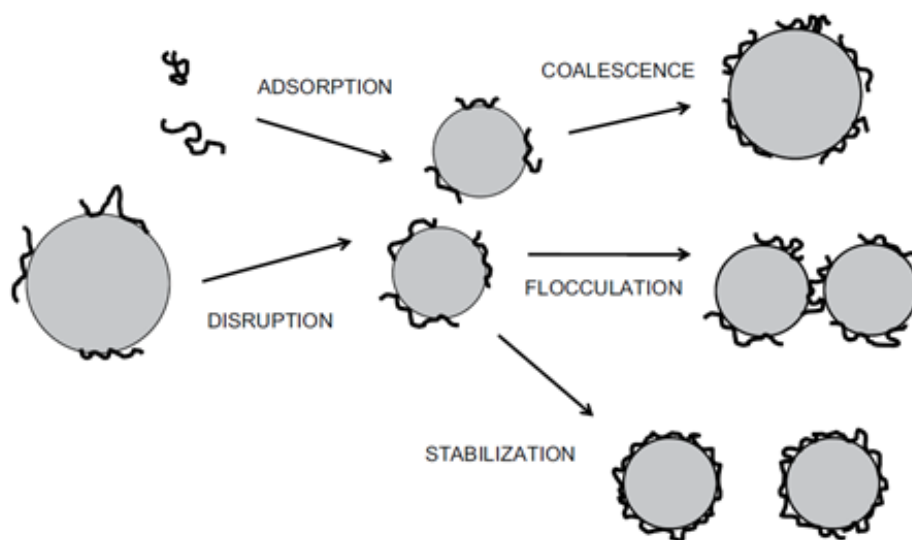


Εικόνα 13 : Σχηματική περιγραφή της τεχνικής ‘διπλού γαλακτώματος’ για τη δημιουργία φαρμακευτικών φορέων [28].

1.8.2 Γαλακτωματοποιητές , Επιφανειοδραστικές Ενώσεις

Γαλακτωματοποιητές είναι ενώσεις που έχουν την ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση των διεπαφών από τις οποίες προσροφώνται και να αναδομούνται, μειώνοντας έτσι την ελεύθερη ενέργεια του Gibbs [30]. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια των γαλακτωματοποιητών διαχέονται από τη φάση που είναι διαλυτοποιημένα σε μια διεπιφάνεια, υπερνικούν το φράγμα απορρόφησης και προσροφώνται, επιτυγχάνοντας έτσι μια θερμοδυναμικά προτιμώμενη δομή .

Αποτελούνται από μια υδρόφιλη κεφαλή από πολικές ομάδες (υδροξύλια, καρβοξύλια, ιοντικές ομάδες) η οποία ενώνεται με μια υδρόφοβη απόλιξη από υδρογονάνθρακες (αλειφατικούς ή αρωματικούς), γεγονός το οποίο τους προσδίδει την ιδιότητα να αναδιατάσσονται στις διεπιφάνειες υδάτινων-οργανικών διαλυμάτων. Για τη δημιουργία O/W γαλακτώματος λαμβάνεται υπόψη ότι για να αυξηθεί η διεπιφάνεια oil – water κατά ΔA χρειάζεται να προσφέρουμε έργο $\Delta G = \gamma \cdot \Delta A$, όπου γ είναι η διεπιφανειακή τάση. Για δεδομένη ροή ενέργειας κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης, η τελική κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων καθορίζεται από τον χρόνο που χρειάζεται η επιφάνεια ώστε να καλυφθεί από τον γαλακτωματοποιητή, συγκρινόμενη με τον χρόνο συνένωσης των σταγόνων (droplet collisions) [29].



Εικόνα 14 : Λειτουργία επιφανειοδραστικών ενώσεων [29].

Το έργο που χρειάζεται να παραχθεί για τη διάσπαση σταγονιδίων σε μικρά σφαιρίδια, των οποίων η επιφάνεια είναι πολύ κυρτή αυξάνεται κατά 1000 φορές, διότι απαιτείται η εφαρμογή μιας δύναμης διάσπασης που θα υπερνικήσει τις δυνάμεις που συγκρατούν τη μεγαλύτερη σφαίρα ενωμένη. Για να διασπαστεί μια σφαίρα ακτίνας α , χρειάζεται μια εξωτερική πίεση $\frac{\Delta P}{\alpha} = \frac{2\gamma}{\alpha^2}$, όπου ΔP είναι η πίεση Laplace.

Τα χαρακτηριστικά που συγκεντρώνει ένας αποτελεσματικός γαλακτωματοποιητής συνοψίζονται ως εξής: 1) Μειώνει γρήγορα την επιφανειακή

τάση στη διεπιφάνεια water – oil , 2) Δεσμεύεται γρήγορα στη διεπιφάνεια, 3) Αποτρέπει την επαναδημιουργία συσσωματωμάτων.

Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή επηρεάζει την αναλογία επιφάνειας προς όγκο των δομών που δημιουργούνται, δηλαδή το μέγεθος τους. Όταν η συγκέντρωση είναι χαμηλή οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις καταστέλλονται και τα αρχικά σταγονίδια συσσωματώνονται έως ότου επικαλυφθούν με ένα πυκνό στρώμα γαλακτωματοποιητή. Αντίθετα, όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή, δημιουργούνται μικκύλια και το μέγεθος των δομών εξαρτάται από το είδος του γαλακτωματοποιητή. Μόλις σχηματιστεί το γαλάκτωμα, ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τη σταθερότητα είναι το εύρος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γειτονικών σταγονιδίων.

Το προστατευτικό φράγμα που δημιουργείται στην επιφάνεια της σταγόνας είναι πιο αποτελεσματικό στην κυρτή πλευρά της διεπαφής ελαίου-νερού, όταν δηλαδή διαβρέχεται από τη συνεχή φάση. Η ελεύθερη ενέργεια της αυθόρμητης εκρόφησης ΔG_d είναι ανάλογη προς $[r(1 - \cos\theta)]^2$, όπου r είναι η ακτίνα των σωματιδίων και θ γωνία επαφής, η οποία καθορίζει τη θέση ενός σωματιδίου σε σχέση με τη διεπαφή. Όσο η γωνία επαφής δεν είναι πολύ κοντά στις 0° ή στις 180° , το ΔG_d είναι πολύ υψηλό σε σύγκριση με τη θερμική ενέργεια (kT), και έτσι η προσρόφηση μπορεί να θεωρηθεί μη αναστρέψιμη, προσδίδοντας έτσι στη δομή μια χαρακτηριστική σταθερότητα [29].

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Πρώτες ύλες - Αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πολυμερικών μικροσφαιριδίων στα οποία θα ενθυλακώνονται δραστικές ουσίες, καθώς και των ρυθμιστικών διαλυμάτων, είναι τα ακόλουθα:

- ❖ Poly Lactic Acid (PLA) 2003D: υψηλού μοριακού βάρους, ειδικό βάρος: 1,24 ,θερμοκρασία τήξης: 210°C, NatureWorks.
- ❖ Methyl orange ($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$): Κατά IUPAC 4-διμεθυλ-αμινο-αζω-βενζενο-4'-σουλφανιλικό νάτριο, molecular weight: 327,33 g/mol, Fisher Scientific .
- ❖ Polyvinyl Alcohol (PVA) [$CH_2CH(OH)$] n: 86-89% hydrolyzed, low molecular weight, density 1,19 - 1,31 g/cm³.
- ❖ Dichloromethane (CH_2Cl_2): 99,99%, Fisher Scientific.
- ❖ Citric Acid Monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) : 99,5% , Sigma Aldrich.
- ❖ Disodium phosphate dehydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) : 99%, Sigma Aldrich.

2.2 Οργανολογία – Πειραματικός εξοπλισμός

2.2.1 Συσκευή υπερήχων

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των σφαιριδίων περιελάμβανε, ένα λουτρό υπερήχων τύπου S30H Elmasonic, το οποίο είχε μέγιστη ισχύ 80 Watt.

Στη συνέχεια, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία σύνθεσης, χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή υπερήχων με ακροφύσιο (probe sonicator). Οι λόγοι για τους οποίους απαιτήθηκε η χρήση του probe sonicator είναι διότι χρειαζόταν να προσδοθεί μεγαλύτερη ενέργεια ανά μονάδα χρόνου, ώστε αφενός να διασπαστούν οι μεγάλες σφαίρες σε μικρότερες οι οποίες σταθεροποιούνται με το PVA, και αφετέρου για να πραγματοποιηθεί καλύτερη διασπορά των σφαιριδίων. Επιπλέον, η χρήση του probe sonicator παρείχε τη δυνατότητα καθορισμού διαφόρων παραμέτρων, οι τιμές των οποίων, υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων Vibra Cell VCX, μέγιστης ισχύος 750 W και

τάσης 230 V. Επιλέχθηκε ένα ακροφύσιο διαμέτρου 19 mm για όλα τα πειράματα, ενώ η ισχύς, η διάρκεια των υπερήχων και των παύσεων και η θερμοκρασία ρυθμιζόταν κατάλληλα από το μενού πλοήγησης [31].



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του Probe Sonicator και φωτογραφία διάταξης εργαστηρίου

2.2.2 Φυγόκεντρος

Χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος HERMLE Labortechnik Z 366 για τον διαχωρισμό των σφαιριδίων από το υπερκείμενο υγρό, καθώς και για τη συλλογή τους έπειτα από την έκπλυση. Η συχνότητα περιστροφής, η επιτάχυνση και η επιβράδυνση περιστροφής καθώς και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα φυγοκέντρησης, ρυθμιζόνταν κατάλληλα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

2.2.3 Συσκευή λυοφιλίωσης

Για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας τόσο από το εσωτερικό των σφαιριδίων όσο και από τις διεπιφάνειες τους, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή λυοφιλίωσης CHRIST ALPHA 1-4 B. Braun Biotech International. Λυοφιλίωση (Lyophilization) είναι η διαδικασία πλήρους ξήρανσης ενός υλικού μέσω απευθείας κεξάχνωσης του περιεχόμενου νερού.

Η αρχή της μεθόδου αυτής, συνίσταται στη μετάβαση μιας ουσίας από τη στερεή στην αέρια φάση απ' ευθείας με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης περιλαμβάνει τρία στάδια :

Την ψύξη, όπου το υλικό ψύχεται σε χαμηλή θερμοκρασία για να υπάρξει μετατροπή του νερού σε πάγο, την πρωτογενή ξήρανση, όπου το υλικό τοποθετείται σε αεροστεγή χώρο με μειωμένη πίεση σε σημείο κάτω από τριπλό σημείο του νερού, ώστε ο κρυσταλλικός πάγος που έχει δημιουργηθεί να απομακρυνθεί με εξάχνωση. Κατά την ολοκλήρωση της πρωτογενούς ξήρανσης, το προϊόν μπορεί ακόμη να περιέχει 15-20% μη παγωμένου νερού. Τέλος ακολουθεί η δευτερογενής ξήρανση, όπου στην φάση αυτή, συνήθως εφαρμόζεται η χαμηλότερη δυνατή πίεση, και το μη παγωμένο νερό εκροφάται .

Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου στη παρούσα εργασία, περιλαμβάνουν τη αναστολή της λειτουργίας των μικροοργανισμών και των ενζύμων, καθώς και τη διευκόλυνση της κονιορτοποίησης του παραγόμενου γαλακτώματος.

2.2.4 Συσκευή δισκιοποίησης (tablet press)

Χρησιμοποιήθηκε ακόμα, μια συσκευή δισκιοποίησης με το οποίο συμπιέστηκε το παραγόμενο υλικό, σε μορφή δισκίων. Το Tablet Press RIVA S.A. MINIPRESS MII 186 παρέχει τη δυνατότητα να συμπιέζει φαρμακευτικά υλικά που είναι σε μορφή σκόνης δημιουργώντας δισκία. Ο σχηματισμός δισκίων λαμβάνει χώρα με τη συνδυασμένη δράση συμπίεσης δύο μεταλλικών ράβδων. Η σκόνη τοποθετείται σε μια κοιλότητα, το βάθος της οποίας προσαρμόζεται με μηχανικό τρόπο. Κατά τη διάρκεια της φάσης συμπίεσης, οι ράβδοι που είναι στη κορυφή

κινούνται προς τη ράβδο που είναι στο κάτω μέρος. Η τελική απόσταση μεταξύ των δύο ράβδων καθορίζει το πάχος και τη σκληρότητα των παραγόμενων δισκίων ενώ το βάθος της κοιλότητας στην οποία εισάγεται η σκόνη, καθορίζει τη μάζα τους. Η αρχή λειτουργίας του μηχανήματος βασίζεται στην υδραυλική πίεση, που είναι απόρροια μηχανικής δύναμης [33].



Εικόνα 16: Συσκευή δισκιοποίησης – Tablet Press εργαστηρίου

2.2.5 Συσκευή μέτρησης σκληρότητας δισκίων (Hardness test)

Κατά τη διάρκεια χρήσης της παραπάνω συσκευής δισκιοποίησης, ήταν απαραίτητο να γίνεται, ταυτόχρονα, έλεγχος για τη σκληρότητα των παραγόμενων δισκίων, καθώς το χαρακτηριστικό αυτό και συνεπώς η δύναμη θραύσης έχει άμεση επίδραση στη ταχύτητα διάσπασης τους. Ο έλεγχος της σκληρότητας των δισκίων είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται από τη φαρμακευτική βιομηχανία για τη δοκιμή του σημείου θραύσης και της δομικής ακεραιότητας ενός δισκίου. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το Tablet Hardness tester TBH 125 D της ERWEKA. Η βασική του λειτουργία συνοψίζεται στη συμπίεση και θραύση των

παραγόμενων δισκίων και η ταυτόχρονη μέτρηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών τους (πάχος, διάμετρος) καθώς και της δύναμης θραύσης [32].



Εικόνα 17: Συσκευή μέτρησης σκληρότητας δισκίων εργαστηρίου

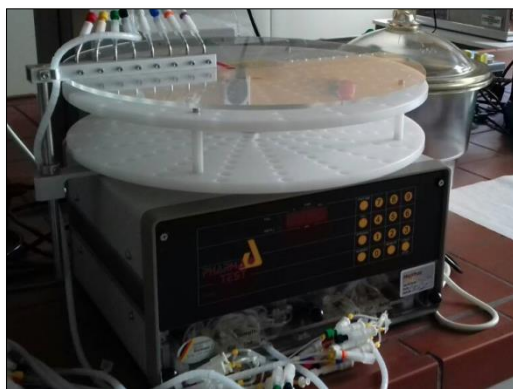
2.2.6 Διάταξη διαλυτοποίησης δισκίων (Dissolution test)

Χρησιμοποιήθηκε μια διάταξη διαλυτοποίησης δισκίων, η οποία αποτελούνταν από τις εξής συσκευές: τη συσκευή διαλυτοποίησης, μια περισταλτική αντλία και έναν αυτόματο δειγματολήπτη. Το Semi- Automated Dissolution Test Instrument PT-DT70, PHARMA TEST, είναι μια διάταξη που αποτελείται από 7 δοχεία τα οποία βρίσκονται σε ένα γυάλινο λουτρό, και φέρουν στο επάνω μέρος τους ένα περιστρεφόμενο μεταλλικό έλικα. Τόσο η ταχύτητα περιστροφής των ελίκων, όσο και η θερμοκρασία του λουτρού μπορούν να ρυθμιστούν και να διατηρηθούν σταθερές, ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα. Η συχνότητα περιστροφής μπορεί να ρυθμιστεί στο εύρος 20-250 rpm. Το μέσο διαλυτοποίησης και τα δισκία προς διάλυση, τοποθετούνται στα δοχεία και πωματίζονται [33].



Εικόνα 18 Συσκευή διαλυτοποίησης δισκίων

Με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας, λαμβάνεται δείγμα (υγρό) από τα 7 δοχεία. Ο μηχανισμός της αντλίας, παρέχει τη δυνατότητα αυξομείωσης της ποσότητας του δείγματος που λαμβάνεται κάθε φορά. Ο χρόνος της κάθε δειγματοληψίας ρυθμίζεται στην αρχή του πειράματος, σε ίσα ή διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τέλος, τα δείγματα μέσω ειδικών καλωδίων τοποθετούνται σε δειγματοληπτικούς σωλήνες οι οποίοι ανανεώνονται αυτόματα για την επόμενη δειγματοληψία, με τη βοήθεια του αυτόματου δειγματολήπτη.



Εικόνα 19: Αυτόματος δειγματολήπτης του Dissolution Test Instrument

2.2.7 Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατής ακτινοβολίας

Στο τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατής ακτινοβολίας UV-IR Jasco V-630, προκειμένου να μελετηθεί η μεταβολή (αύξηση) της συγκέντρωσης της ουσίας που

ενθυλακώθηκε, στο μέσο διάλυσης, και συνεπώς το προφίλ απελευθέρωσης της. Η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας πάνω στην ύλη έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση ενέργειας στις διάφορες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η απορρόφηση του φωτός (A) και η συγκέντρωση της ουσίας συνδέονται με την παρακάτω σχέση – νόμο των Beer- Lambert [36].

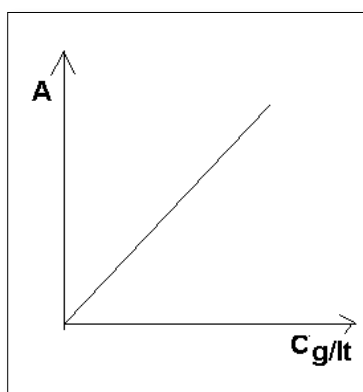
$$A = a \cdot b \cdot C \quad (1)$$

C : η συγκέντρωση της ουσίας σε g/l

b: το μήκος διανυθείσας διαδρομής μέσα στο διάλυμα (αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας)

a: η σταθερά αναλογίας - απορροφητικότητα.

Τα μεγέθη b και a σε κάθε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο είναι σταθερά, ($a \cdot b = 0,04 \text{ L/g}$) με αποτέλεσμα η απορρόφηση A να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης C. Αυτή η αναλογία χρησιμοποιείται παρακάτω, για τη βαθμονόμηση του φωτόμετρου.



Εικόνα20: Η σχέση της συγκέντρωσης με την απορρόφηση, στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού

2.2.8 Φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού των παραγόμενων σφαιριδίων, μελετήθηκε το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου μέσω του φασματοφωτόμετρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) Agilent, Cary 630 FTIR-ATR. Το φάσμα αυτό αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει τόσο στην ποιοτική ανάλυση όσο και στην απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, παρέχοντας πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο, καθώς και τη διάταξή τους στον χώρο. Το βασικό πλεονέκτημα της *FTIR* φασματοσκοπίας έναντι των παραδοσιακών φασματοφωτόμετρων διασποράς, είναι ότι γίνεται χρήση συμβολόμετρου αντί μονοχρωμάτορα, γεγονός που επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα. Η πληροφορία που λαμβάνεται καταγράφει τις μεταβολές του ανιχνευτή συναρτήσεως του χρόνου (time domain spectrum). Τα δεδομένα υπόκεινται σε μαθηματική επεξεργασία με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, όπου τελικά μετατρέπονται στο ληφθέν φάσμα IR, το οποίο αναπαριστά την ένταση συναρτήσεως της συχνότητας (frequency domain spectrum) [35], [37].

2.2.9 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

Η μικροδομή και η στοιχειακή ανάλυση των παραγόμενων σφαιριδίων μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), σε συνδυασμό με φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς ακτίνων X (EDS). Ένα PHILIPS Quanta Inspect (FEI Company) μικροσκόπιο με νήμα 149 W, 25 KV εξοπλισμένο με EDAX GENESIS (AMETEX PROCESS & 150 ANALYTICAL INSTRUMENTS) χρησιμοποιήθηκε για τον συγκεκριμένο χαρακτηρισμό. Η δυνατότητα εστίασης και προσαρμογής της μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο, η καλή ευκρίνεια εικόνας και η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος, είναι μερικοί από τους λόγους που το SEM χρησιμοποιείται ευρέως.

Στα δείγματα προς μελέτη, αρχικά εναποτέθηκε ένα λεπτό υμένιο χρυσού, ώστε να καταστεί εφικτή η εξέταση τους -ως μη αγώγιμα υλικά. Στη συνέχεια, τα

δείγματα τοποθετήθηκαν στον -υπό κενό- θάλαμο και η επιφάνεια τους σαρώθηκε από δέσμη τη ηλεκτρονίων. Η δέσμη αυτή παράγεται από θερμιονική εκπομπή νήματος βολφραμίου η οποία λειτουργεί ως κάθοδος, λόγω της ανάπτυξης διαφοράς δυναμικού. Κατά τη πρόσπτωση της δέσμης στην επιφάνεια του δείγματος, ηλεκτρόνια εισχωρούν σε βάθος της τάξεως του 1 μm και στη συνέχεια προκαλούν εκπομπή δευτερογενών (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενων (backscattered) ηλεκτρονίων, καθώς και ακτίνων Χ. Όλα τα προϊόντα εκπομπής συλλέγονται από διαφορετικούς ανιχνευτές και με κατάλληλη επεξεργασία μετατρέπονται σε εικόνα, η οποία αναπαριστά τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του δείγματος [37].

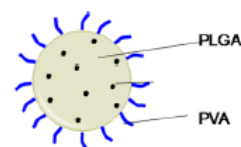
2.2.10 Φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς ακτίνων Χ (EDS)

Το SEM, το οποίο είναι στενά συνδεδεμένο με τον ανιχνευτή ηλεκτρονίων, έχει σχεδιαστεί κυρίως για την παραγωγή εικόνων, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση στοιχείων καθώς και την ποσοτικοποίηση τους, εάν συνδεθεί με φασματόμετρο ακτίνων Χ. Συνεπώς υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη των λειτουργιών τους.

Το φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς ακτίνων Χ (EDS) χρησιμοποιεί το φάσμα ακτίνων Χ που εκπέμπεται από ένα δείγμα το οποίο έχει βομβαρδιστεί με εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, προκειμένου να δώσει πληροφορίες για τη χημική του σύσταση. Η ποιοτική ανάλυση που παρέχεται, περιλαμβάνει την αναγνώριση των κορυφών στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα και η ποσοτική ανάλυση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των παρόντων στοιχείων. Τα φασματόμετρα ενεργειακής διασποράς (EDS) χρησιμοποιούν "ανάλυση ύψους παλμών". Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής που δίνει παλμούς εξόδου, αναλογικούς (σε ύψος) με την ενέργεια φωτονίων ακτίνων Χ σε συνδυασμό με έναν ανιχνευτή ύψους παλμού πολυκαναλικού τύπου. Οι ακτίνες Χ προκαλούν ιονισμό στον ανιχνευτή, δημιουργώντας ηλεκτρικό φορτίο το οποίο ενισχύεται. Κατά τη σάρωση της δέσμης στην επιφάνεια του δείγματος και την παράλληλη εμφάνιση της έντασης μιας επιλεγμένης γραμμής ακτίνων Χ, μπορούν να παραχθούν εικόνες κατανομής στοιχείων, καθώς και αντίστοιχοι "χάρτες". Οι εικόνες που παράγονται

από τα ηλεκτρόνια, συλλέγονται μετά από την ακτινοβόληση του δείγματος και αποκαλύπτουν την τοπογραφία της επιφάνειας, όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω [38].

2.3 Μελέτη σύνθεσης μικρο-σφαιριδίων



2.3.1 Μεθοδολογία σύνθεσης μικρο-σφαιριδίων

Κατά το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, στόχος ήταν η δημιουργία μικρο-σφαιριδίων από PLA, τα οποία περιέχουν ποσότητα methyl orange. Η τεχνική που επιλέχθηκε, για τη δημιουργία σφαιριδίων καθώς και για την ταυτόχρονη ενθυλάκωση υδρόφιλης δραστικής ουσίας, είναι αυτή του διπλού γαλακτώματος νερό - έλαιο - νερό ($W_1/O/W_2$). Συνοπτικά, η δραστική ουσία διαλύθηκε σε νερό (πρώτη υδάτινη φάση, W_1) και προστέθηκε στάγδην σε διάλυμα πολυγαλακτικού οξέος - διχλωρομεθανίου (οργανική φάση, O). Ακολούθησε η έκθεση του μείγματος σε υπερήχους υψηλής έντασης, για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός μικρών σταγονιδίων νερού-δραστικής ουσίας που περιβάλλονται από το πολυμερές. Το γαλάκτωμα που προέκυψε, προστέθηκε σε νερό (δεύτερη υδάτινη φάση, W_2), στο οποίο είχε διαλυθεί μια επιφανειακή - σταθεροποιητική ουσία (poly vinyl alcohol) και υπέστη έντονη ανάδευση ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης του πολυμερούς και να σταθεροποιηθούν πλήρως τα σφαιρίδια. Πιο αναλυτικά η διαδικασία σύνθεσης των φορέων χωρίζεται σε τρία στάδια: α) τη δημιουργία διαλυμάτων, β) τη γαλακτωματοποίηση, παρουσία επιφανειοδραστικής ένωσης και γ) τη συλλογή και φύλαξη των παραγόμενων σφαιριδίων [31].

α) Δημιουργία διαλυμάτων

1. Ζυγίστηκε $1,00 \pm 0,01$ gr πολυγαλακτικού- οξέος (PLA) και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα.

2. Μεταφέρθηκαν στο δείγμα 10 ml διαλύτη- διχλωρομεθάνιο (DCM).
3. Καλύφθηκε το επάνω μέρος του σωλήνα με ένα μικρό κομμάτι φύλλο αλουμινίου και με Parafilm και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα σε 8.500-9.000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες, έως ότου διαλυθεί πλήρως το PLA (Οργανική φάση, O).
4. Παράλληλα ζυγίστηκαν $0,50 \pm 0.01$ gr methyl orange, μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν σε 10 ml απιονισμένου νερού (Πρώτη υδάτινη φάση, first water phase , W_1).
5. Καλύφθηκε, το επάνω μέρος του σωλήνα, με Parafilm και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες, έως την πλήρη διάλυση του methyl orange.
6. Σε ένα τρίτο ποτήρι ζέσεως, ζυγίστηκαν 2 gr polyvinyl alcohol (PVA), στα οποία προστέθηκαν 200 mL απιονισμένου νερού, (Δεύτερη υδάτινη φάση, second water-phase; W_2).
7. Ομοίως, το προηγούμενο διάλυμα καλύφθηκε με Parafilm και ακολούθησε η ανάδευση του με μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες, έως τη πλήρη διάλυση του PVA.

Δημιουργία γαλακτωμάτων – σφαιριδίων

8. Τέθηκε σε λειτουργία η συσκευή των υπερήχων και ρυθμίστηκε η ένταση στα 220 watt.

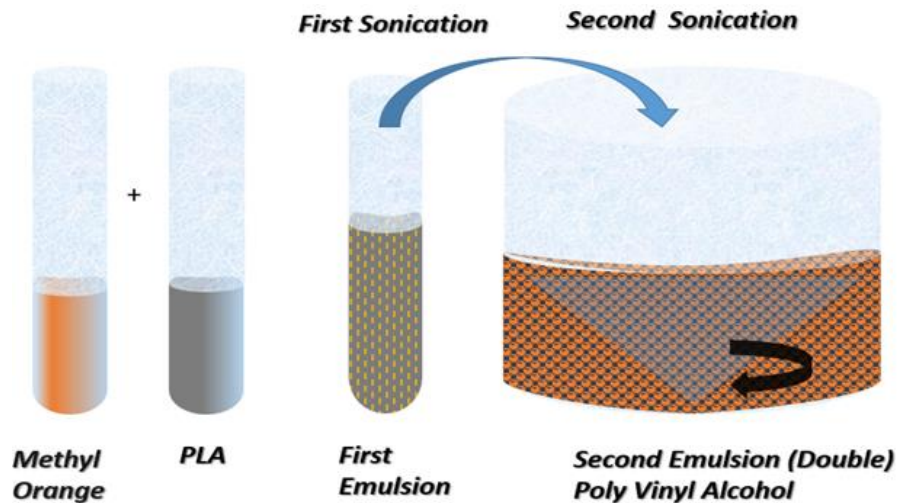
9. Τοποθετήθηκε το ποτήρι ζέσεως της πρώτης υδάτινης φάσης σε πάγο, ώστε να αποτραπεί η άνοδος της θερμοκρασίας, λόγω της έκθεσης του στους υπέρηχους που ακολουθούν.

10. Προστέθηκε το PLA (οργανική φάση) και το μίγμα εκτέθηκε στους υπέρηχους για σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να γαλακτωματοποιηθεί το methyl orange με το πολυμερές (τυπικά 10 δευτερόλεπτα, ή ο απαραίτητος χρόνος για να επιτευχθεί ένα ομοιογενές, αδιαφανές διάλυμα).

11. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε το τρίτο ποτήρι ζέσεως (υδάτινη φάση 2) σε λουτρό πάγου. Αμέσως προστέθηκε στάγδην το πρώτο γαλάκτωμα και η ανάδευση συνεχίστηκε, υπό τις ίδιες συνθήκες.

12. Έπειτα, μεταφέρθηκε το διάλυμα στον σωλήνα υπερήχων, και ακολούθησε η έκθεση του σε υπέρηχους ίδιας εντάσεως, άλλα για τρεις ριπές των 10 δευτερολέπτων και μια ακόμα των 5 δευτερολέπτων. Τα χρονικά αυτά διαστήματα, επιλέχθηκαν σύμφωνα με την ανάλυση του κεφαλαίου 2.3.2.2, παρακάτω. Η παύση μεταξύ κάθε έκθεσης σε υπερήχους ήταν απαραίτητη για να επιτραπεί στο διάλυμα να κρυώσει. Κατά τη διάρκεια των υπερήχων, απαιτήθηκε μετακίνηση του γαλακτώματος προς τα επάνω και προς τα κάτω στον σωλήνα για να διασφαλιστεί ομοιόμορφη επεξεργασία. Δόθηκε προσοχή, ώστε να μην αγγίξει το ακροφύσιο της συσκευής υπερήχων στις πλευρές ή στον πυθμένα του δοχείου.

13. Το γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε, περιείχε μικρο-σφαιρίδια μέσα στα οποία υπήρχε -διαλυμένο σε νερό, W_1 – το methyl orange. Τέλος, προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα σφαιρίδια, παρέμειναν υπό ανάδευση για 5 ώρες στα 300 rpm. Το πάνω μέρος του δοχείου αφέθηκε ανοιχτό για να διευκολυνθεί η εξάτμιση του διαλύτη (διχλωρομεθανίου).



Εικόνα 22 : Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παρασκευής σφαιριδίων με τη μέθοδο του διπλού γαλακτώματος [42].

Συλλογή σφαιριδίων.

14. Στη συνέχεια ακολούθησε η φυγοκέντρηση του γαλακτώματος για 10 min στα 5.000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων με απιονισμένο νερό.

15. Έπειτα, το ίζημα συλλέχθηκε με πιπέτα, και τοποθετήθηκε προς ξήρανση για 5 ημέρες. Το προϊόν που προέκυψε, ήταν σκληρό και εύθραυστο.

16. Ακολούθησε η κονιορτοποίηση του παραπάνω υλικού, μέσω θραύσης με γουδί.

17. Στο τελικό στάδιο περιλαμβάνεται η λυοφιλίωση της σκόνης, για την απομάκρυνση του νερού τόσο από τις διεπιφάνειες των σφαιριδίων, όσο και από το εσωτερικό των δομών.

18. Το υλικό φυλάχθηκε σε κατάψυξη, στους -20 °C.

2.3.2 Διερεύνηση βέλτιστων παραμέτρων σύνθεσης

Η παραπάνω μεθοδολογία σύνθεσης είναι απόρροια μια σειράς πειραμάτων τριών κύκλων, οι οποίοι περιγράφονται σε αυτό το κεφάλαιο. Στόχος των πειραμάτων, ήταν να μειωθεί τόσο η διασπορά του μεγέθους των σφαιριδίων, όσο και η διάμετρος τους. Η μέθοδος του διπλού γαλακτώματος, ακολουθείται σε όλα τα παρακάτω πειράματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.3.1 (βήματα 1-18).

2.3.2.1 Βέλτιστο εύρος ισχύος των υπερήχων

Ο πρώτος (Α) κύκλος πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εκτιμηθεί το βέλτιστο εύρος ισχύος των υπερήχων, που εφαρμόζονται για τη δημιουργία των γαλακτωμάτων. Κρατώντας σταθερές όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους, διεξήχθησαν πέντε πειράματα, με διαφορετικές συχνότητες κοντά σε αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές. Στη συνέχεια, καταγράφηκε η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, η οποία παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1, παρακάτω. Πιο αναλυτικά, οι σταθερές τιμές κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ήταν οι εξής [41]:

(Α) Σειρά πειραμάτων πρώτου κύκλου	Μάζες (gr)		Μάζα PVA (gr)	Χρόνος έκθεσης στους υπερήχους (s)	Ισχύς (W)
	PLA	Methyl orange			
1	1,00	0,50	1,70	40	180
2					200
3					220
4					240
5					260

Πίνακας 4: Πρώτος (Α) κύκλος πειραμάτων, διερεύνηση βέλτιστης ισχύος υπερήχων.

2.3.2.2 Βέλτιστος χρόνος έκθεσης σε υπέρηχους

Ο δεύτερος (B) κύκλος πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση του χρόνου έκθεσης των δειγμάτων σε υπέρηχους. Κρατώντας σταθερές όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους, όπως προηγουμένως, και επιλέγοντας τη βέλτιστη τιμή της ισχύος από τον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν πέντε πειράματα με διαφορετικούς χρόνους έκθεσης σε υπερήχους, κοντά σε αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές [41]. Όπως παραπάνω καταγράφηκε η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων και παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2 παρακάτω. Πιο αναλυτικά, οι σταθερές τιμές κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν οι εξής :

(B) Σειρά πειραμάτων δεύτερου κύκλου	Μάζες (gr)		Μάζα PVA (gr)	Χρόνος έκθεσης στους υπέρηχους (s)	Ισχύς (W)
	PLA	Methyl orange			
1	1,00	0,50	1,70	25	220
2				30	
3				35	
4				40	
5				45	

Πίνακας 5: Δεύτερος (B) κύκλος πειραμάτων, διερεύνηση βέλτιστου χρόνου έκθεσης των δειγμάτων σε υπερήχους.

2.3.2.3 Βέλτιστη ποσότητα επιφανειοδραστικής ουσίας.

Ο τρίτος (Γ) και τελευταίος κύκλος πειραμάτων, έγινε με στόχο να διερευνηθεί η επίδραση της ποσότητας της επιφανειοδραστικής ουσίας. Η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας, παίζει βασικό ρόλο στο μέγεθος των σφαιριδίων που θα σχηματιστούν, καθώς επηρεάζει την αναλογία επιφάνειας προς όγκο. Χαμηλή συγκέντρωση συνεπάγεται την καταστολή των ηλεκτροστατικών

αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα, υψηλή συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας, ευνοεί τη δημιουργία μικκυλίων, το μέγεθος των οποίων μειώνεται με την αύξηση της. Αυτό συμβαίνει διότι επαρκής ποσότητα επιφανειοδραστικής ουσίας συνεπάγεται άμεση ‘κάλυψη’ των δημιουργούμενων σφαιριδίων, και αποτροπή πιθανής επανασύνδεσης.

Κρατώντας σταθερές όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους όπως προηγουμένως και επιλέγοντας τη βέλτιστη τιμή της ισχύος και του χρόνου έκθεσης από τους προηγούμενους κύκλους πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν πέντε πειράματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA), κοντά σε αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές [41]. και καταγράφηκε η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Πιο αναλυτικά, οι τιμές των παραμέτρων κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν οι εξής :

(Γ) Σειρά πειραμάτων τρίτου κύκλου	Μάζες (gr)		Μάζα PVA (gr)	Χρόνος έκθεσης στους υπέρηχους (s)	Ισχύς (W)
	PLA	Methyl orange			
1	1,00	0,50	1,6	35	220
2			1,8		
3			1,9		
4			2,0		
5			2,1		

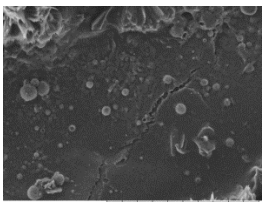
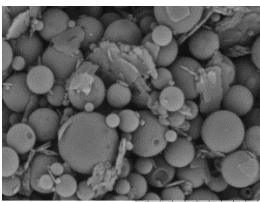
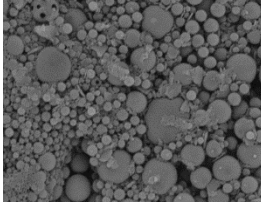
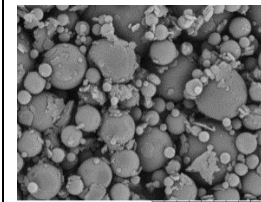
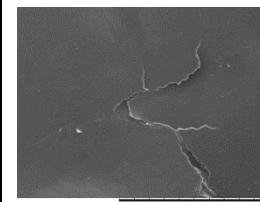
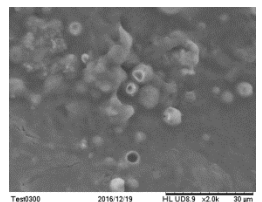
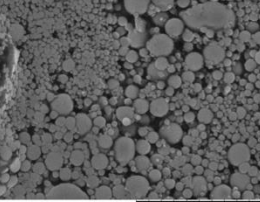
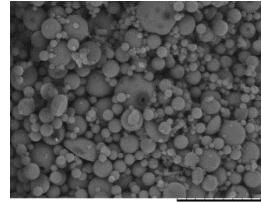
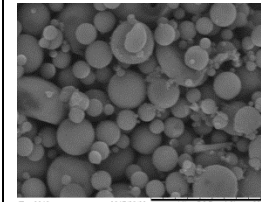
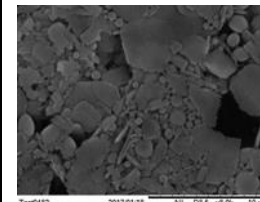
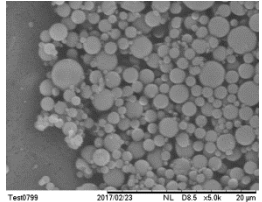
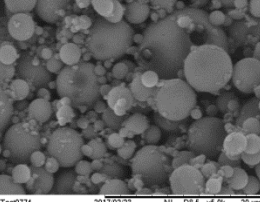
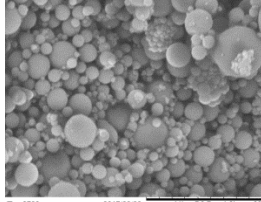
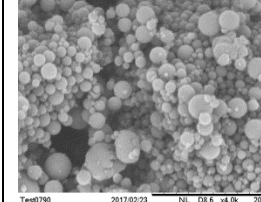
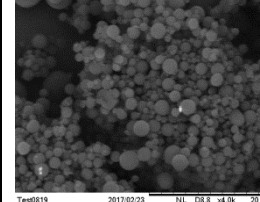
Πίνακας 6: Τρίτος (Γ) κύκλος πειραμάτων, διερεύνηση βέλτιστης μάζας επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA)

2.3.2.4 Χαρακτηρισμός δοκιμαστικών σφαιριδίων με SEM

Σύμφωνα με τους πίνακες 4,5 και 6 παραπάνω, διεξήχθησαν 15 πειράματα και δημιουργήθηκαν 15 δείγματα προς μελέτη. Προκειμένου να διαπιστωθούν οι αλλαγές στη μορφολογία των δειγμάτων, μελετήθηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες

εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, που αντιστοιχούν στους κύκλους και τις σειρές πειραμάτων των πινάκων .

Οι παρακάτω εικόνες, σε συνδυασμό με την επεξεργασία και ποσοτικοποίηση παραμέτρων που αναφέρονται στο 2.3.1 υπέδειξαν τις βέλτιστες συνθήκες σύνθεσης των σφαιριδίων.

	1	2	3	4	5
A					
	P = 180 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 200 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 240 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 260 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr
B					
	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 30 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 35 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 40 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 45 sec m_{PVA} = 1,70 gr
Γ					
	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 1,70 gr	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 1,80 gr	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 1,90 gr	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 2,00 gr	P = 220 watt t = 25 sec m_{PVA} = 2,10 gr

Πίνακας 7 : Ενδεικτικές εικόνες από το SEM, για διαφορετικές τιμές της ισχύος (P), του χρόνου (t) εφαρμογής των υπερήχων, καθώς και της μάζας του PVA (m_{PVA}) που μελετήθηκαν.

Οι εικόνες από τον πρώτο κύκλο πειραμάτων, που αφορούν στις αλλαγές στην ισχύ των υπερήχων, παρουσιάζονται στη πρώτη γραμμή του παραπάνω

πίνακα (A1, A2, A3, A4, A5). Παρατηρείται ότι στην εικόνα A1 έχουν δημιουργηθεί ελάχιστα σφαιρίδια, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του υλικού, έχει παραμείνει άμορφο. Το γεγονός αυτό, αποδίδεται στη χαμηλή ισχύ των υπερήχων (180 Watt), που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των σφαιριδίων. Στις εικόνες A2 και A3 παρατηρείται η δημιουργία σφαιριδίων διαφόρων μεγεθών σε ολόκληρη την επιφάνεια των δειγμάτων. Ωστόσο, ένας πιο ακριβής υπολογισμός της κατανομής των μεγεθών των σφαιριδίων, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1 παρακάτω, δίνει περισσότερες πληροφορίες. Στην εικόνα A4, φαίνεται να έχουν δημιουργηθεί αρκετά σφαιρίδια, αν και ένα μεγάλο μέρος της επιφάνειας έχει παραμείνει άμορφο. Τέλος, στην εικόνα A5 δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη δομή στην επιφάνεια του δείγματος, γεγονός που αποδίδεται στην υψηλή ισχύ των υπερήχων. Το υλικό εκτίθενται σε υπερήχους, προκειμένου να αναμειχθεί η οργανική με την υδατινή φάση, ενώ ταυτόχρονα δημιουργούνται σφαιρίδια με τη βοήθεια της επιφανειοδραστικής ένωσης. Σταδιακά, οι μεγάλες σφαίρες που έχουν δημιουργηθεί, δέχονται την ενέργεια των υπερήχων και διασπώνται συνεχώς σε μικρότερες. Ταυτόχρονα, η επιφανειοδραστική ένωση καλύπτει την επιφάνεια των σφαιριδίων, αποτρέποντας την επανασύνδεση τους. Συνεπώς, μικρή ισχύς δεν επαρκεί για την ανάμειξη των φάσεων και τη δημιουργία σφαιριδίων (όπως στην εικόνα A2), ενώ μεγαλύτερη ισχύς αν και αρχικά οδηγεί στη δημιουργία μικρών σφαιρών, στη συνέχεια επιφέρει τη διάσπαση τους (όπως στις εικόνες A5 και A4).

Οι εικόνες από τον δεύτερο κύκλο πειραμάτων, όπου εξετάζεται ο χρόνος έκθεσης στους υπερήχους, παρουσιάζονται στη δεύτερη σειρά του πίνακα (B1, B2, B3, B4, B5). Στην εικόνα B1, παρατηρείται η δημιουργία σφαιριδίων αλλά και άμορφου υλικού, γεγονός που αποδίδεται στον μικρό χρόνο έκθεσης στους υπερήχους. Στις εικόνες B1, B2 και B3, διακρίνεται ο σχηματισμός σφαιριδίων διαφόρων διαστάσεων, τα μεγέθη των οποίων ποικίλουν και αναλύονται παρακάτω. Τέλος, στην εικόνα B5 παρατηρούνται ελάχιστα σφαιρίδια, πιθανώς διότι μετά τη δημιουργία των αρχικών σφαιριδίων, ο επιπλέον χρόνος πρόσδοσης ενέργειας οδήγησε στην καταστροφή τους.

Τέλος, οι εικόνες από τον τρίτο κύκλο πειραμάτων, όπου εξετάζεται η επίδραση της επιφανειοδραστικής ένωσης, φαίνονται στην τρίτη σειρά του πίνακα 7 (Γ1, Γ2, Γ3, Γ4, Γ5). Σε όλες αυτές τις εικόνες, η μορφολογία των δειγμάτων είναι

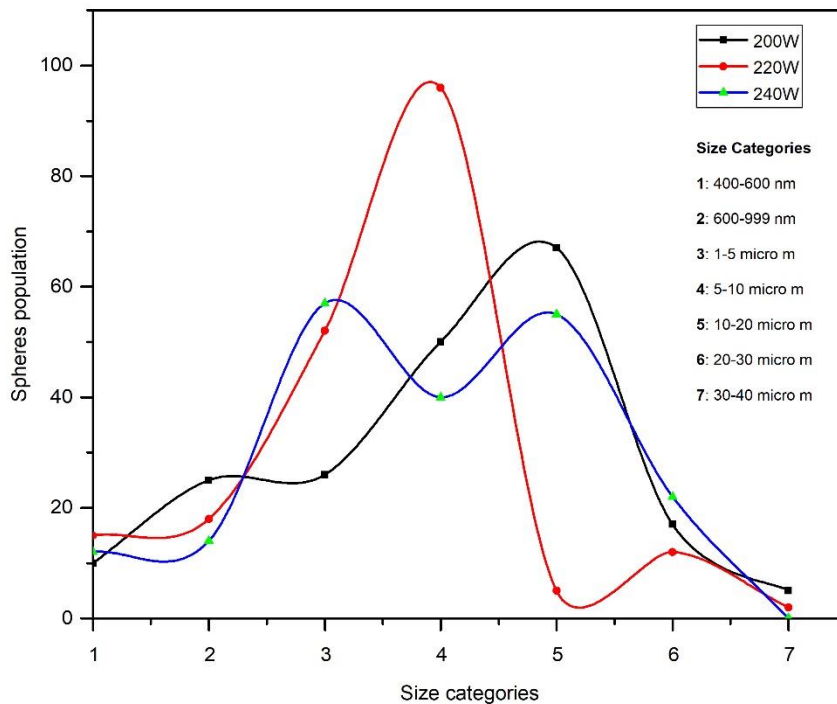
παρόμοια. Παρατηρούνται σφαιρίδια κατανεμημένα σε όλη την επιφάνεια των δειγμάτων, ενώ δε παρατηρείται κάποιο σημείο που να έχει παραμείνει άμορφο. Οι διαφορές που παρατηρούνται, αφορούν το μέγεθος των σφαιριδίων και αναλύονται στο επόμενο κεφάλαιο.

2.3.2.5 Διαγράμματα επιλογής παραμέτρων σύνθεσης και αποτελέσματα

Στο επόμενο στάδιο της παρούσας εργασίας, στόχος ήταν να μελετηθεί περεταίρω, η επίδραση των τιμών της ισχύος, του χρόνου εφαρμογής των υπερήχων και της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής ένωσης, στο μέγεθος των σφαιριδίων που δημιουργούνται. Για τον σκοπό αυτό, για κάθε πείραμα από τα 15, μετρήθηκε η διάμετρος 200 σφαιριδίων, από διαφορετικές περιοχές των δειγμάτων. Οι διάμετροι κατηγοριοποιήθηκαν σε επτά κατηγορίες. Η πρώτη περιελάμβανε σφαιρίδια με διάμετρο από 400 nm έως 600 nm, η δεύτερη από 600 nm έως 999 nm, η τρίτη από 1 μm έως 5 μm, η τέταρτη από 5 έως 10 μm, η πέμπτη από 10 μm έως 20μm, η έκτη από 20 μm έως 30 μm και η έβδομη από 30 μm έως 40 μm.

Στα παρακάτω διαγράμματα βλέπουμε την κατανομή του αριθμού των σφαιριδίων στις παραπάνω κατηγορίες. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μιας σειράς πειραμάτων, σύμφωνα με τα οποία επιλέχθηκαν οι βέλτιστες πειραματικές τιμές για τη δημιουργία σφαιριδίων, όπως περιγράφεται στη 2.3.1.

Ο πρώτος (A) κύκλος πειραμάτων μας δίνει δεδομένα για το βέλτιστο εύρος **ισχύος** των υπερήχων, σύμφωνα με το διάγραμμα 1 και τον πίνακα 4. Αρχικά προσδιορίστηκαν οι ακραίες τιμές της ισχύος, όπου παρατηρείται ότι δε δημιουργούνται τα επιθυμητά σφαιρίδια, συνεπώς τα σχετικά δεδομένα παρελήφθησαν. Όσον αφορά τις μεσαίες τιμές της ισχύος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στο επόμενο διάγραμμα.



Διάγραμμα 1: Μελέτη βέλτιστης τιμής ισχύος υπερήχων

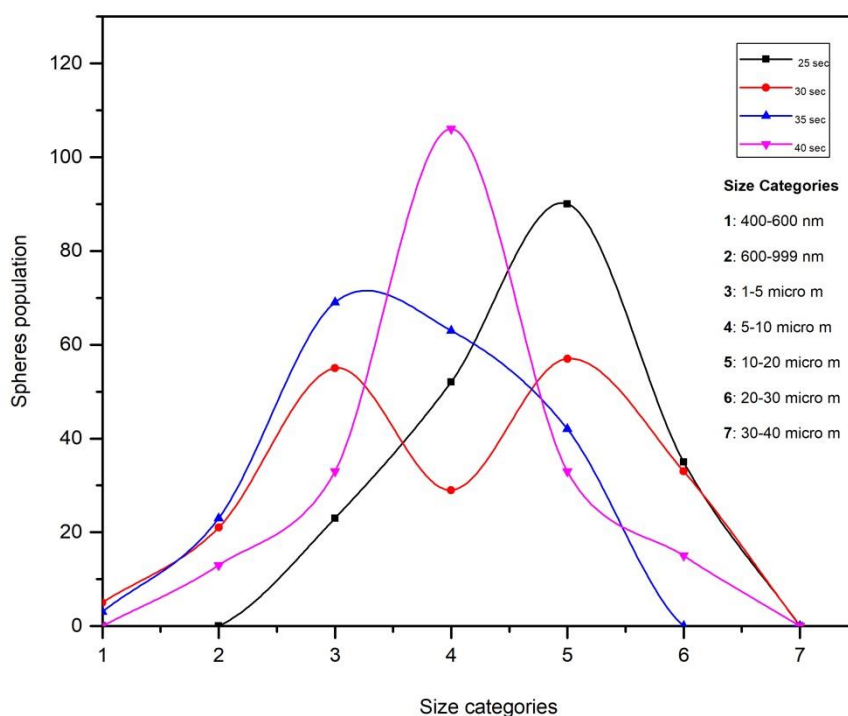
Παρατηρείται ότι για την ισχύ των 200W, υπάρχουν δύο κορυφές, μια στα 20-30 μm και μία μικρότερη στα 600-999 μm . Συμπεραίνεται ότι, με τη συγκεκριμένη ισχύ δημιουργήθηκαν σφαιρίδια της τάξης των 10 μm , λίγα από τα οποία διασπάστηκαν περισσότερο, δημιουργώντας αρκετά σφαιρίδια της τάξης του 1 μm .

Παρατηρώντας το διάγραμμα που αντιστοιχεί στην ισχύ των 240W, παρατηρούμε δύο κορυφές, μία στα 10-20 μm και ακόμα μία ίδιου μεγέθους στα 1-5 μm . Συμπεραίνεται λοιπόν, πως σχεδόν τα μισά από τα σφαιρίδια των 10 μm διασπάστηκαν σε μικρότερα της τάξης του 1 μm , δημιουργώντας μια ευρεία κατανομή μεγεθών.

Τέλος, από το διάγραμμα που αντιστοιχεί στην ισχύ των 220W, παρατηρούνται και πάλι δύο κορυφές, μια πολύ μικρή στα 20-30 μm και μια αρκετά μεγάλη στα 5-10 μm . Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα, πως τα περισσότερα σφαιρίδια που δημιουργήθηκαν αρχικά στην περιοχή των 20 μm , διασπάστηκαν σε μικρότερα της τάξης των 5 μm , δημιουργώντας μια στενότερη

κατανομή, λόγοι για τους οποίους η τιμή 220W επιλέχθηκε ως βέλτιστη και χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα [31].

Ο δεύτερος (B) κύκλος πειραμάτων δίνει πληροφορίες για την επίδραση του χρόνου έκθεσης των δειγμάτων σε υπέρηχους, στο μέγεθος και την κατανομή των σφαιριδίων που συντέθηκαν.



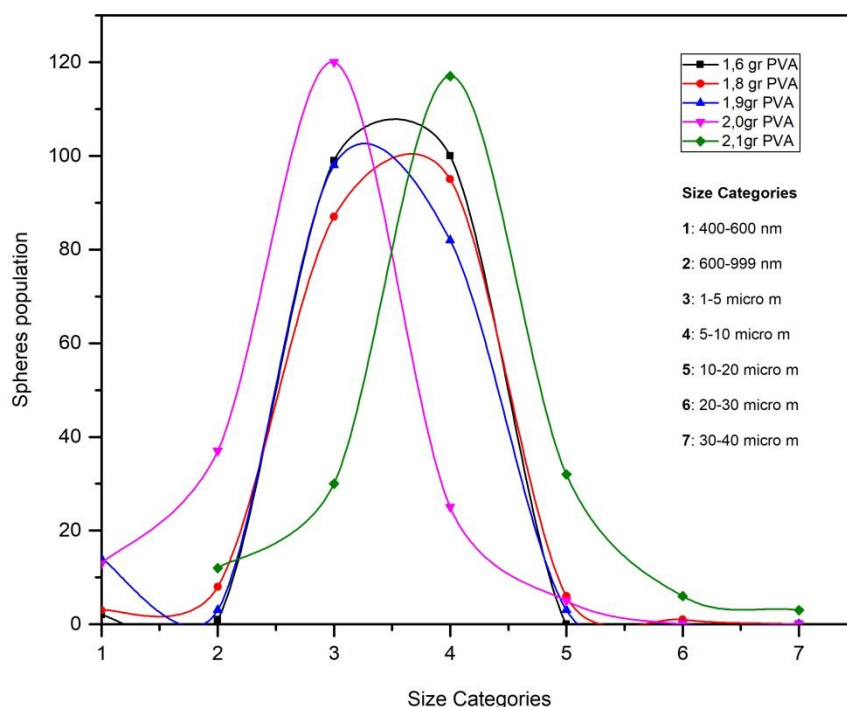
Διάγραμμα 2: Μελέτη βέλτιστου χρόνου έκθεσης σε υπέρηχους

Από τις εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, φαίνεται ότι ο χρόνος $t=45$ sec δεν είναι κατάλληλος, διότι δημιουργεί λίγα σφαιρίδια στην επιφάνεια του υλικού, επομένως δεν αναλύθηκε. Οι τιμές των υπόλοιπων χρόνων έκθεσης επηρεάζουν το μέγεθος και την κατανομή των σφαιριδίων. Συνοπτικά λοιπόν, για τους δύο ακραίους χρόνους 40 sec και 25 sec παρατηρείται, ότι αρχικά δημιουργούνται σφαιρίδια της τάξης των 20-30 μm και στη συνέχεια για τον πρώτο χρόνο διασπώνται σε ελάχιστα σφαιρίδια μεγέθους 5-10 μm , ενώ για τον δεύτερο δημιουργούνται και μερικά σφαιρίδια μεγέθους 10-20 μm .

Για το χρονικό διάστημα των 30 sec παρατηρούνται δύο ίσες κορυφές, στα 1-5 μm και 10-20 μm, γεγονός που υποδεικνύει θραύση των πρώτων σφαιριδίων και δημιουργία των δεύτερων. Μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας υπέρηχοι, έχουν τη δυνατότητα να διασπάσουν περισσότερα σφαιρίδια σε μικρότερα [35].

Ένδειξη της παραπάνω πρότασης, είναι η καμπύλη για τον χρόνο 35 sec όπου επιλέγεται ως βέλτιστος διότι, αν και παρατηρείται μεγάλο εύρος μεγεθών, τα περισσότερα σφαιρίδια ανήκουν στη κατηγορία των 1-5 μm.

Εφόσον επιλέχθηκαν οι κατάλληλες τιμές από τους δύο προηγούμενους κύκλους πειραμάτων, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής ένωσης PVA. Σύμφωνα με τις εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, δημιουργήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις σφαιρίδια σε όλη την επιφάνεια των δειγμάτων. Σύμφωνα με περαιτέρω ανάλυση, προέκυψε η τιμή της συγκέντρωσης του PVA που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα, όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο διάγραμμα.



Διάγραμμα 3: Μελέτη βέλτιστης ποσότητας επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA)

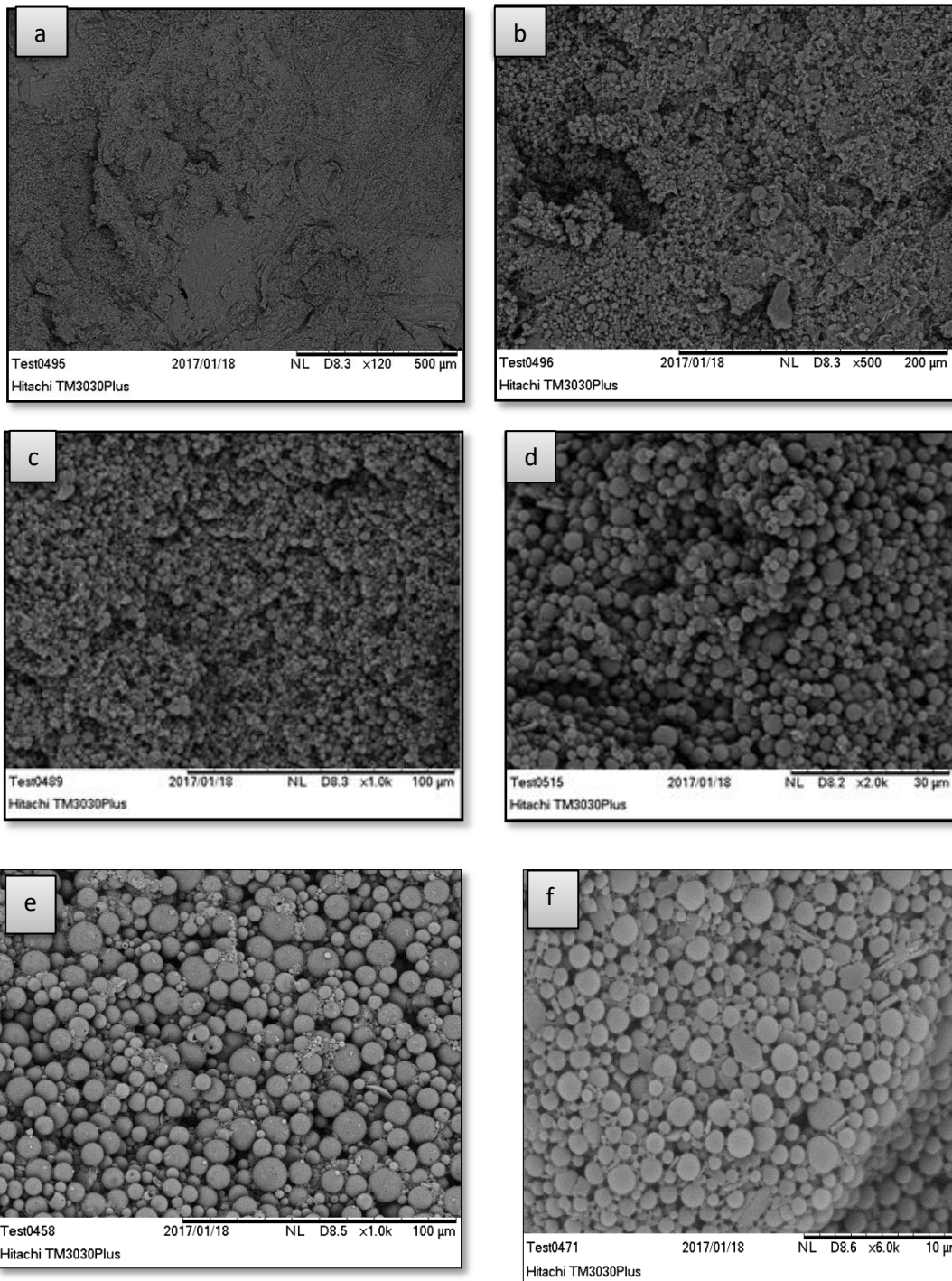
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούνται καμπύλες με μια μόνο κορυφή, σε αντίθεση με τα προηγούμενα διαγράμματα. Η καμπύλη που αντιπροσωπεύει τη μέγιστη συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ένωσης (2,1 gr) έχει στενή κατανομή όμως είναι μετατοπισμένη πιο δεξιά, συνεπώς απορρίφθηκε. Η καμπύλη που αντιπροσωπεύει συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ένωσης 2,0 gr έχει εξίσου στενή κατανομή, όμως λόγω του ότι είναι μετατοπισμένη πιο αριστερά, στα 1-5 μm επιλέγεται ως βέλτιστη. Επιπλέον για την ίδια συγκέντρωση, παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση σφαιριδίων στη κατηγορία των νανομέτρων σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες καμπύλες και των άλλων κύκλων. Οι εναπομένουσες καμπύλες παρουσιάζουν παρόμοιο εύρος και μέγιστο στα 1-10 μm.

Έτσι, προσδιορίστηκαν οι τιμές των τριών μεγεθών που επηρεάζουν το μέγεθος των σωματιδίων που δημιουργούνται. Κάθε τιμή που επιλεγόταν, χρησιμοποιούνταν στους επόμενους κύκλους πειραμάτων, με στόχο την επιλογή της επόμενης. Έγινε η παραδοχή πως η τιμή της κάθε μεταβλητής δεν επηρέαζε τις υπόλοιπες.

2.3.3 Χαρακτηρισμός βελτιστοποιημένων μικρο-σφαιριδίων

2.3.3.1 Χαρακτηρισμός μικρο-σφαιριδίων με SEM

Έπειτα λοιπόν, από τις πειραματικές διαδικασίες βελτιστοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν για τη δημιουργία μικρο-σφαιριδίων. Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.3.1 συντέθηκαν σφαιρίδια, ενδεικτικές εικόνες των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω στην εικόνα

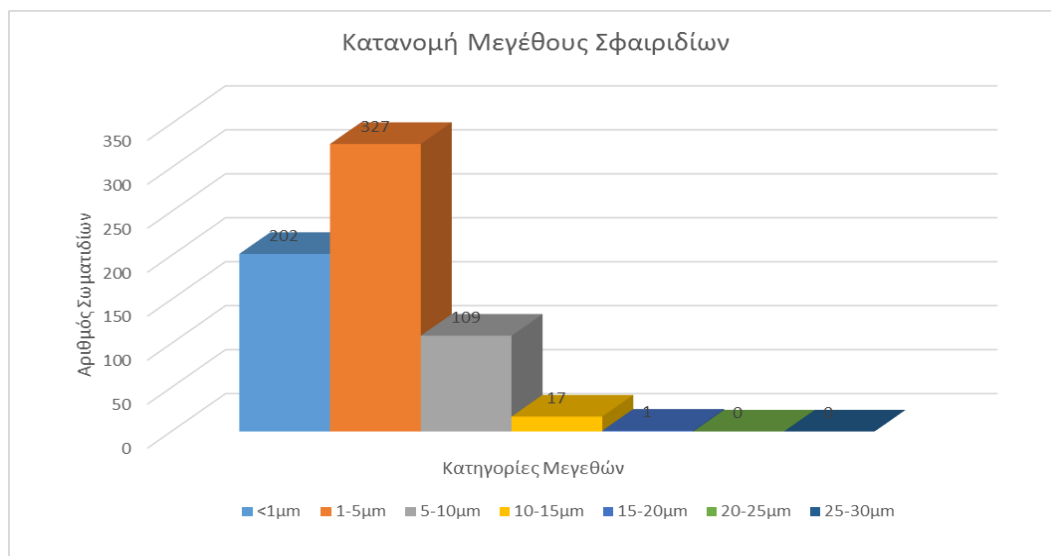


Εικόνες 23 : Φωτογραφίες τελικού συνθετιμένου υλικού από το SEM. a) x 120, b) x 500, c) x 1.000, d) x 2.000, e) x 7.000 f) x 10.000

Από τις παραπάνω εικόνες, παρατηρείται ότι έχουν δημιουργηθεί σφαιρίδια κατανεμημένα τόσο σε ολόκληρη την επιφάνεια του δείγματος, όσο και στα

κατώτερα στρώματα υλικού που φαίνονται στο SEM, γεγονός που υποδεικνύει πως ολόκληρος ο όγκος του υλικού αποτελείται από σφαιρίδια και όχι από άμορφο υλικό. Παρατηρούνται σφαιρίδια με μεγέθη από 10-20 μm έως και σφαιρίδια στη κλίμακα των νανομέτρων.

Το παρακάτω διάγραμμα κατανομής, προέκυψε από ένα τη μέτρηση της διαμέτρου 600 σφαιριδίων από διαφορετικές περιοχές δειγμάτων.



Διάγραμμα 4: Κατανομή σφαιριδίων

Παρατηρείται, λοιπόν, ότι σύμφωνα με τη τελική διαδικασία σύνθεσης, δεν υπάρχουν σφαιρίδια διαμέτρου μεγαλύτερης των 15 μm. Το μεγαλύτερο ποσοστό των σφαιριδίων βρίσκεται ανάμεσα στα 1-5 μm, και υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό σφαιριδίων στη κατηγορία των <1 μm.

2.3.3.2 Χαρακτηρισμός παραγόμενων μικρο - σφαιριδίων με FTIR

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μοριακή δομή και η ταυτοποίηση των συνδεδετικών μέσων των παραγόμενων υλικών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Το φάσμα που προέκυψε από την ανάλυση των δειγμάτων, υπέδειξε τη παρουσία χαρακτηριστικών ζωνών απορρόφησης, όπως φαίνεται στο επόμενο διάγραμμα.

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μm έως 300 μm , και διακρίνεται σε τρεις περιοχές: α) Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα που αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 14.000-4.000 cm^{-1} , β) Το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4.000-400 cm^{-1} , γ) το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα που αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 400-10 cm^{-1} . Η περιοχή NIR επιτρέπει τη μελέτη των υπερτονικών (overtones) και των αρμονικών δονήσεων. Στο μέσο υπέρυθρο φάσμα MIR παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ η FIR περιοχή δίνει πληροφορίες για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος [37].

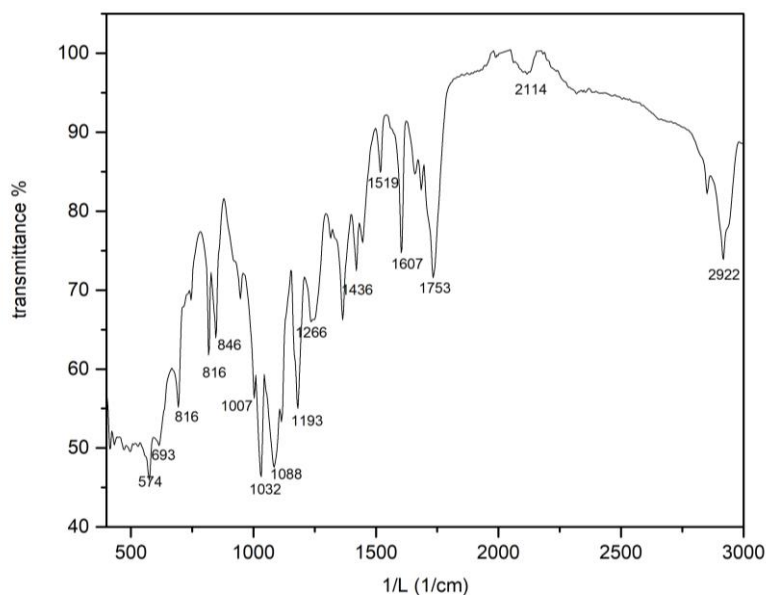
Ένα διατομικό μόριο έχει 3 ανεξάρτητους βαθμούς ελευθερίας (degrees of freedom) κινήσεων στον χώρο, οι οποίοι αντιστοιχούν στις τρεις συνταγμένες x , y , z που απαιτούνται προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση του μορίου στον χώρο σε ένα καρτεσιανό σύστημα αξόνων. Ένα μόριο που αποτελείται από N άτομα, τότε υπάρχουν $3N$ βαθμοί ελευθερίας κινήσεων στον χώρο για όλα τα άτομα του μορίου. Αφαιρώντας τους μεταφορικούς (translational) και τους περιστροφικούς (rotational) βαθμούς τελικά προκύπτουν $3N-6$ δονητικοί (vibrational) βαθμοί ελευθερίας που περιγράφουν τις ταλαντώσεις ενός μη γραμμικού μορίου.

Συνήθως στα μόρια συναντώνται οι ακόλουθοι βασικοί τύποι δονήσεων:

A. Δονήσεις τάσης (stretching vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταξύ τους, μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους απόσταση κατά μήκος του άξονα του δεσμού. Οι συζευγμένες δονήσεις διακρίνονται σε συμμετρικές (symmetric stretching) και ασύμμετρες (asymmetric stretching).

B. Δονήσεις κάμψης (bending vibrations) οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών και διακρίνονται στους εξής τέσσερις τύπους: Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring or deformation vibrations), δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations), δονήσεις σείσης (wagging vibrations) και δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) [37].

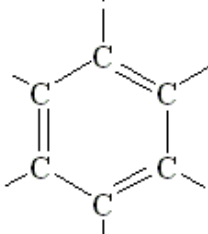
Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, λήφθηκαν μετρήσεις στο μέσο υπέρυθρο φάσμα και παρουσιάζονται σε μορφή διαγράμματος.



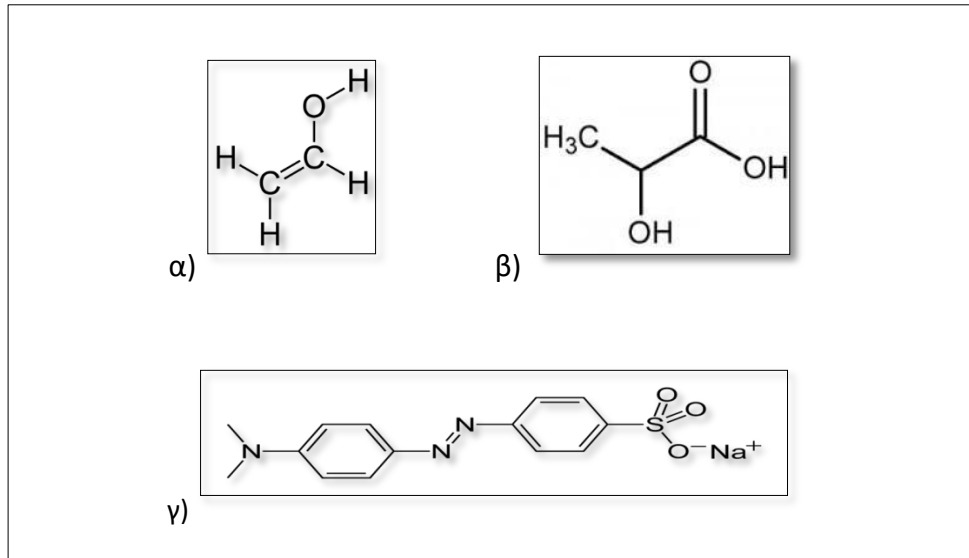
Διάγραμμα 4: FT - IR φάσμα των παραγόμενων σφαιριδίων

Παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στη φασματική περιοχή από τα 574 cm^{-1} έως τα 1700 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στην ύπαρξη methyl orange. Πιο αναλυτικά, εμφανίζονται κορυφές στα 1519 cm^{-1} και 1436 cm^{-1} που αποδίδονται στο δεσμό C=C-H για δονήσεις κάμψης εντός επιπέδου C-H. Σημαντική είναι η ένταση των κορυφών απορρόφησης στα 1032 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} και 846 cm^{-1} που αποδίδονται σε κραδασμούς δακτυλίου άνθρακα [40]. Η κορυφή στα 816 cm^{-1} αποδίδεται στον δισυποκατεστημένο βενζολικό δακτύλιο, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία αρωματικών ομάδων. Ακόμα, η κορυφή στα 1607 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις τάσης του δεσμού -N=N- και οι κορυφές στα 1200 cm^{-1} και 1266 cm^{-1} προσδίδονται σε ταλαντώσεις του δεσμού -C-N-. Τέλος, οι κορυφές στα 693 cm^{-1} , και 574 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις τάσης του δεσμού -C-S [40].

Εκτός από την υπόδειξη ύπαρξης του methyl orange, οι κορυφές στα 816 cm^{-1} και 846 cm^{-1} , μπορεί επιπλέον να αναφέρονται σε C = CH δονήσεις λόγω της ύπαρξης του PVA. Η κορυφή στα 1753 cm^{-1} υποδεικνύει δονήσεις τάσης C = O του PLA και η κορυφή στα 1607 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις τάσης του δεσμού C=C του PVA. Επιπλέον, η κορυφή στα 1088 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση εφελκυσμού του C-O-C της ομάδας εστέρων του PLA.

Κυμματαριθμός κορυφών (cm^{-1})	Δεσμοί	Περιγραφή
1519	C=C-H	Δονήσεις κάμψης εντός του επιπέδου C-H
1436		
1032		Δονήσεις δακτυλίου,
1007		Αρωματικές ομάδες
846		
816		
1607	-N=N-	Δονήσεις τάσης (stretching)
1200	-C-N-	
1266		
693	-C-S	
574		
816	C = CH	Δονήσεις τάσης (PVA)
846		
1753	C=O	Δονήσεις τάσης (PLA)
1088	C-O-C	Δόνηση εφελκυσμού (PLA)

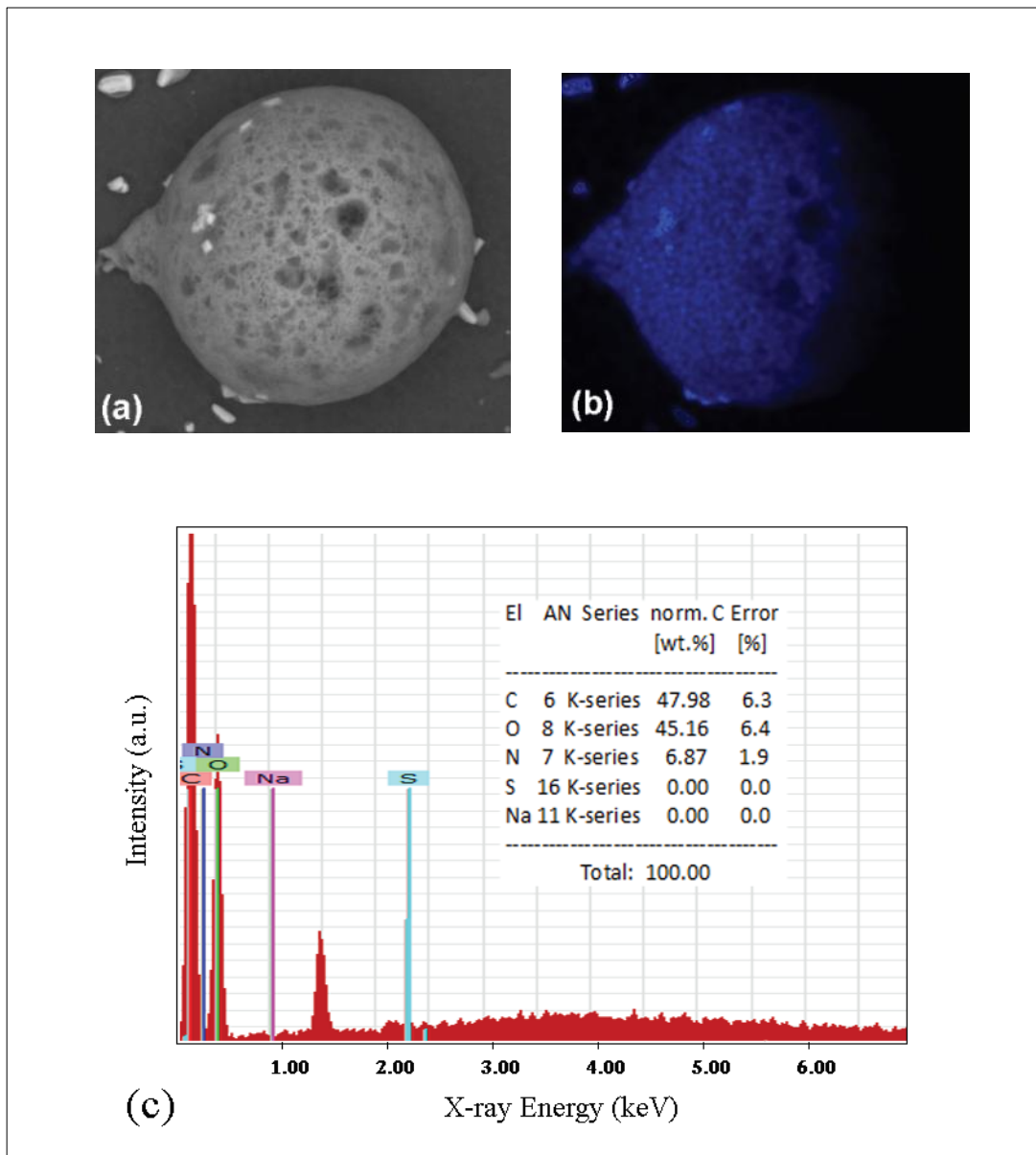
Πίνακας 8: Αντιστοίχιση κορυφών απορρόφησης και δεσμών, σύμφωνα με τη μέθοδο FTIR [40].



Εικόνες 23 : Συντακτικοί τύποι α) Vinyl alcohol, β) Lactic acid, γ) Methyl orange

2.3.3.3 Χαρακτηρισμός μικρο-σφαιριδίων με EDS.

Επιπλέον κρίθηκε απαραίτητο να διεξαχθεί ποιοτική και ποσοτική ανάλυση καθώς και χαρτογράφηση των παραγόμενων σφαιριδίων. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια φασματομέτρου ενεργειακής διασποράς ακτίνων Χ (EDS), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με το SEM. Η μικροανάλυση βασίστηκε στη συλλογή των ακτίνων Χ, που εκπέμπουν τα άτομα του δείγματος, όταν αποδιεγείρονται μετά από τον βομβαρδισμό τους, από στοχευμένη δέσμη ηλεκτρονίων. Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν, αφορούν στην επιβεβαίωση των χημικών στοιχείων των δειγμάτων, στον ποσοτικό τους προσδιορισμό, καθώς και στην κατανομή τους στην επιφάνεια του δείγματος. Στις εικόνες 24 παρακάτω, παρουσιάζονται α) η εικόνα SEM μικροσφαιριδίου PLA πληρωμένου με methyl orange, β) μαζί με την αντίστοιχη χαρτογράφηση EDS του αζώτου, το οποίο βρίσκεται στο methyl orange και γ) την ανάλυση EDS και ταυτοποίηση των στοιχείων.



Εικόνα 24: α) Εικόνα SEM, β)Στοιχειακή ανάλυση EDS αζώτου, χαρτογράφηση αζώτου, γ) Συνολική στοιχειακή ανάλυση EDS

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, η ανάλυση EDS επιβεβαιώνει ότι τα μικροσφαιρίδια αποτελούνται από άνθρακα και οξυγόνο εξαιτίας του PLA και του methyl orange. Επιπλέον, παρατηρείται η ύπαρξη N και S, στοιχεία που αποδίδονται μόνο στο methyl orange. Λαμβάνοντας υπόψη την χαρτογράφηση του EDS, μπορεί να παρατηρηθεί ότι το methyl orange έχει απορροφηθεί στη μικρο-σφαίρα λόγω του γεγονότος ότι η παρουσία στοιχείου N καλύπτει ολόκληρη τη μικρο-σφαίρα.

2.4 Μελέτη απελευθέρωσης δραστικής ουσίας

2.4.1 Δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων

Στην παρούσα εργασία, δημιουργήθηκαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα με pH ίσο με 5,4 και 7,4 με στόχο να προσομοιάσουν το pH του στομάχου και του αίματος, αντίστοιχα. Το pH του στομάχου δεν είναι σταθερό, αλλά εξαρτάται από το pH του γαστρικού οξέος, το οποίο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος των τροφών που βρίσκονται στο στομάχι, για αυτό χρησιμοποιήθηκε μια ενδεικτική τιμή pH 5,4. Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο διάλυσης του πολυμερούς όπως αναφέρεται αναλυτικά στη συνέχεια, και παρασκευάστηκαν ως εξής [44]:

Για τη δημιουργία των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, καθώς και απιονισμένο νερό.

Όνομασία	Χημικός τύπος	Καθαρότητα
Ένυδρο κιτρικό Οξύ	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	99,5%
Ένυδρο φωσφορικό Νάτριο	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	99%

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια ρυθμιστικών διαλυμάτων

Για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος με pH 7,4: ζυγίστηκαν 44,4975 gr φωσφορικού νατρίου και διαλύθηκαν, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου, σε 2,5 L απιονισμένου νερού (0,1M). Ζυγίστηκαν 6,3042 gr κιτρικού οξέος και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε 300 mL απιονισμένου νερού (0,1M). Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου, μετρήθηκε το pH του διαλύματος φωσφορικού νατρίου 9,35 και του κιτρικού οξέος 2,07. Στη συνέχεια, ποσότητες από τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν, με στόχο τη δημιουργία διαλύματος με pH 7,4. Στο διάλυμα φωσφορικού νατρίου προστέθηκαν στάγδην και υπό ανάδευση 250 ml διαλύματος κιτρικού οξέος, ενώ παράλληλα λαμβάνονταν μετρήσεις για το pH του **μίγματος**. Έτσι, δημιουργήθηκαν 2,550 mL ρυθμιστικού διαλύματος με pH 7,4, από

τα οποία 50 mL χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου – ορατού και 2,5 L χρησιμοποιήθηκαν στη συσκευή διαλυτοποίησης δισκίων.

Για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος με pH 5,4, ζυγίστηκαν 21,3580 gr φωσφορικού νατρίου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε 1,2 L απιονισμένου νερού (0,1M). Ζυγίστηκαν 18,9126 gr κιτρικού οξέος και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε 900 mL απιονισμένου νερού (0,1M). Ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία και 851 mL διαλύματος κιτρικού οξέος – νερού προστέθηκαν σε 1200 mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου, ώστε να δημιουργηθούν 2,05 L ρυθμιστικού διαλύματος με pH 5,4. Ομοίως με πριν, 50 mL διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου – ορατού και 2 L χρησιμοποιήθηκαν στη συσκευή διαλυτοποίησης δισκίων.

2.4.2 Βαθμονόμηση του UV

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η συγκέντρωση του methyl orange στα δείγματα ρυθμιστικών διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπέρυθρης – ορατής ακτινοβολίας UV-IR Jasco V-630. Για τη βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου δημιουργήθηκαν δέκα διαλύματα buffer – methyl orange με διαφορετικές συγκεντρώσεις (πέντε για κάθε pH), σύμφωνα με τον πίνακα 10 παρακάτω [45].

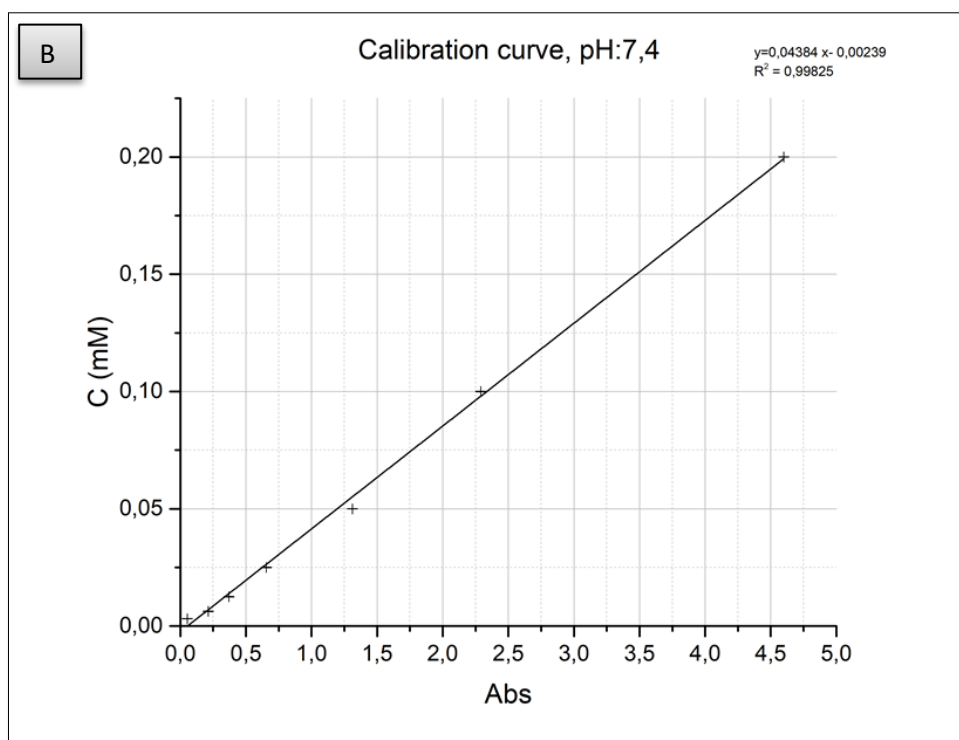
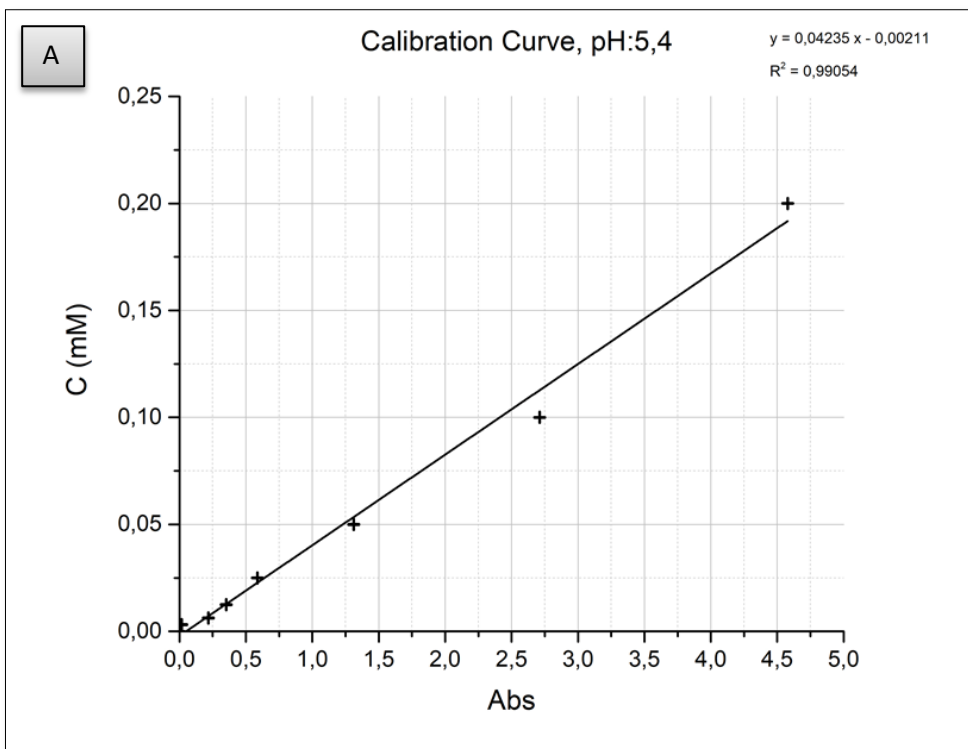
Η ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, επιλέχθηκε να ανήκει σε ένα συγκεκριμένο εύρος, από 350 nm έως 550 nm. Στην πράξη, η μέγιστη τιμή απορρόφησης του φωτός για το methyl orange αντιστοιχεί στα 463 nm, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [41]. Αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που απορροφάται από τα μόρια της ουσίας, τη συγκέντρωση της οποίας θέλουμε να μετρήσουμε

<i>Για pH 5,4</i>		<i>Για pH 7,4</i>	
Molarity (mM)	Abs (364nm)	Molarity (mM)	Abs (364nm)
0,2	3,74077	0,2	4,57790
0,1	2,29025	0,1	2,61156
0,05	1,31113	0,05	1,3115
0,025	0,655474	0,025	0,58599
0,0125	0,369098	0,0125	0,351023
0,00625	0,211852	0,00625	0,216999

Πίνακας 10: Δεδομένα δημιουργίας καμπύλης βαθμονόμησης ρυθμιστικών διαλυμάτων

Προστέθηκαν 0,005 gr methyl orange σε 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος και με διαδοχικές αραιώσεις, δημιουργήθηκαν οι παραπάνω συγκεντρώσεις (Molarities), του πίνακα 10. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα σαρωνόταν με ακτινοβολία σε μήκη κύματος από 350 μέχρι 550 nm και καταγραφόταν η τιμή της μέγιστης έντασης (στα 463 nm).

Από τις τιμές του πίνακα 10 παραπάνω, δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα βαθμονόμησης και με γραμμική παρεμβολή προέκυψαν οι γραμμικές εξισώσεις βαθμονόμησης για τα δύο pH, που στη συνέχεια θα μετατρέπουν τη μετρούμενη ένταση σε συγκέντρωση.



Διαγράμματα 5: :Καμπύλες βαθμονόμησης , A) pH 5,4 και B) pH 7,4

Από όπου παρατηρούμε ότι η καμπύλη βαθμονόμησης για το ρυθμιστικό διάλυμα με **pH 5,4** δίνει την εξίσωση βαθμονόμησης :

$$A) \quad y = 0,04235 x - 0,00211$$

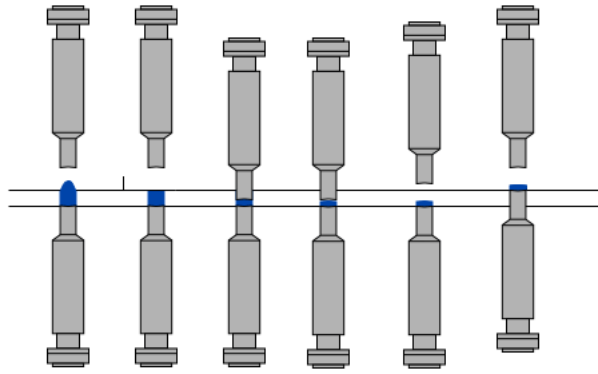
ενώ η καμπύλη βαθμονόμησης για το ρυθμιστικό διάλυμα με **pH 7,4** δίνει την εξίσωση βαθμονόμησης:

$$B) \quad y = 0,04384 x - 0,00239$$

2.4.3 Δημιουργία δισκίων

Το επόμενο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τη δημιουργία δισκίων, από το μικροδομημένο υλικό που ήταν σε μορφή σκόνης. Προκειμένου να συγκεντρωθεί κατάλληλη ποσότητα υλικού, επαναλήφθηκε πολλές φορές η βέλτιστη πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.1 , ώστε να συγκεντρωθούν 10 gr υλικού.

Προκειμένου η σκόνη που παράχθηκε να τροποποιηθεί σε καθορισμένο σχήμα, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή δισκιοποίησης MINIPRESS MII, 186. Έτσι, για τη δημιουργία κάθε δισκίου εισάγονταν $0,238 \pm 0,001$ gr του παραγόμενου υλικού στην κυλινδρική κοιλότητα της συσκευής, η οποία συνδέεται με δύο αντιδιαμετρικές δοκούς πίεσης, που συμπιέζαν τη σκόνη, δημιουργούσαν το δισκίο και ύστερα απομακρύνονταν.




Εικόνα 25 Διαδοχικά στιγμιότυπα της διαδικασίας δημιουργίας δισκίων

Προς πειραματική επιβεβαίωση, η μελέτη διαλυτοποίησης δισκίων – απελευθέρωσης methyl orange που ακολούθησε, επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε ένα από τα 2 είδη ρυθμιστικών διαλυμάτων, συνεπώς χρειάστηκε να δημιουργηθούν 6 δισκία προς μελέτη και 10 ακόμα ως δοκιμαστικά.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σκληρότητα του δισκίου -συνεπώς η δύναμη θραύσης, η μάζα καθώς και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του, επηρεάζουν την ταχύτητα διάλυσης του. Επομένως ήταν απαραίτητο, και τα 6 δισκία να έχουν πανομοιότυπες τιμές στα παραπάνω χαρακτηριστικά. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι οι βιβλιογραφικές τιμές για τη δύναμη θραύσης των δισκίων δίνεται στα 80N με 100N για βραδεία αποδέσμευση [32]. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάστηκε να δημιουργηθούν δοκιμαστικά δισκία, τα οποία μέσω της συσκευή μέτρησης σκληρότητας δισκίων έσπαγαν με αυτόματη ένδειξη της δύναμης θραύσης. Με κατάλληλες μεταβολές της μάζας του υλικού προς δισκιοποίηση, αλλά με σταθερή τελική απόσταση των δοκών πίεσης, προσδιορίστηκε η κατάλληλη ποσότητα υλικού που δημιουργεί δισκία με δύναμη θραύσης στα 90N. Έτσι ήταν δυνατό να καθοριστεί η σχέση μάζας - γεωμετρικών χαρακτηριστικών - δύναμης θραύσης, δεδομένα τα οποία επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για τη παρασκευή των τελικών 6 δισκίων

Τα ακριβή χαρακτηριστικά των δισκίων που δημιουργήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Shape	Diameter (cm)	Height (mm)	Weight (gr)	Breaking force (N)
 Flat-faced plain	1.10 ± 0.01	3.00 ± 0.01	0.238 ± 0.001	90 ± 10

Πίνακας 11 : Χαρακτηριστικά παραγόμενων δισκίων

Τέλος, τα 6 δισκία που προορίζονταν για μελέτη της αποδόμησης τους και συνεπώς αποδέσμευσης του methyl orange, αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη (στους -20°C) για 1 ημέρα, έως ότου ρυθμιστούν κατάλληλα οι συνθήκες διαλυτοποίησης.



Εικόνα 26: Φωτογραφία παραγόμενου δισκίου, μετά τη θραύση του

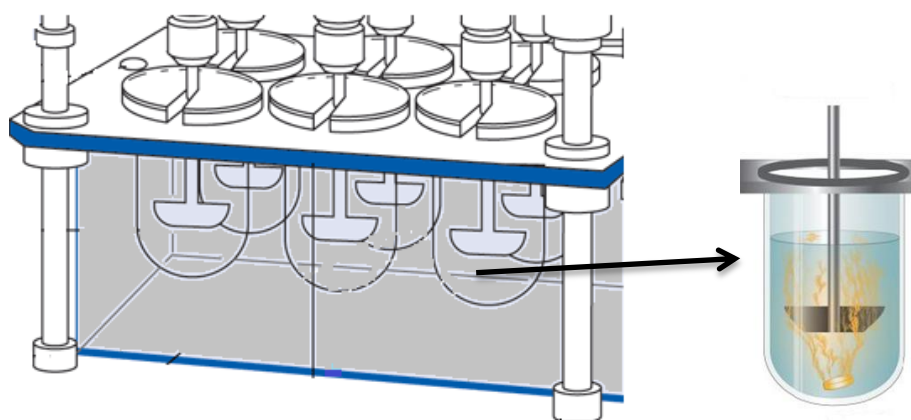
2.4.4 Συνθήκες διαλυτοποίησης δισκίων

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή διαλυτοποίησης δισκίων Semi- Automated Dissolution Test Instrument PT-DT70 της PHARMA TEST. Η συγκεκριμένη συσκευή περιλαμβάνει επτά δοχεία μέσα στα οποία γίνεται η διαλυτοποίηση, έξι από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Οι συνθήκες διαλυτοποίησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

<i>Δοχείο</i>	<i>Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (ml)</i>	<i>Θερμοκρασία ρυθμιστικού διαλύματος (±0.5 °C)</i>	<i>Συχνότητα περιστροφής έλικα (rpm)</i>	<i>pH ρυθμιστικού διαλύματος (±0.1)</i>
1	500	37.0	20	5.4
2	500	37.0	20	5.4
3	500	37.0	20	5.4
4	500	37.0	20	7.4
5	500	37.0	20	7.4
6	500	37.0	20	7.4

Πίνακας12: Τιμές παραμέτρων διαλυτοποίησης

Όταν ρυθμίστηκαν οι παραπάνω συνθήκες και οι χρόνοι δειγματοληψίας της πρώτης ημέρας, τα δισκία εισήχθησαν στα δοχεία και άρχισε η διαλυτοποίηση τους. Σε καθορισμένους χρόνους, μία ποσότητα 5 ml δείγματος λαμβανόταν αυτόματα μέσω αντλίας, τοποθετούνταν σε δειγματοληπτικά γυάλινα φιαλίδια, εξετάζονταν στο UV και στη συνέχεια επιστρέφονταν στο δοχείο πριν την επόμενη δειγματοληψία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός ανάδευσης ήταν ήπιος, προκειμένου να μην επηρεάσει το ρυθμό διαλυτοποίησης, αλλά και να ομογενοποιήσει το διάλυμα.

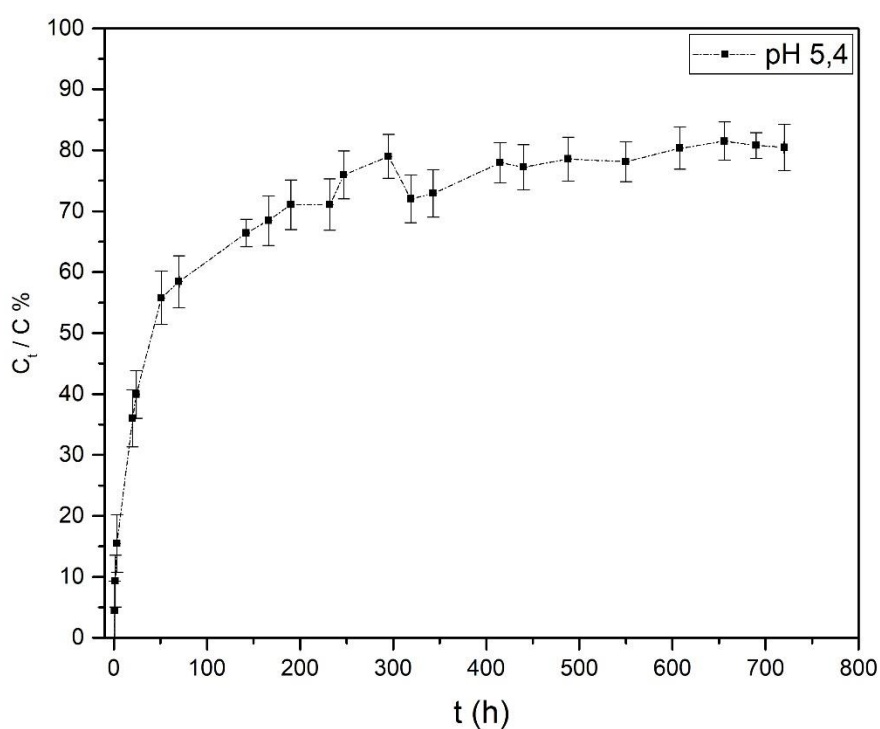


Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της συσκευής διαλυτοποίησης δισκίων [43].

2.4.5 Διαγράμματα απελευθέρωσης δραστικής ουσίας

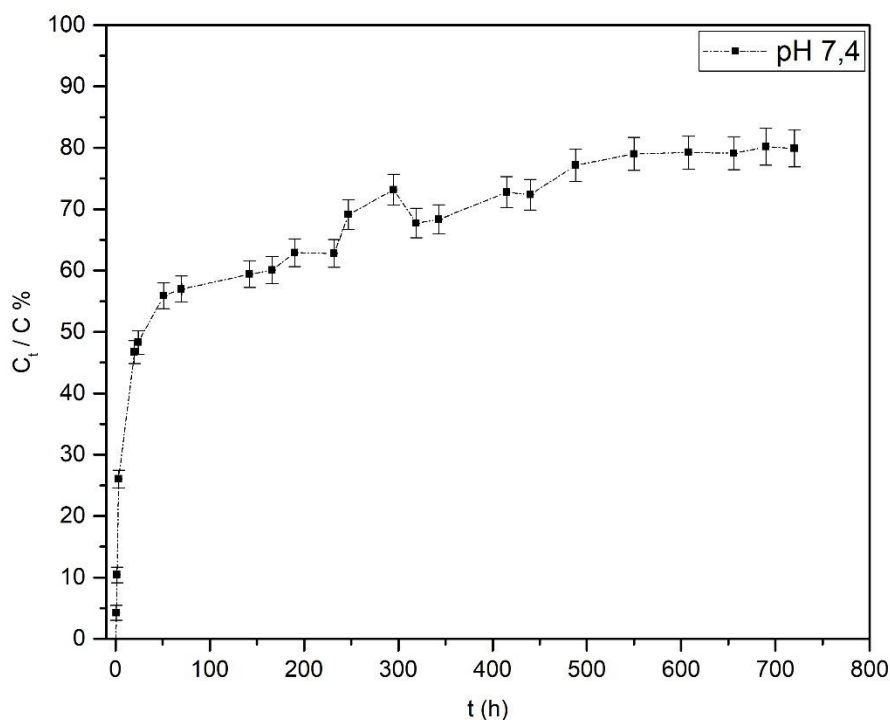
Η μελέτη απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε για διάστημα 30 ημερών. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών, λαμβάνονταν δείγματα σε χρονικά διαστήματα, που φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα απελευθέρωσης.

Για το ρυθμιστικό διάλυμα που προσομοιάζει το pH του στομάχου (5,4), λήφθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα απελευθέρωσης methyl orange από πολυμερικές μικρόσφαιρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5,4.

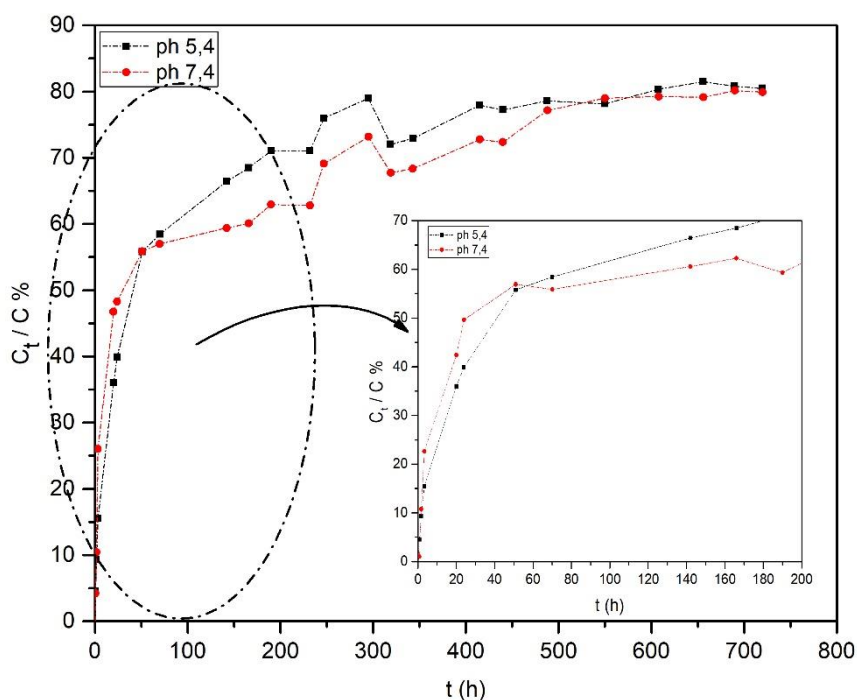
Για το ρυθμιστικό διάλυμα που προσομοιάζει το pH του αίματος (7,4), λήφθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα απελευθέρωσης methyl orange από πολυμερικές μικρόσφαιρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,4.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται παρόμοιο προφίλ απελευθέρωσης, στο οποίο διακρίνονται διαφορετικές φάσεις αποδέσμευσης. Αρχικά, για χρόνους από 0 μέχρι περίπου 50 ώρες παρατηρείται μια ‘στιγμαία’ αποδέσμευση (burst release), η οποία πιθανώς οφείλεται στην ταχεία απελευθέρωση μορίων δραστικής ουσίας που βρίσκονται κοντά στη διεπιφάνεια πολυμερούς ρυθμιστικού διαλύματος [16]. Η δεύτερη φάση της απελευθέρωσης φαίνεται να ξεκινάει περίπου 50 ώρες μετά και να παρουσιάζει έναν πιο σταθερό ρυθμό. Στη φάση αυτή, πιθανώς έχει αρχίσει η διάχυση της δραστικής ουσίας μέσω πόρων του πολυμερούς, η οποία συνοδεύεται με ταυτόχρονη υδρόλυση του πολυμερούς [7]. Τελικά ο ρυθμός αποδέσμευσης παρουσιάζει πολύ μικρές διακυμάνσεις μετά από 400h (16 ημέρες).

Προκειμένου να εξεταστεί εάν το pH του μέσου διάλυσης παίζει κάποιο ρόλο στη διάχυση της δραστικής ουσίας από το πολυμερές, συγκρίθηκαν τα διαγράμματα απελευθέρωσης για τα δύο pH. Ακολουθεί το διάγραμμα σύγκρισης των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων, καθώς και μία μεγέθυνση του, που αφορά τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στους υπολογισμούς.



Διάγραμμα9 : Συγκριτικό διάγραμμα απελευθέρωσης methyl orange από πολυμερικές μικρόσφαιρες, σε ρυθμιστικά διαλύματα με pH 5,4 και 7,4.

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ένας κοινός ρυθμός μεταβολής κατά τη διάρκεια του φαινομένου 'burst release', ενώ διαφοροποιείται σημαντικά στη συνέχεια, μέχρι περίπου τις 500h (20 ημέρες).

Ακολουθεί ο υπολογισμός της κλίσης διαγραμμάτων από 45h έως 160h, ώστε να προσδιοριστεί και να συγκριθεί ο ρυθμός απελευθέρωσης για τα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

pH 5,4

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\Delta(\frac{Ct}{C} \%)}{\Delta t} = \frac{67 - 56}{160 - 45} = 0,0956 \text{ 1/h}$$

pH 7,4

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\Delta(\frac{Ct}{C} \%)}{\Delta t} = \frac{59 - 56}{160 - 45} = 0,0260 \text{ 1/h}$$

Συνεπώς παρατηρείται ότι στο περιβάλλον προσομοίωσης του pH του στομάχου, ο ρυθμός απελευθέρωσης για συγκεκριμένο διάστημα είναι $0,0956 \text{ h}^{-1}$, ενώ στο περιβάλλον προσομοίωσης του pH του αίματος είναι $0,0260 \text{ h}^{-1}$, ποσό σημαντικά μικρότερο. Οδηγούμαστε, λοιπόν, στο συμπέρασμα πως το pH του μέσου διαλυτοποίησης παίζει σημαντικό ρόλο στο προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, το όξινο pH του μέσου διαλυτοποίησης, επιταχύνει τη διαδικασία απελευθέρωσης της ενθυλακωμένης ουσίας [44].

2.4.6 Μοντελοποίηση κινητικής απελευθέρωσης δραστικής ουσίας

Οι κλασικές εξισώσεις που περιγράφουν την απελευθέρωση ενός φαρμάκου από το πολυμερές, όπως η εξίσωση Korsmeyer-Peppas [20] που περιγράφεται στη θεωρία, μπορούν να εφαρμοστούν για να περιγράψουν το μοντέλο της απελευθέρωσης του methyl orange από τα μικρο-σφαιρίδια, συντεθειμένα σε μορφή δισκίου. Με διαδοχικούς υπολογισμούς έχουμε:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \alpha t^n \Rightarrow$$

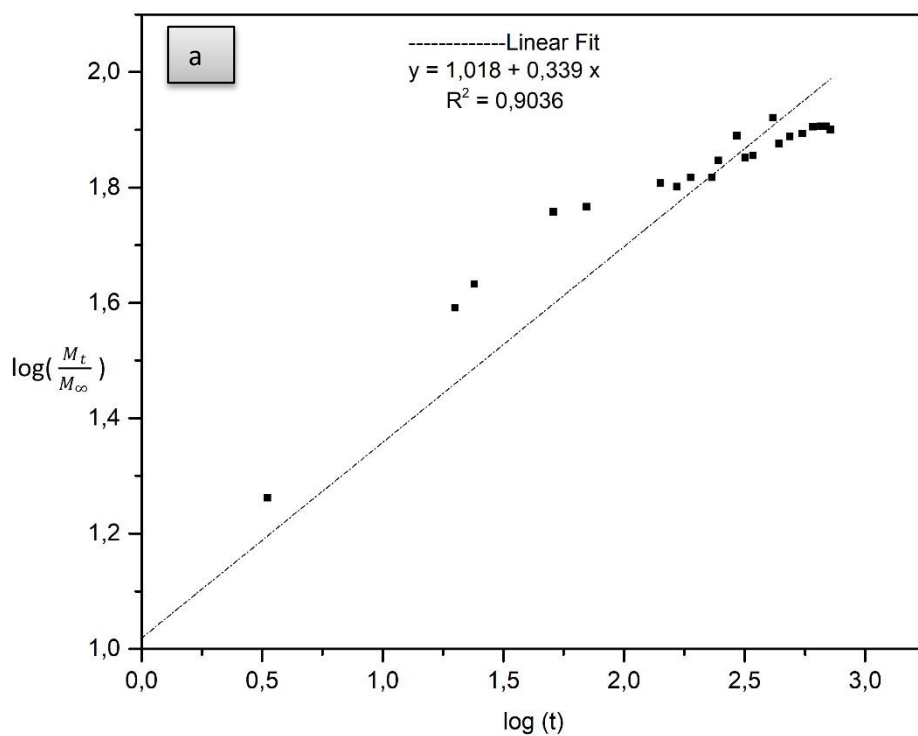
$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log(\alpha) * \log(t^n) = \log(\alpha) + n \log(t)$$

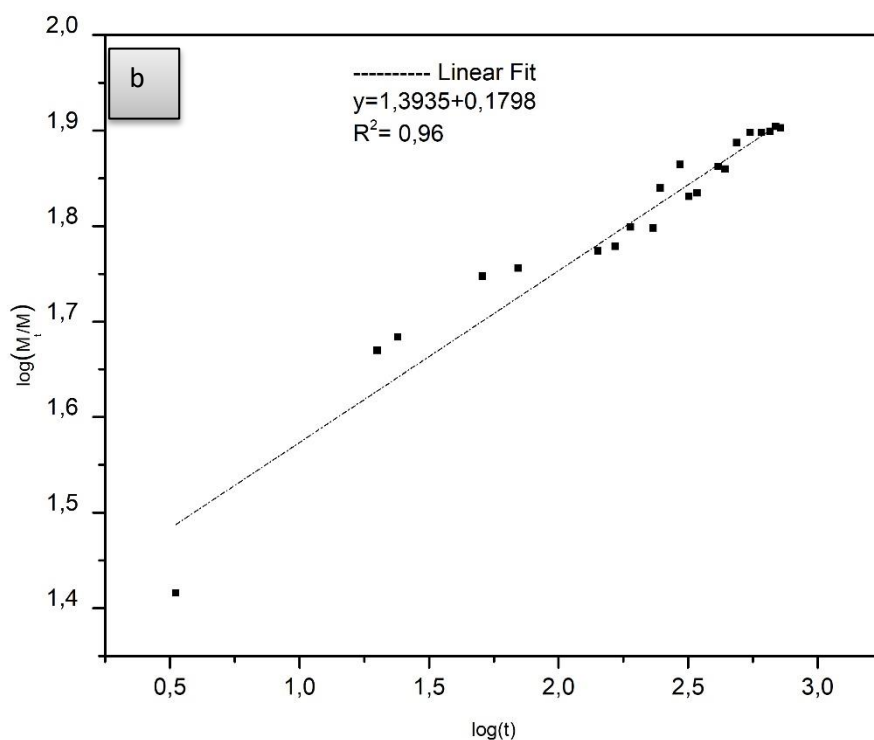
άρα για $c = \ln(\alpha)$, έχουμε

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = c + n \log(t)$$

Για τη δημιουργία του παρακάτω διαγράμματος χρησιμοποιούνται δεδομένα από την απελευθέρωση methyl orange σε ρυθμιστικό διάλυμα προσομοίωσης του pH του στομάχου.

Μοντέλο προσομοίωσης	Γραμμική εξίσωση	Διάγραμμα	
		x άξονας	γ άξονας
Korsmeyer - Peppas	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = c + n \log(t)$	Log (t)	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right)$





Διαγράμματα 10 : Γραμμική παρεμβολή πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Korsmeyer – Peppas, a) pH 5,4 b) pH 7,4

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως το μοντέλο Korsmeyer-Peppas επιβεβαιώνεται από τα δεδομένα απελευθέρωσης του methyl orange από τα μικροσφαιρίδια, σε pH με τιμές 5,4 και 7,4 συντεθειμένα σε μορφή δισκίου.

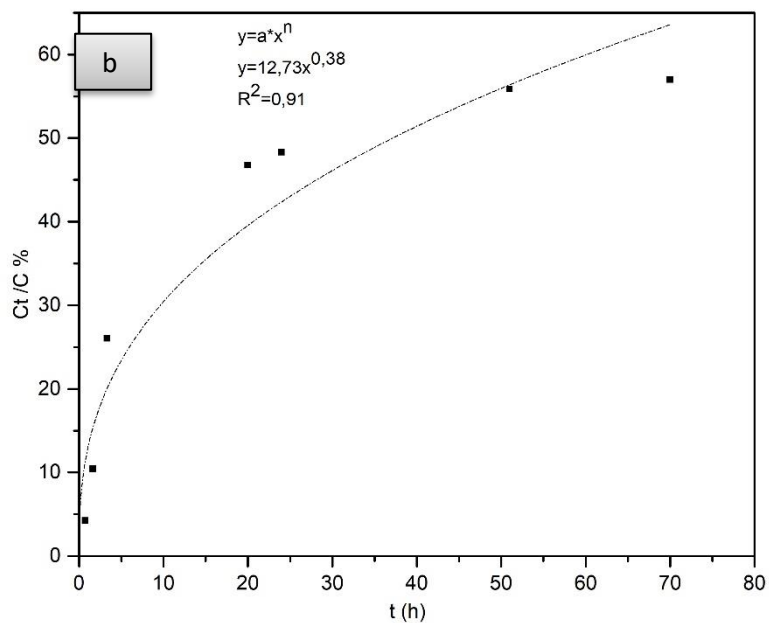
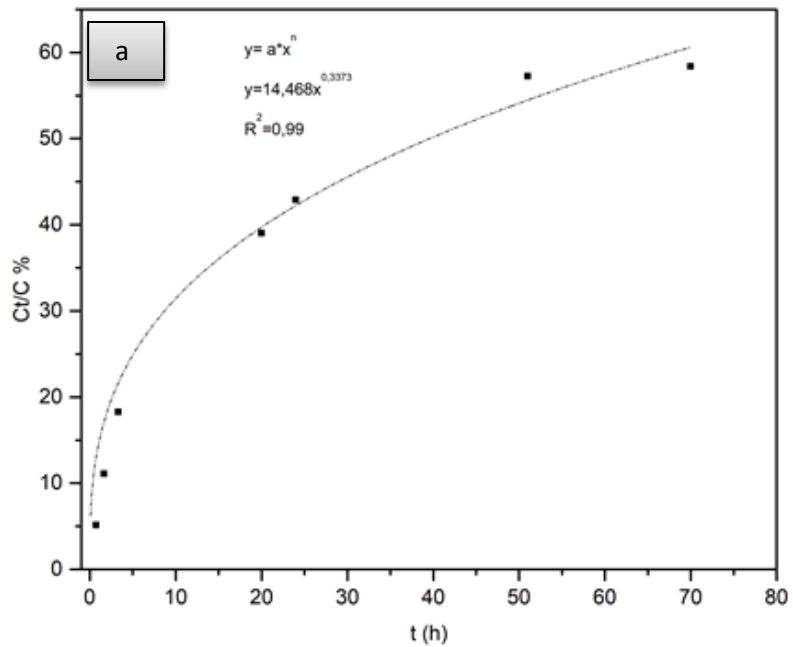
2.4.7 Υπολογισμός εκθέτη της απελευθέρωσης (n)

Ο εκθέτης απελευθέρωσης (n), του μοντέλου Korsmeyer-Peppas,

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \alpha t^n$$

υποδεικνύει τον μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου και για να προσδιοριστεί χρησιμοποιούνται όσα στοιχεία των διαγραμμάτων 7 και 8, ικανοποιούν τη συνθήκη $\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6$ [20]. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα κανονικοποιημένα δεδομένα απελευθέρωσης σε συνδυασμό με την εξίσωση που τα περιγράφει. Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης απελευθέρωσης, του μοντέλου

και του παρακάτω διαγράμματος προκύπτει για τον εκθέτη απελευθέρωσης, ότι $n=0,34$ για το pH 5,4 και $n= 0,38$ για το pH 7,4.



Διάγραμμα11.: Εκθετική προσέγγιση δεδομένων αποδέσμευσης, υπολογισμός εκθέτη απελευθέρωσης (n), για α) pH 5,4 και β) pH 7,4.

Τα αντίστοιχα διαγράμματα, για την απελευθέρωση του methyl orange από τα υπόλοιπα 4 δισκία, βρίσκονται στο παράρτημα.

2.5 Σύνοψη και συμπεράσματα

2.5.1 Σύνοψη και συμπεράσματα μελέτης σύνθεσης μικρο-σφαιριδίων

Αρχικός στόχος των πειραμάτων ήταν να δημιουργηθούν σφαιρικές μικροδομές από PLA, μέσα στις οποίες βρίσκεται ενθυλακωμένη η ουσία methyl orange, με τη μέθοδο του διπλού γαλακτώματος (W/O/W). Στη συνέχεια το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη μείωση τόσο της διασποράς του μεγέθους των σφαιριδίων, όσο και της διαμέτρου τους. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν: 1) το εύρος ισχύος των υπερήχων που χρησιμοποιούνται στο στάδιο της γαλακτωματοποίησης, 2) ο χρόνος έκθεσης σε υπέρηχους, και τέλος 3) η επίδραση της ποσότητας της επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA). Οι βέλτιστες τιμές που προέκυψαν έπειτα από την επεξεργασία των δεδομένων, είναι $P=220\text{ W}$, $t=35\text{ sec}$, $M_{pva}=2,0\text{ gr}$ αντίστοιχα. Προσδιορίστηκαν, λοιπόν, οι τιμές των τριών μεγεθών που επηρεάζουν το μέγεθος των σωματιδίων και κάθε τιμή που επιλεγόταν, χρησιμοποιούνταν στους επόμενους κύκλους πειραμάτων, με στόχο την επιλογή της επόμενης, με τη παραδοχή ότι η τιμή της κάθε μιας δεν επηρέαζε τις υπόλοιπες.

Ακόμα, προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τον μηχανισμό δημιουργίας των σφαιριδίων. Σύμφωνα με αυτά, αρχικά δημιουργούνται μεγάλες σφαίρες, από τη διάσπαση των οποίων προκύπτουν μικρότερες. Ταυτόχρονα, επιφανειοδραστική ένωση καλύπτει την επιφάνεια των σφαιριδίων, αποτρέποντας την επανασύνδεση τους [34]. Συνεπώς, μικρά ποσά ισχύος ή μικρά χρονικά διαστήματα έκθεσης, δεν επαρκούν για την ανάμιξη των φάσεων και τη δημιουργία σφαιριδίων, ενώ μεγάλα ποσά, αν και αρχικά είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία μικρών σφαιρών, στη συνέχεια τις καταστρέφουν. Από τη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση τόσο του μεγέθους της διαμέτρου όσο και της κατανομής τους. Η τάξη

μεγέθους των περισσότερων σφαιριδίων έπεσε από 10-20 μm στα 1-5 μm , με παράλληλη δημιουργία σφαιριδίων στην κλίμακα των νανομέτρων.

Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι σύμφωνα με τη βέλτιστη διαδικασία σύνθεσης, δεν υπάρχουν σφαιρίδια διαμέτρου μεγαλύτερης των 15 μm . Το μεγαλύτερο ποσοστό των σφαιριδίων βρίσκεται ανάμεσα στα 1-5 μm , και υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό σφαιριδίων στη κατηγορία των <1 μm .

Όσον αφορά στον χαρακτηρισμό των μικρο - σφαιριδίων με FTIR, παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στη φασματική περιοχή από τα 574 cm^{-1} έως τα 1700 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στην ύπαρξη methyl orange, ενώ παράλληλα παρατηρούνται κορυφές που αναφέρονται στην ύπαρξη δεσμών που αντιστοιχούν στο PVA και το PLA.

Τέλος, η ανάλυση με EDS επιβεβαιώνει ότι τα μικροσφαιρίδια αποτελούνται από άνθρακα και οξυγόνο εξαιτίας του PLA και του methyl orange. Παρατηρώντας τη χαρτογράφηση του EDS, μπορεί να παρατηρηθεί ότι το methyl orange έχει απορροφηθεί στη μικρο-σφαίρα λόγω του γεγονότος ότι η παρουσία στοιχείου N καλύπτει ολόκληρη τη μικρό-σφαίρα

2.5.2 Σύνοψη και συμπεράσματα μελέτης απελευθέρωσης

Το παραγόμενο υλικό μορφοποιήθηκε κατάλληλα, σε σχήμα δισκίων και αφού δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα -μέσα στα οποία έλαβε χώρα η διαλυτοποίηση- μελετήθηκε το προφίλ αποδέσμευσης.

Στα διαγράμματα απελευθέρωσης, παρατηρήθηκε παρόμοιο προφίλ το οποίο αποτελείται μια 'στιγμιαία' αποδέσμευση (burst release), ακολουθούμενη από απελευθέρωση που παρουσιάζει έναν πιο σταθερό ρυθμό. Στη φάση αυτή, πιθανώς έχει αρχίσει η διάχυση της δραστικής ουσίας μέσω πόρων του πολυμερούς, η οποία συνοδεύεται με ταυτόχρονη υδρόλυση του πολυμερούς. Τελικά ο ρυθμός αποδέσμευσης σταθεροποιείται μετά από 16 ημέρες.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στο περιβάλλον προσομοίωσης του pH του στομάχου, ο ρυθμός απελευθέρωσης ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ρυθμό στο περιβάλλον προσομοίωσης του pH του αίματος. Συνεπώς το pH του μέσου

διαλυτοποίησης παίζει σημαντικό ρόλο στο προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, για την περιγραφή του ρυθμού απελευθέρωσης, το οποίο υπέδειξε την απελευθέρωση του methyl orange από τα μικρο-σφαιρίδια, σε pH 5,4 και 7,4 συντεθειμένα σε μορφή δισκίου.

Τέλος, υπολογίστηκε ο εκθέτης της απελευθέρωσης (n), ο οποίος υποδεικνύει τον κύριο μηχανισμό απελευθέρωσης. Όπως προέκυψε, και για τα δύο ρυθμιστικά διαλύματα, εφόσον $n < 0,5$ ο κύριος μηχανισμός είναι απελευθέρωση με διάχυση (Fickian release), που είναι εν γένει ο μηχανισμός απελευθέρωσης φαρμάκου από αλειφατικούς πολυεστέρες [6].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μελέτη απελευθέρωσης επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε ρυθμιστικό διάλυμα, προς επιβεβαίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

2.6 Μελλοντική Έρευνα

Η παρούσα εργασία θα μπορούσε να επεκταθεί προς την κατεύθυνση ποσοτικοποίησης και αύξησης της δραστικής ουσίας που εγκλείεται στις πολυμερικές μικρόσφαιρες. Είναι σημαντικό να αυξηθεί το ποσοστό ενθυλάκωσης της δραστικής ουσίας, ώστε να αξιοποιηθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου.

Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί κάποια φαρμακευτική ουσία αντί του methyl orange, καθώς οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκου – πολυμερούς μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά το προφίλ απελευθέρωσης [7].

Ακόμα, θα ήταν χρήσιμο να υπάρξει περαιτέρω μείωση του μεγέθους των παραγόμενων σφαιριδίων στη κλίμακα των νανομέτρων, ώστε να αξιοποιηθούν ακόμα περισσότερο οι ιδιότητες των φορέων [40].

Μια πληρέστερη μελέτη θα ήταν καλό να περιελάμβανε την εξέταση αποδέσμευσης του φαρμάκου σε ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές. Είναι σημαντικό, ο ρυθμός αποδέσμευσης να

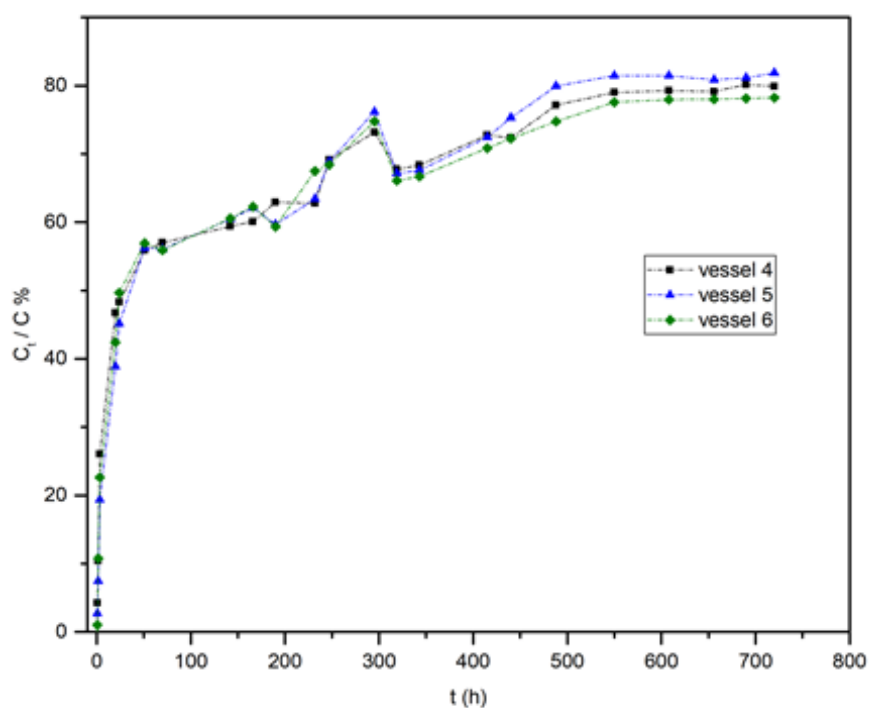
μελετηθεί τόσο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας όσο και στο εσωτερικό των ίδιων των κυττάρων [13].

Τέλος, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον, εάν το παραγόμενο υλικό μπορούσε να τροποποιηθεί ως 'νήμα' για τη τροφοδοσία τρισδιάστατου εκτυπωτή, από τον οποίο θα προέκυπταν εξατομικευμένα δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

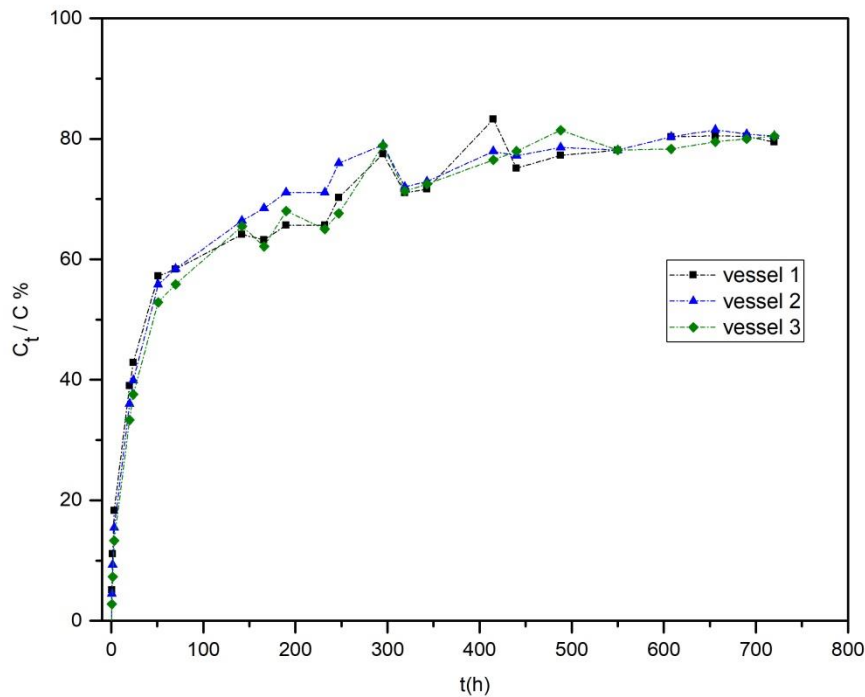
2.7 Παράρτημα

1. Επιπλέον διαγράμματα απελευθέρωσης

Προκειμένου να εξεταστεί εάν τα αποτελέσματα της μελέτης απελευθέρωσης που παρουσιάστηκαν, είναι επαναλήψιμα, η μελέτη έγινε ακόμα δύο φορές. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα απελευθέρωσης σε ένα κοινό διάγραμμα.



Διάγραμμα απελευθέρωσης methyl orange από πολυμερικές μικρόσφαιρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5,4.



Διάγραμμα απελευθέρωσης methyl orange από πολυμερικές μικρόσφαιρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,4.

2. Αρχικά πειράματα με χρήση λουτρού υπερήχων

Η παρακάτω περιγραφή αφορά προγενέστερες πειραματικές διαδικασίες, όπου γινόταν χρήση λουτρού υπερήχων αντί του probe.

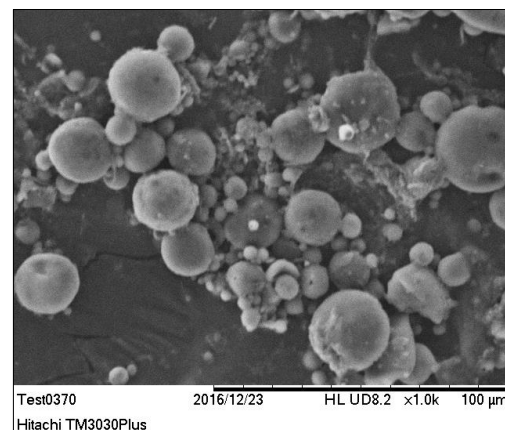
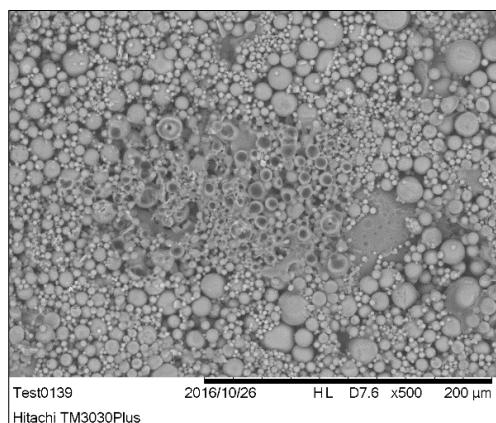
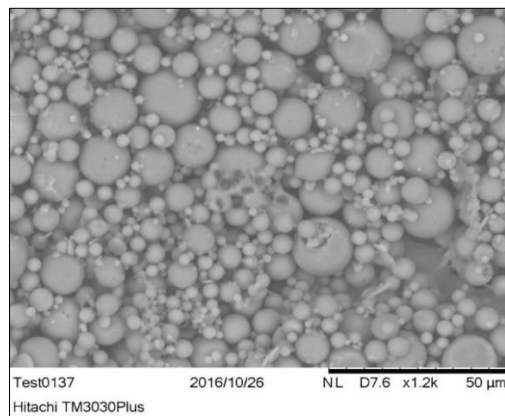
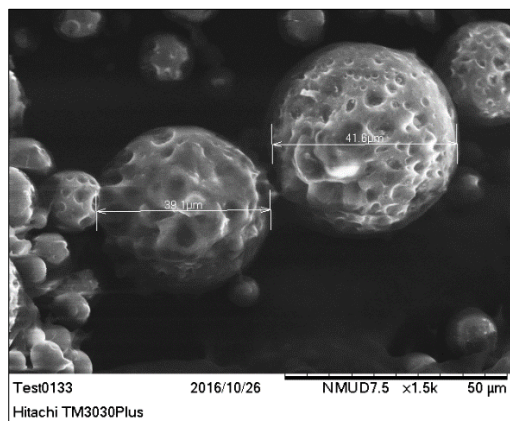
1) 50 mg methyl orange προστέθηκαν σε 1ml νερού και αναδεύτηκαν έως τη πλήρη διάλυση

2) 0,1 mg PLA διαλύθηκαν σε 1 mL διχλωρομεθανίου

3) 0,2 gr PVA προστέθηκαν σε 20ml νερού και ανεδεύτηκαν μέχρι την πλήρη διάλυση

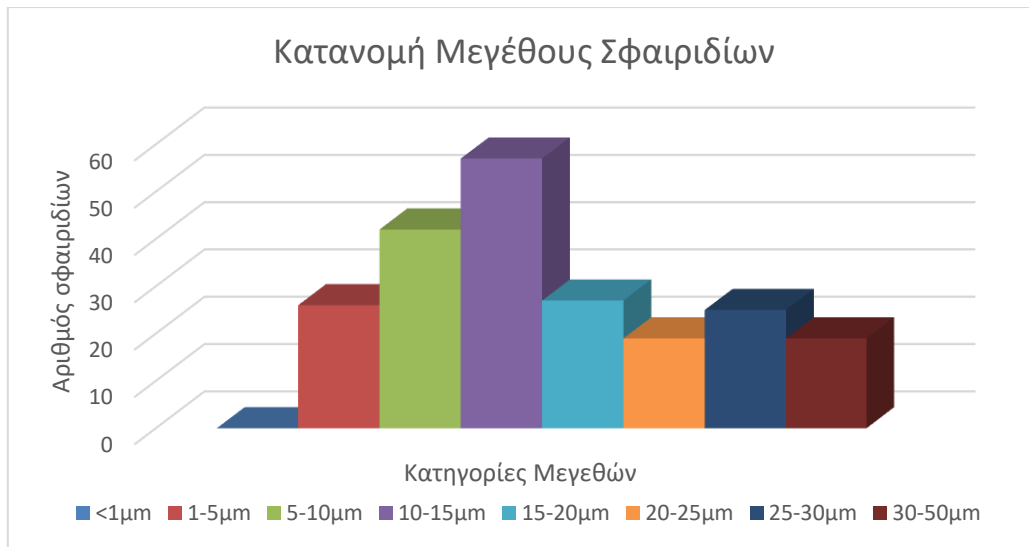
Το τελικό διάλυμα εκτέθηκε σε υπερήχους για 60sec , με ενδιάμεση παύση 15sec ώστε να μην αφεθεί να ανέβει η θερμοκρασία του. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για 5 ώρες, ώστε να εξατμιστεί το διχλωρομεθάνιο και συνεπώς να αποκτήσουν τα σφαιρίδια μια σταθερή δομή. Τέλος ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος και έκπλυση των σφαιριδίων με νερό. Το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για 5 ημέρες και

ακολούθησε η λήψη εικόνων από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές χαρακτηριστικές εικόνες δειγμάτων.



Εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σύμφωνα με τη πρώτη σειρά πειραμάτων

Από τις εικόνες του SEM, παρατηρείται ότι έχουν δημιουργηθεί σφαιρικές δομές της τάξης των μm , ενώ παράλληλα παρατηρείται ότι υπάρχουν περιοχές στην επιφάνεια του δείγματος που είναι άμορφες. Ακολουθεί η ανάλυση και ποσοτικοποίηση της διαμέτρου των σφαιριδίων.



Διάγραμμα 1: Κατανομή μεγέθους σφαιριδίων, σύμφωνα με τη πρώτη σειρά πειραμάτων

Πιο συγκεκριμένα μετρήθηκε η διάμετρος 200 σωματιδίων από 5 περιοχές δύο δειγμάτων και παρατηρήθηκε ότι η διάμετρος των περισσότερων σφαιριδίων είναι από 10μm μέχρι 15μm.

- Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία σφαιριδίων, τα οποία ανήκουν σε κατηγορίες μεγεθών 20-50μm, επομένως ευρεία κατανομή.
- Δεν έχουν δημιουργηθεί σφαιρίδια με διάμετρο μικρότερη του 1μm.

3. Διάδοση σφαλμάτων

Στη παρούσα εργασία, η άμεση μέτρηση κάποιων μεγεθών χρησιμεύει στον έμμεσο υπολογισμό κάποιων άλλων μεγεθών με τη χρήση γνωστών τύπων [47]. Τα σφάλματα των δεύτερων μεγεθών υπολογίζονται μέσω του γενικού τύπου διάδοσης σφαλμάτων

$$\delta\lambda = \sqrt{\left(\frac{\partial\lambda}{\partial x}\delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial\lambda}{\partial y}\delta y\right)^2 + \left(\frac{\partial\lambda}{\partial z}\delta z\right)^2 + \dots}$$

Όπου δλ είναι το σφάλμα της ποσότητας λ, η οποία εξαρτάται από τις παραμέτρους x,y,z,... των οποίων τα αντίστοιχα σφάλματα είναι δx, δy, δz,...

Μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων

Στις περιπτώσεις που χρειάστηκε να προσαρμοστεί η καλύτερη δυνατή καμπύλη (fitting) σε δεδομένα διαγραμμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μαθηματικές μέθοδοι από το πρόγραμμα επεξεργασίας. Στην περίπτωση της ευθείας ή αναμενόμενη μορφή είναι $y=A+Bx$, όπου

$$A = \frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 \sum_{i=1}^N y_i - \sum_{i=1}^N x_i \sum_{i=1}^N x_i y_i}{D}, \quad B = \frac{N \sum_{i=1}^N x_i y_i - \sum_{i=1}^N x_i \sum_{i=1}^N y_i}{D}, \quad D = N \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2$$

N: αριθμός μετρήσεων με αποτελέσματα x_i και y_i με σφάλματα δx και δy αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα σφάλματα υπολογίστηκαν από

$$\delta A = \sigma_y \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{D}}, \quad \delta B = \sigma_y \sqrt{\frac{N}{D}}, \quad \sigma_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - A - Bx_i)^2}{N-2}}$$

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Nathaniel Huebsch and David J. Mooney, Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature*, 462-7272: 426–432, (2009).
2. Joel R. Fried, *Polymer Science and Technology*, 3rd Edition, Prentice Hall, (2014).
3. Lakshmi S. Naira, Cato T. Laurencina, Biodegradable polymers as biomaterials, *Science Direct* 762–798, (2007).
4. D.R.Paula, L.M.Robeson, Polymer nanotechnology: Nanocomposites, *Polymer*, 49, 15: 3187-3204, (2008).
5. J.S. Benson and J.W. Boretos, Biomaterials and the Future of Medical Devices. *Med. Device Diag. Ind.*, Vol 17,p. 32–37, (1995).
6. Tim Leaver et al. Nanoparticles - A Revolution in the Development of Drug Delivery Vehicles, *Drug development and delivery*, 456-458, (2017).
7. Nazila Kamaly, Basit Yameen, Jun Wu and Omid C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, *Chem. Rev.* 116, 2602–2663, (2016).
8. Vladimir P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 1532–1555, (2006).
9. Kevin J. Whittlesey, Lonnie D. She, Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience / biomaterial interface. *a, Experimental Neurology* 190 1–16, (2004).
10. Jayanth Panyama, Vinod Labhasetwara, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue., *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 329-347, (2003).
11. Kwangjae Cho, et al., Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Res* 14-5 1310-1316, (2008).
12. , P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan & D. D. Allen, Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28:1, 1-13, (2002).
13. Melis Çağdaş, Mikyung Shin, Ali Demir Sezer and Seyda Bucak, Dopamine-Loaded Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Microspheres: New Strategy for Encapsulating Small Hydrophilic Drugs with High Efficiency, *Biotechnology Progress* (2014).
14. R Dinarvand et al., Polylactide-co-glycolide Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Agents, *International Journal of Nanomedicine* 2011-6:877-895, (2017).

15. Tarek M. Fahmy, Robert M. Samstein, Casey C. Harness, W. Mark Saltzman, Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting, *Biomaterials* 26, 5727–5736, (2005).
16. Xiao Huang, Christopher S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 73, 121–136, (2001).
17. Dean S.T. Hsieh, William D. Rhine and Robert Langer, Zero-Order Controlled-Release Polymer Matrices for Micro- and Macromolecules, *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 72-1 (1983).
18. S. Freiberg, X.X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release, *International Journal of Pharmaceutics* 282, 1–18, (2004).
19. J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 364, 328–343, (2008).
20. Paulo Costa, Jose´ Manuel Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 123–133, (2001).
21. C. Goubault, K. Pays, D. Olea, J. Bibette, V. Schmitt, and F. Leal-Calderon: “Shear Rupturing of Complex Fluids: Application to the Preparation of Quasi-Monodisperse W/O/W Double Emulsions.” *Langmuir* 17, 5184 (2001).
22. L. Avérous, *Poly(lactic Acid): Synthesis, Properties and Applications, Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (2008).
23. Bhuvanesh Gupta, Nilesh Revagadea, Jons Hilborn, Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Prog. Polym. Sci.* 32, 455–482, (2007).
24. Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang and Mario Gauthier, Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications, *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), InTech (2012).
25. Christian Wischke, Steven P. Schwendeman, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 364:298–327, (2008).
26. Reza Riahi, Ali Tamayol, Seyed Ali Mousavi Shaegh, Amir M Ghaemmaghami, Mehmet R Dokmeci and Ali Khademhossein, Microfluidics for advanced drug delivery systems, *ScienceDirect*, 7:101–112, (2015).
27. A.T. Florence and D. Whitehill, The Formulation and Stability of Multiple Emulsions, *Int.J.Pharm.* 11, 277, (1982).

28. K. Pays, F. Leal Calderon, and J. Bibette, Method to Produce a Monodisperse Double Emulsion, *Emulsion Science* p.173-199 (2000).
29. Dayanad C. Kalyani, Amar A. Telke, Sanjay P. Govindwar, Jyoti P. Jadhav, Biodegradation and Detoxification of Reactive Textile Dye by Isolated Pseudomonas, *Water Environment Research*, 81, 3, (2009).
30. S. Matsumoto and M. Kohda, The Viscosity of W/O/W Emulsions: An Attempt to Estimate the Water Permeation Coefficient of the Oil Layer from the Viscosity Changes in Diluted Systems on Aging under Osmotic Pressure Gradients, *J. Colloid Interface Sci.* 73, 13 (1980).
31. Bilati, Eric Allémann & Eric Doelker, "Sonication Parameters for the Preparation of Biodegradable Nanocapsules of Controlled Size by the Double Emulsion Method" *Pharmaceutical Development and Technology* 8, (2003).
32. P. Sheehan, A. I. Liapis Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials, 60: 712–728, (1998).
33. Introduction to Tablet Hardness Testing, *Quality Solutions for the Testing of Pharmaceuticals* (2016).
34. Adeline Siew, *Pharmaceutical Technology, Dissolution Testing, Pharmaceutical technology*, (11): 56-64, (2015).
35. Aman Thakur, *Principle, working and applications of UV spectroscopy* (2011).
36. T. Theophanides, *Introduction to Infrared Spectroscopy. Infrared Spectroscopy. Materials Science, Engineering and Technology. T. Theophanides Ed.3*, (2014).
37. D.L. Pavia et al., *Introduction to Spectroscopy. A guide for students of organic chemistry. Department of Chemistry, Western Washington University, 2nd Edition, Harcourt Brace College Publishers*,(1996).
38. Skoog, Holler, Nilman, "Principles of Instrumental Analysis" *Harcourt College Publishers*, (1998).
39. David Williams and Barry Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science, EEE Electrical Insulation Magazine, Vol. 26 (4)*, (2010).
40. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin ETPGS Rebecca L. McCall1, Rachael W. Sirianni Barrow Brain Tumor Research Center, Barrow Neurological Institute, *Adv. Drug Deliv.* 57:391–410, (2005).
41. Mikyung Shin, Hong Kee Kim, Haeshin Le, Dopamine-Loaded Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Microspheres: New Strategy for Encapsulating Small Hydrophilic Drugs with high Efficiency, *Biotechnology Progress* , 444–452, (2013).

42. Kalogerini M, Kartsonakis I, Brasinika D, Koumoulos E and Charitidis, Poly(lactic acid) Microparticles for Drug Carriers in Enhancement of Controlled Release Systems towards 3D Printing, *International Journal of Nanomedicine and Nanosurgery*, 3(2), (2017).
43. P.A. Tarantili , H. Koumoulos, Sustained release of guaifenesin and ipriflavone from biodegradable coatings, *European Polymer Journal* 44, 444–452, (2008).
44. Dominique Bourgeois, Xavier Vernede, Virgile Adam, Emanuela Fioravanti and Thomas, A microspectrophotometer for UV-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals, *Journal of Applied Crystallography*, 35, 319-326, (2002).
45. Ing. Jiří Petrů, Solid dosage forms testing: Disintegration test and tablet friability and hardness, (2015).
46. F.J.Arriagada K.Osseo-Asare, Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration, 211, 2: 210-22015 ,(1999).
47. Χ. Τρικαλινός, Εισαγωγή στη θεωρία σφαλμάτων, (2004).
48. José M. Morachis, Enas A. Mahmoud and Adah Almutairi, Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles, 64 (3) 505-519, (2012).