



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Χημικών Επιστημών

**Ανάπτυξη διεργασιών εγκλεισμού της ντοπαμίνης
και της λεβοντόπας σε βιοδιασπώμενους φορείς
τροποποιημένης αποδέσμευσης**

Διπλωματική Εργασία

Ισίδωρος Σταματίου

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π Δρ. Αναστάσιας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί το κλείσιμο του πενταετούς κύκλου σπουδών μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Ως εκ τούτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, των οποίων η βοήθεια υπήρξε σημαντική σε αυτήν την προσπάθειά μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Αναστασία Δέτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για τον χρόνο της, τις συμβουλές της και την γενικότερη καθοδήγησή της, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική μου εργασία.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Θεοδώρου καθηγητή Ε.Μ.Π. και τον Δρ. Γρηγόρη Μεγαριώτη για την εξαιρετική συνεργασία και ανταλλαγή ιδεών πάνω σε θέματα της εργασίας.

Θα ήθελα να μεταφέρω θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου Ε.ΔΙ.Π. Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π. για την πολύτιμη προσωπική συνεισφορά της καθώς και του εξοπλισμού του εργαστηρίου της, η οποία έπαιξε μεγάλο ρόλο στην εργασία μου.

Στη συνέχεια ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη σε κάθε κομμάτι της εργασίας, για την παροχή γνώσεων, εμπειρίας πάνω στο θέμα, επίβλεψης και πρωτότυπων ιδεών την Ιωάννα Πιττερού υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

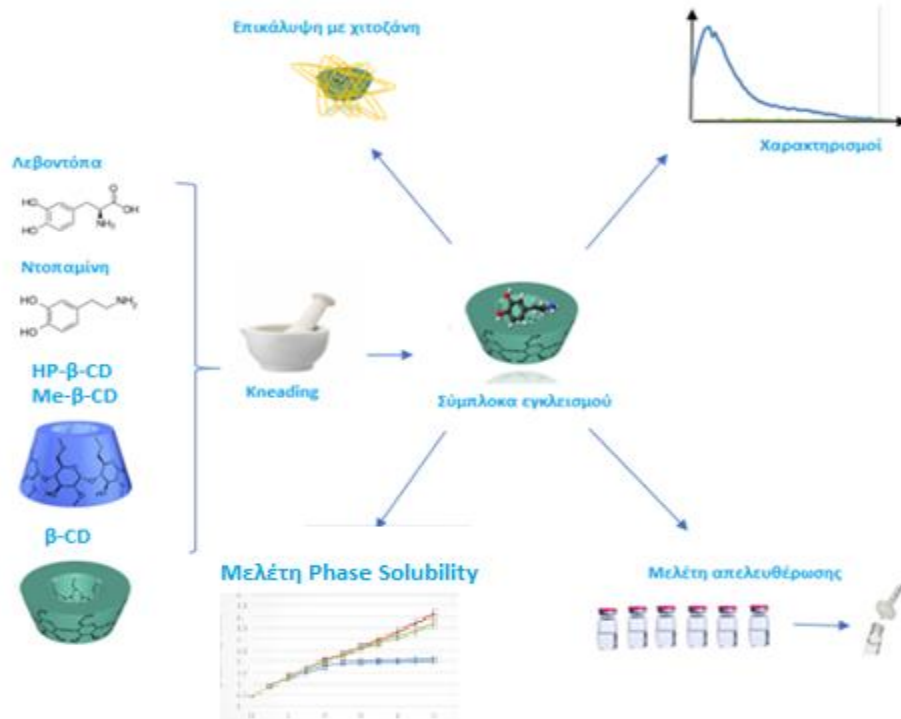
Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Ελένη Καβέτσου για το χρόνο που διέθεσε και τις γνώσεις που παρείχε για τη γενικότερη πορεία της εργασίας.

Μεταδίδω τις ευχαριστίες μου και στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την αρμονική συνεργασία και συνύπαρξη και το φιλικό και ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το φιλικό μου περιβάλλον για την ανιδιοτελή στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη



Η ντοπαμίνη (DA) και η λεβοντόπα (L-DOPA) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ουσίες για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων ή την ίαση πολλών ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο, η διέλευση τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό δυσχεραίνεται λόγω φυσικοχημικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων.

Ένας τρόπος για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων είναι ο εγκλεισμός των δραστικών ενώσεων σε φορείς. Ο εγκλεισμός μπορεί να βελτιώσει τις φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ουσιών επιδρώντας στη φαρμακολογική τους δράση. Οι β-κυκλοδεξτρίνες (β-CDs), φυσικές ή τροποποιημένες, είναι ολιγοσακχαρίτες που μπορούν να φιλοξενούν υδρόφοβα μόρια στην κοιλότητά τους σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού.

Η χιτοζάνη είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιοπολυμερές, που παρουσιάζει υψηλή βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και βλεννοκολλητικές ιδιότητες. Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλους φορείς μπορεί να οδηγήσει σε συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν σε διάφορες αναλογίες σύμπλοκα εγκλεισμού : ντοπαμίνη (DA)-β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) (1:1 και 2:1), 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) (1:1), μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) (1:1 και 2:1), λεβοντόπα (L-DOPA)-β-CD (1:1), HP-β-CD (1:1). Οι αποδόσεις διεργασίας κυμαίνονται από 60-94% και οι υψηλότερες αντιστοιχούν στα σύμπλοκα της β-CD. Οι αποδόσεις εγκλεισμού κυμαίνονται από 20-78% ανάλογα την ουσία, το φορέα αλλά και την αναλογία, με την υψηλότερη να επιτυγχάνεται για το σύμπλοκο L-DOPA-β-CD σε 2:1 αναλογία.

Τα νανοσυστήματα χαρακτηρίζονται με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS), όπου για τα σύμπλοκα της DA προκύπτει μέγεθος από 326.7 έως 372.8 nm, PdI από 0.347 έως 0.399 και ζ-δυναμικό από -16.7 έως -40.4 mV. Για τα σύμπλοκα της L-DOPA το μέγεθος είναι από 120 έως 316 nm, PdI από 0.317 έως 0.390 και ζ-δυναμικό από -15.9 έως -31.6 mV. Η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της τιμής του ζ-δυναμικού σε +18.3 mV. Οι θερμικές ιδιότητες των συμπλόκων αξιολογούνται μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης.

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού που σχηματίστηκαν μελετήθηκαν δομικά με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹H NMR) προκειμένου να κατανοηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φιλοξενούμενου μορίου και του μορίου ξενιστή και να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής εγκλεισμός της ένωσης. Στο σύμπλοκο DA-β-CD οι μεγαλύτερες διαφορές μετατοπίσεων εμφανίζονται για τα H-3 (-0.039 ppm), H-5 (-0.052 ppm) και H-6 (-0.052 ppm) και στο σύμπλοκο DA-HP-β-CD στα H-1 (-0.022 ppm), H-5 (-0,030 ppm) και H-6 (-0.030 ppm).

Γίνεται μελέτη απελευθέρωσης και κινητική μοντελοποίηση και προκύπτει ότι τα σύμπλοκα DA-β-CD/HP-β-CD/Me-β-CD και L-DOPA-β-CD/HP-β-CD παρουσιάζουν απότομη απελευθέρωση ("burst effect") στα πρώτα 20 min (>60% απελευθέρωση) και σταθεροποίηση της αποδέσμευσης ("plateau") μετά από 1 h. Παρατεταμένη απελευθέρωση παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια CS-β-CD-DA (16% στα πρώτα 20 min και μέγιστο 77% μετά από 24 h). Τα δεδομένα των συστημάτων που μελετήθηκαν προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο Higuchi και ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι η διάχυση μέσω ανώμαλης μεταφοράς (non-Fickian).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην παρούσα ερευνητική μελέτη, τα νανοσυστήματα CS-β-CD-DA καθώς και L-DOPA-Me-β-CD έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη συστημάτων παρατεταμένης αποδέσμευσης.

Επιστημονική περιοχή : Φαρμακευτική χημεία, Νανοτεχνολογία, Νανοϊατρική

Λέξεις-κλειδιά : ντοπαμίνη, λεβοντόπα, β-κυκλοδεξτρίνη, εγκλεισμός, μελέτη απελευθέρωσης, κινητική μοντελοποίηση

Abstract

Dopamine (DA) and levodopa (L-DOPA) are molecules widely used in pharmaceuticals for the treatment of symptoms caused by central nervous system diseases. These drugs face serious issues with their controlled delivery and cause a series of side effects on the patients.

β -cyclodextrins(β -CD), naturally occurring or modified, are known for their ability to form inclusion complexes(ICs). The goal of the inclusion is to improve the properties exhibited by the drug, especially solubility and bioavailability.

Chitosan is a promising substance especially for its ability to coat nanoparticles and drastically prolong the release of the drug included in the nanoparticles.

In this diploma thesis the inclusion complexes are formed in different molar ratios DA- β -CD (1:1 and 2:1) /2-hydroxypropyl- β -CD(HP- β -CD)(1:1)/Methyl- β -CD(Me- β -CD)(1:1 and 2:1), L-DOPA β -CD(1:1)/HP- β -CD (1:1) .Process yield for these complexes ranges from 60-94% and the highest values correspond to natural β -CD complexes. Inclusion efficiency ranges from 20-78%, depending on the drug substance, the molar ratio and the carrier. The highest value is exhibited by the L-DOPA- β -CD 2:1 complex.

Using Dynamic Light Scattering (DLS), DA ICs exhibit size from 326.7 to 372.8 nm, Polydispersity index (PDI) from 0.347 to 0.399 and ζ -potential from -16.7 to -40.4 mV. L-DOPA ICs are sized ranging from 120 to 316nm, PDI from 0.317 to 0.390 and ζ -potential from -15.9- to 31.6mV. Chitosan coating has an obvious effect on ζ -potential, since the coated nanoparticles display a positive value of +18.3mV. Thermal stability of the ICs is tested through Thermogravimetric analysis(TGA).

The structure of the formed ICs is studied through Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H NMR) to examine the interactions between carrier and included substance and determine the success of the inclusion process. The highest changes in chemical shifts of DA- β -CD ICs are at H-3(-0.039ppm), H-5(-0.052ppm) and H-6(-0.052ppm) and for DA-HP- β -CD at H-1(-0.022ppm), H-5(-0.030ppm) and H-6(-0.030ppm).

Release studies and kinetic modeling is performed and it is concluded that the DA- β -CD/HP- β -CD/Me- β -CD ICs and L-DOPA- β -CD/HP- β -CD exhibit "burst effect" in the first 20min (>60% release) and the maximum quantity is released in 1h. Chitosan coated nanoparticles display prolonged release (16% in the first 20min and maximum 77% after 24h). The kinetic modeling revealed that the release profiles are better fitted in the Higuchi model. The CS- β -CD-DA nanoparticles and L-DOPA-Me- β -CD ICs are the most promising nanosystems for the development of a controlled release system.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract	6
Ευρετήριο Συμβολισμών	10
1.Θεωρητικό Μέρος.....	11
1.1. Ντοπαμίνη.....	11
1.1.1. Χημική δομή	11
1.1.2. Ανακάλυψη της ντοπαμίνης	12
1.1.3 Η ντοπαμίνη ως νευροδιαβιβαστής.....	12
1.1.4 Λεβοντόπα (L-DOPA).....	14
1.1.5. Ντοπαμίνη και νόσος Πάρκινσον.....	15
1.1.6. Ντοπαμίνη και Σχιζοφρένεια.....	16
1.1.7. Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός (Blood brain barrier)	17
1.2. Κυκλοδεξτρίνες.....	17
1.2.1. Χημική δομή	17
1.2.2. Τοξικολογικές Μελέτες	19
1.2.3. Βιομηχανική Παραγωγή.....	20
1.2.4. β-κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες	20
1.2.5. Σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών	20
1.2.6. Τεχνικές Εγκλεισμού	22
1.3. Χιτοζάνη	24
1.3.1. Γενικά στοιχεία.....	24
1.3.2. Παραγωγή χιτοζάνης	25
1.3.3. Δομή χιτοζάνης	26
1.3.4. Ιδιότητες χιτοζάνης.....	26

1.4.Μελέτη απελευθέρωσης	26
1.4.1. Χορήγηση φαρμάκων.....	26
1.4.2. Διάχυση	27
1.4.3. Στάδια διαλυτοποίησης	28
1.4.4. Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκου.....	30
1.4.5. Μαθηματικά μοντέλα.....	31
1.4.6. “Burst Effect”	35
1.5. Χαρακτηρισμοί	36
1.5.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	36
(NMR).....	36
1.5.2. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)	36
1.5.3. Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	38
1.6 Μελέτη Διαλυτότητας (phase solubility)	38
1.7. Μελέτη Job’s plot	40
Σκοπός.....	41
2. Πειραματικό Μέρος.....	42
2.1. Όργανα και συσκευές	42
2.1.1. Όργανα χαρακτηρισμών.....	42
2.1.2. Φασματοφωτοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis).....	43
2.1.3. Φασματοσκοπική συσκευή φθορισμού	44
2.1.4. Συμπληρωματικές συσκευές	46
2.2. Αντιδραστήρια.....	46
2.3. Αρχικές μελέτες	47
2.3.1. Μελέτη Job’s Plot.....	47
2.3.2. Μελέτη Phase Solubility.....	47
2.4. Παρασκευές νανοσωματιδίων	47
2.4.1. Παρασκευή Συμπλόκων Εγκλεισμού με τη μέθοδο Λειοτρίβησης.....	48
2.4.2. Παρασκευή Συμπλόκων Εγκλεισμού με τη μέθοδο Συγκαταβύθισης	49
2.4.3. Εγκλεισμός των υπερμοριακών συμπλόκων ντοπαμίνης σε νανοσωματίδια χιτοζάνης με τη μέθοδο της Ιονοτροπικής Πηκτωμάτωσης	49
2.5. Προσδιορισμός αποδόσεων.....	50
2.5.1. Προσδιορισμός απόδοσης διεργασίας για τις παρασκευές των συμπλόκων	50

2.5.2. Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού	50
2.6. Μελέτη απελευθέρωσης	51
2.6.1. Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	51
2.6.2. Πρώτη μέθοδος μελέτης απελευθέρωσης.....	51
2.6.3. Δεύτερη μέθοδος μελέτης απελευθέρωσης	52
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	53
3.1. Αρχικές μελέτες	53
3.1.1. Job's plot.....	53
3.1.2. Μελέτη Phase solubility.....	55
3.2. Αποδόσεις	59
3.2.1. Αποδόσεις διεργασίας.....	59
3.2.2. Αποδόσεις εγκλεισμού	60
3.3. Χαρακτηρισμοί	61
3.3.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	61
3.3.1.1. Σύστημα DA-β-CD.....	61
3.3.1.2 Σύστημα DA-HP-β-CD	64
3.3.2. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)	65
3.3.3 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	66
3.3.3.1 Σύστημα DA-β-CD	66
3.3.4. Φθορισμός.....	67
3.4. Μελέτη απελευθέρωσης	69
3.4.1. Συστήματα DA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD και νανοσωματίδια CS-β-CD-DA.....	69
3.4.2. Συστήματα L-DOPA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD	72
4. Συμπεράσματα.....	74
5. Προτάσεις για μελλοντική Έρευνα	75
Ευρετήριο Εικόνων	76
Ευρετήριο Πινάκων.....	78
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	79
Βιβλιογραφία.....	82

Ευρετήριο Συμβολισμών

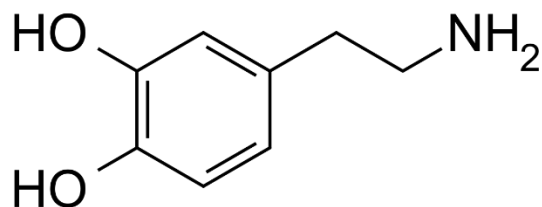
DA	Ντοπαμίνη
L-DOPA	Λεβοντόπα
β-CD	β-κυκλοδεξτρίνη
HP-β-CD	2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη
Me-β-CD	Μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
CS	Χιτοζάνη
IC	Σύμπλοκο εγκλεισμού
TPP	Τριπολυφωσφορικό νάτριο
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
NMR	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
TGA	Θερμοσταθμική Ανάλυση
PdI	Δείκτης Πολυδιασποράς
UV-Vis	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-ορατού

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Ντοπαμίνη

Χημική δομή

Η ντοπαμίνη είναι μια φυσικά απαντώμενη μονοαμίνη και ανήκει στην κατηγορία των κατεχολαμινών. Αυτή η ομάδα ενώσεων περιλαμβάνει την ντοπαμίνη, την επινεφρίνη (αδρεναλίνη) και την νορεπινεφρίνη και η ντοπαμίνη είναι πρόδρομο μόριο των άλλων δύο. Τα μόρια αυτά δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό ταυτοχρόνως σαν ορμόνες και σαν νευροδιαβιβαστές και συνεπώς είναι μεγάλης σημασίας για το νευρικό σύστημα. Η απελευθέρωση τους στο αίμα έχει διάφορες επιδράσεις στον οργανισμό (αύξηση αρτηριακής πίεσης, ρυθμού αναπνοής, κλπ) και πληθώρα φαρμακευτικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των κατεχολαμινών στον ορό.



Εικόνα 1: Δομή ντοπαμίνης ($C_8H_{11}NO_2$).

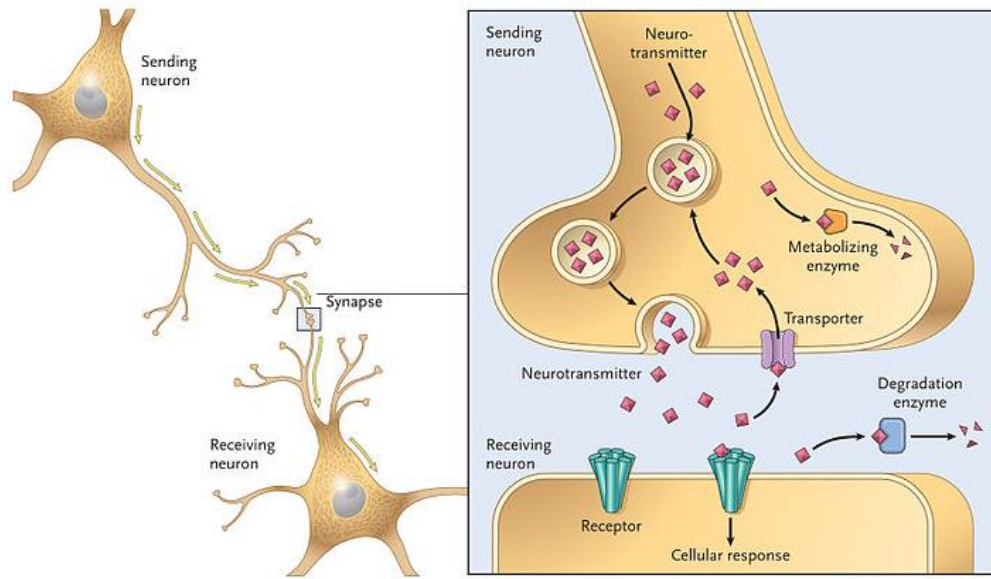
1.1.2. Ανακάλυψη της ντοπαμίνης

Η ανακάλυψη της ντοπαμίνης (DA) ως νευροδιαβιβαστή έγινε από τον Arvid Carlsson, πριν περίπου εξήντα χρόνια και σε συνδυασμό με τη μεταγενέστερη μελέτη του Paul Greengard στους μηχανισμούς κυτταρικής επικοινωνίας μέσω της ντοπαμίνης, κέρδισαν το Νόμπελ Ιατρικής το 2000. Οι έρευνες στην ντοπαμίνη έχουν επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την αντίληψη μας για τις νευροψυχιατρικές ασθένειες και έχουν συνεισφέρει στην ανάπτυξη της μοντέρνας ψυχοφαρμακολογίας. Κατά την τελετή απονομής του βραβείου Νόμπελ, ο Carlsson περιέγραψε πως στο εργαστήριο του ανακάλυψε την ντοπαμίνη στους εγκεφάλους ζώων που τους είχε χορηγηθεί L-DOPA, χρησιμοποιώντας την τότε καινούργια τεχνική της φασματοφωτοφθοριομετρίας και στη συνέχεια έδειξε πως η ντοπαμίνη είναι ένα φυσιολογικό συστατικό του εγκεφάλου με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις σε συγκεκριμένα μέρη του. [1]

1.1.3 Η ντοπαμίνη ως νευροδιαβιβαστής

Οι ντοπαμινικοί υποδοχείς είναι μια κατηγορία πρωτεϊνικών υποδοχέων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Οι υποδοχείς ενεργοποιούν διάφορα κύτταρα μέσω σύζευξης G-πρωτεϊνών και μέσω σημάτων από άλλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η ντοπαμίνη είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής που έχει την ικανότητα να προσδένεται στους υποδοχείς αυτούς. Ανάλογα με τις πρωτεΐνες που συνδέονται αλλά και τα γονίδια που τους κωδικοποιούν στο DNA οι υποδοχείς διακρίνονται σε D1,D2,D3,D4 και D5.

Στους ντοπαμινικούς υποδοχείς εκτελούνται όλες οι λειτουργίες της ντοπαμίνης ως νευροδιαβιβαστή, από την εκούσια κίνηση και την ανταμοιβή έως την ρύθμιση των επιπέδων των ορμονών και την υπέρταση. Φαρμακολογικές ουσίες που στοχεύουν την διαδικασία της νευροδιαβίβασης έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά για την αντιμετώπιση αρκετών νευρολογικών και ψυχιατρικών ασθενειών όπως το Πάρκινσον, η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή, η νόσος Χάντιγκτον, το ADHD και το σύνδρομο Τουρέτ. Μια πιθανή μελλοντική προσέγγιση στην διαχείριση ασθενειών που σχετίζονται με την ντοπαμίνη και τους ντοπαμινικούς υποδοχείς μπορεί να περιλαμβάνει μια αλλαγή κατεύθυνσης από την άμεση επέμβαση στη λειτουργία των υποδοχέων σε μία ακριβή στόχευση των σημάτων μεταξύ των κυττάρων. [2]



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση νευροδιαβιβαστών. Οι νευρώνες επικοινωνούν στέλνοντας ηλεκτροχημικές πληροφορίες με τη μορφή ενός νευροδιαβιβαστή από τη μία μεριά της σύναψης στην απέναντι μεριά.

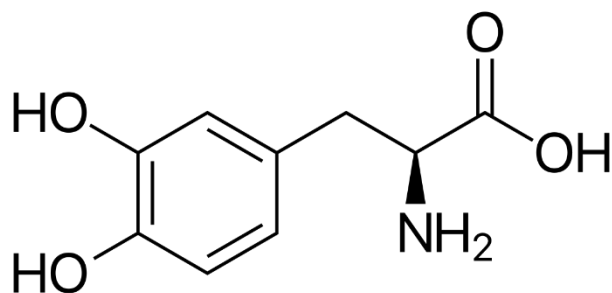
Η ντοπαμίνη εδώ και χρόνια έχει συσχετιστεί με την κίνηση, την εκμάθηση νέων πραγμάτων. Η κίνηση και η εκμάθηση έχουν σχέση με το κίνητρο, οπότε και η ντοπαμίνη θεωρείται ότι έχει σχέση με το κίνητρο. Οι γνώσεις για τη ντοπαμίνη και τη δράση της αλλάζουν συνεχώς με την πάροδο του χρόνου. Τη δεκαετία του εβδομήντα οι ερευνητές μπόρεσαν για πρώτη φορά να διακόπτουν επιλεκτικά τη μεταφορά ντοπαμίνης και αμέσως παρατήρησαν μεγάλη μείωση στην κίνηση, το οποίο ήταν αναμενόμενο και συνάδει με τα συμπτώματα της νόσου Πάρκινσον, τη χρήση ναρκωτικών ή της εγκεφαλίτιδας [3]

Αργότερα παρατηρήθηκαν οι ντοπαμινικοί νευρώνες καθώς και τα μοτίβα σημάτων που δίνουν και συνδέθηκαν με άμεσες κινήσεις σε μαϊμούδες. Αυτή η σχέση οδήγησε στη σύνδεση της ντοπαμίνης με τη ρύθμιση της συμπεριφοράς του ζώου. Όμως αργότερα η θεώρηση αυτή άλλαξε και αντί για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς, η ντοπαμίνη φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για το σύστημα ανταμοιβής του εγκεφάλου.

Η ιδέα ότι η ντοπαμίνη συνδέεται με την εκμάθηση ταιριάζει με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, με βάση την οποία η ντοπαμίνη οδηγεί στη διαμόρφωση σταθερότερων συνάψεων μεταξύ των νευρώνων του ραβδωτού σώματος. Ταυτόχρονα παραμένει η ιδέα ότι η ντοπαμίνη είναι εκτεταμένα συνδεδεμένη με το κίνητρο, πράγμα που πολλοί επιστήμονες που ασχολούνται με θέματα συμπεριφοράς θεωρούν δεδομένο. [4]

1.1.4 Λεβοντόπα (L-DOPA)

Εκτός από την ντοπαμίνη η παρούσα εργασία ασχολείται και με το πρόδρομο της μόριο την L-DOPA (λεβοντόπα). Ως L-DOPA εννοείται το μόριο L-3,4-dihydroxyphenylalanine. Η λεβοντόπα από άποψη χημείας είναι φυσικό L ισομερές του αμινοξέος D-διυδροξυφαινυλανανίνης. Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1910 από σπόρους κουκιών από τον Torquati. Μπορεί να συντεθεί φυσικά από το αμινοξύ L-τυροσίνη. Το ενδιαφέρον γύρω από τη λεβοντόπα οφείλεται στο γεγονός ότι μέσω ενός μεταβολικού μονοπατιού μπορεί να μετατραπεί σε ντοπαμίνη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα με σκοπό την παραγωγή ντοπαμίνης από τον ίδιο τον οργανισμό, όπως για παράδειγμα στα σκευάσματα για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου Πάρκινσον. [6]



Εικόνα 3: Δομή της λεβοντόπας: (2S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid.

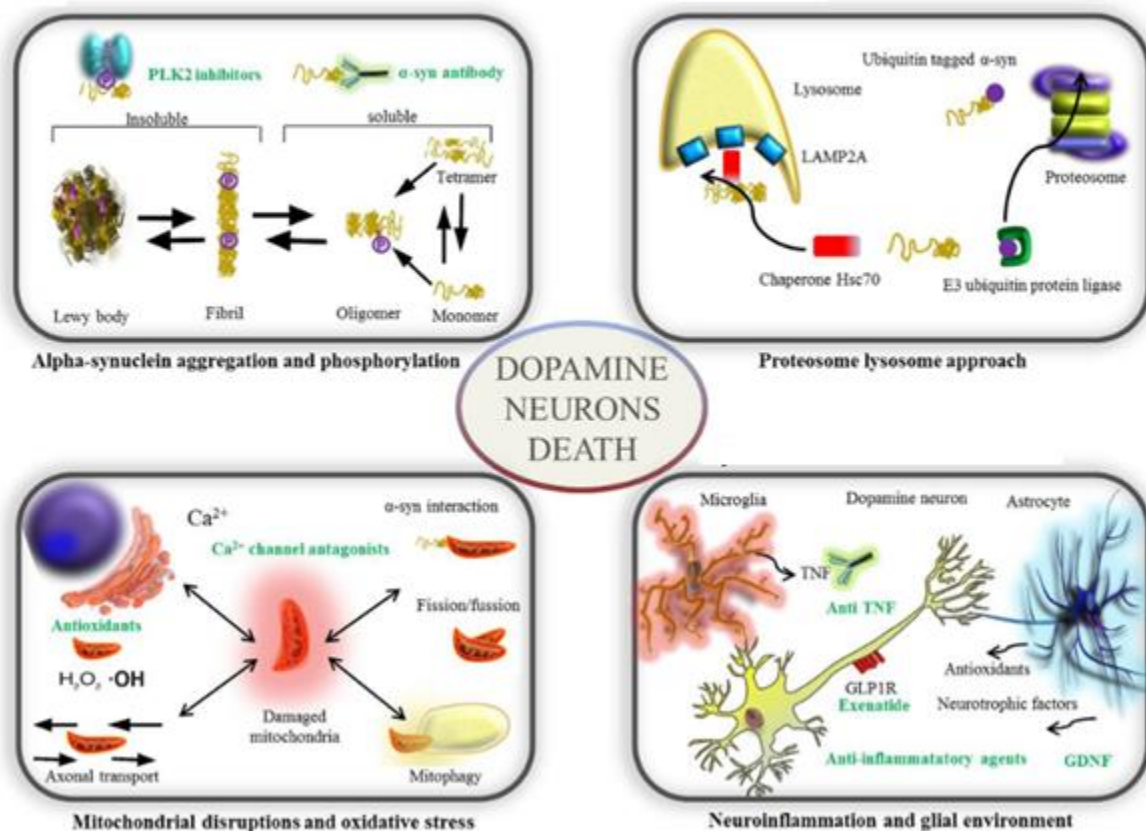
Ο λόγος που χρησιμοποιείται η L-DOPA αντί για κανονική DA, είναι ότι το μόριο της L-DOPA μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ η ντοπαμίνη αδυνατεί. Η L-DOPA μετατρέπεται σε ντοπαμίνη με τη βοήθεια του κατάλληλου ενζύμου “Dopa αποκαρβοξυλάση”. Η μετατροπή γίνεται στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε μερικά ακόμα περιφερειακά κύτταρα.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης λόγω της χορηγούμενης λεβοντόπας γίνεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και στα υπόλοιπα κύτταρα που μεταβολίζουν την L-

DOPA. Η αύξηση αυτή προκαλεί πολλά από τις παρενέργειες των φαρμάκων που περιέχουν L-DOPA. Οι κύριες παρενέργειες των φαρμάκων που χορηγούνται για τη νόσο του Πάρκινσον περιλαμβάνουν κόπωση, δυσκινησία, παραισθήσεις καθώς και αλλαγές στη συμπεριφορά.

1.1.5. Ντοπαμίνη και νόσος Πάρκινσον

Η αστοχία του οργανισμού στη ρύθμιση της ντοπαμίνης μπορεί να είναι η αιτία πρόκλησης διαφόρων ασθενειών. Η νόσος του Πάρκινσον είναι η δεύτερη συνηθέστερη νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Περιλαμβάνει τα εξής συμπτώματα: τρεμούλιασμα σε αδράνεια, ακαμψία, βραδυκινησία και ασταθής στάση σώματος. Η νόσος περιλαμβάνει και άλλα συμπτώματα, που δεν έχουν σχέση με την κίνηση, όπως κατάθλιψη και διαταραχή του ύπνου, στα οποία δίνεται περισσότερη βάση τα τελευταία χρόνια. Η νόσος χαρακτηρίζεται από τη βαθμιαία απώλεια των ντοπαμινικών νευρώνων στην substantia nigra pars compacta. [7]



Εικόνα 4: Απεικόνιση φθοράς στους ντοπαμινικούς νευρώνες .

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία για τη νόσο του Πάρκινσον. Καθώς η DA αδυνατεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φάρμακο για την θεραπεία των ασθενών με τη νόσο αυτή. Αντί αυτής χρησιμοποιείται το αμέσως πρόδρομο μόριο, η L-DOPA, η οποία περνάει σε ικανοποιητικό βαθμό τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ωστόσο, μακροχρόνια χρήση L-DOPA μπορεί να οδηγήσει σε διακυμάνσεις στο χρόνο αντίδρασης των ασθενών και σε διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Αυτές οι παρενέργειες συνδέονται με τις διακυμάνσεις στα επίπεδα ντοπαμίνης και έχουν εν μέρει αντιμετωπιστεί με τη χρήση φαρμάκων L-DOPA τροποποιημένης αποδέσμευσης. Η φαρμακευτική αγωγή που προσφέρεται στους ασθενείς αφορά την ανακούφιση των συμπτωμάτων και όχι την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι η ανάπτυξη συστημάτων τροποποιημένης αποδέσμευσης για τη μείωση της δόσης της δραστικής ουσίας και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας. Διάφορα τέτοια συστήματα έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ήδη σε διάφορα φάρμακα.

1.1.6. Ντοπαμίνη και Σχιζοφρένεια

Μια δεύτερη ασθένεια που έχει σχέση με τη ρύθμιση της ντοπαμίνης στο σώμα είναι η σχιζοφρένεια. Σε αντίθεση με το Πάρκινσον, όπου θεωρείται ότι υπάρχει έλλειψη ντοπαμίνης και συνεπώς τα φάρμακα για την αντιμετώπιση του στρέφονται στην παροχή ντοπαμίνης στους ασθενείς, στην περίπτωση της σχιζοφρένειας τα πράγματα δεν είναι τόσο σαφή και τα αντίστοιχα φάρμακά της ανακαλύφθηκαν τυχαία. Για την προσομοίωση των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας οι ερευνητές χρησιμοποιούν σε πειραματόζωα και σε εθελοντές D-αμφεταμίνη. Η ψύχωση που προκαλεί η αμφεταμίνη θεωρείται ότι μοιάζει σε ικανοποιητικό βαθμό με τα πρώτου βαθμού συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Από τα ευρήματα των ερευνών προκύπτει η “υπόθεση της ντοπαμίνης” με βάση την οποία υπάρχει σύνδεση μεταξύ της ντοπαμίνης και της σχιζοφρένειας.

Ειδικότερα υπεύθυνα για την ασθένεια αυτή θεωρήθηκαν τα αυξημένα επίπεδα ντοπαμίνης στον D2 υποδοχέα του εγκεφάλου, ωστόσο αυτό δεν αποδείχθηκε σαφώς καθώς στους περισσότερους ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν χορηγηθεί αντιψυχωτικά φάρμακα για μεγάλη χρονική περίοδο. Σε επόμενες έρευνες που έγιναν σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή για τη σχιζοφρένεια τα αποτελέσματα πάλι ήταν ασαφή. Από πιο πρόσφατες δυναμικές μελέτες συμπεραίνεται μία σύνδεση μεταξύ των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας και της αύξησης της απελευθέρωσης ντοπαμίνης μεταξύ συνάψεων.[1]

1.1.7. Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός (Blood brain barrier)

Ο πιο περιοριστικός παράγοντας στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων που επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός περιορίζει την διείσδυση ουσιών στον εγκέφαλο σε τέτοιο βαθμό που κατά κανόνα κάθε μεγάλο φαρμακευτικό μόριο, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, κλπ δεν μπορεί να τον διαπεράσει. Ακόμα και τα περισσότερα από τα μικρά μόρια δυσκολεύονται να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μόνο το 2% περίπου από τα μικρά μόρια μπορούν να τον διαπεράσουν. [37]

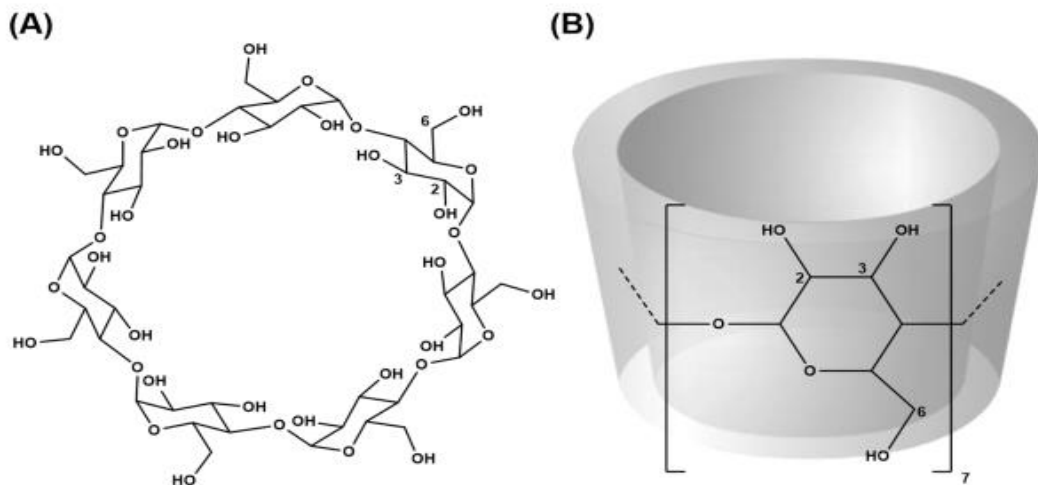
Η δυσκολία που παρουσιάζουν τα φάρμακα να διαπερνούν το φραγμό είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς πολλοί άνθρωποι πάσχουν από ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος και ο αριθμός αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά, καθώς ο γενικότερος πληθυσμός γίνεται γηραιότερος και πιο επιρρεπής σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που μελετώνται για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα που παρουσιάζει ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Νέες τεχνολογίες στοχεύουν στην τροποποίηση των δομών των φαρμακευτικών ουσιών ώστε να περνούν από τους ενδογενείς μεταφορείς του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αυτή η προσέγγιση αφορά συγκεκριμένες λιποδιαλυτές ενώσεις με σχετικά μικρό μοριακό βάρος. Μια διαφορετική προσέγγιση αφορά τη χορήγηση των φαρμάκων απευθείας στον εγκέφαλο, με ένεση χωρίς να διαπεραστεί ο φραγμός.

1.1. Κυκλοδεξτρίνες

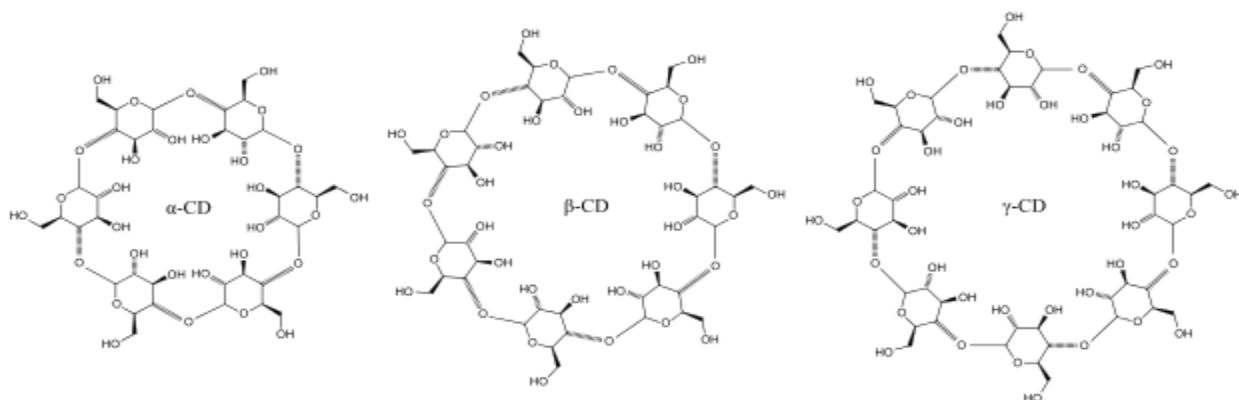
1.1.1. Χημική δομή

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης. Η υπερμοριακή δομή τους τους επιτρέπει ενδομοριακές υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού που δημιουργούνται μπορούν να βελτιώσουν της ιδιότητες των μορίων που εγκλείονται, όπως τη βιοδιαθεσιμότητα, τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα και για το λόγο αυτό οι κυκλοδεξτρίνες μελετώνται εκτενώς για νέες εφαρμογές σε πολλούς τομείς. Συγκεκριμένα στη φαρμακευτική, έχουν αναγνωριστεί ως έκδοχα μεγάλης σημασίας για τη βελτίωση της σταθερότητας και της διαλυτότητας των φαρμάκων.



Εικόνα 5 : (A) Χημική Δομή της β -CD (B) Σχηματική απεικόνιση κόλουρου κώνου.

Δομικά οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από μονάδες γλυκοπυρανοζών ενωμένων με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πιο συνηθισμένες κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι οι α -, β - και γ -κυκλοδεξτρίνη, αποτελούμενες από έξι, επτά και οχτώ μονάδες γλυκόζης αντίστοιχα. Η εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφιλη ενώ η εσωτερική κοιλότητα υδρόφοβη. Μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτές τις περιοχές μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Τα σύμπλοκα επηρεάζονται από την ουσία που εγκλείεται, την κυκλοδεξτρίνη και τη φύση του διαλύτη.



Εικόνα 6: Απεικόνιση δομών α,β και γ κυκλοδεξτρίνης.

1.2.2. Τοξικολογικές Μελέτες

Οι τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυκλοδεξτρίνες είναι γενικά ασφαλείς για χορήγηση από το στόμα, αφού δεν απορροφούνται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Ακόμη μερικά είδη κυκλοδεξτρινών είναι ασφαλή για χορήγηση παρεντερικά.

Τοξικολογικά στοιχεία των κυκλοδεξτρινών :

α-κυκλοδεξτρίνη

- Σχετικά ερεθιστική μετά από ενδομυϊκή ένεση
- Ερεθιστική στα μάτια
- Δεσμεύει κάποια λιπίδια
- Απορροφάται το 2-3% μετά από στοματική χορήγηση σε ποντίκια
- Δεν μεταβολίζεται από το άνω μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα
- Μεταβολίζεται από την εντερική χλωρίδα του παχέος εντέρου

β-κυκλοδεξτρίνη

- Λιγότερο ερεθιστική από την α-CD μετά από ενδομυϊκή ένεση
- Δεσμεύει την χοληστερόλη
- Απορροφάται το 1-2% μετά από στοματική χρήση από τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα
- Δεν μεταβολίζεται στο άνω μέρος του εντέρου
- Μεταβολίζεται από βακτήρια του παχέος εντέρου

γ-κυκλοδεξτρίνη

- Ελάχιστα ερεθιστική μετά από ενδομυϊκή ένεση
- Αποικοδομείται γρήγορα προς γλυκόζη από εντερικά ένζυμα

- Απορροφάται ελάχιστα (0.1%) μετά από στοματική χρήση
- Δεν μεταβολίζεται μετά από ενδοφλέβια χορήγηση
- Είναι η λιγότερο τοξική από τα τρία είδη κυκλοδεξτρινών

1.2.3. Βιομηχανική Παραγωγή

Οι κυκλοδεξτρίνες παράγονται βιομηχανικά από το άμυλο με ενζυματική τροποποίηση. Για την παραγωγή κυκλοδεξτρίνης το άμυλο υδρολύεται με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (cyclodextrin glycosyltransferase ή CGT-transferase), το οποίο προκαλεί αποδόμηση του αμύλου. Έτσι παράγονται κυκλικές και μη δεξτρίνες, δηλαδή ολιγοσακχαρίτες μικρού μεγέθους, οι οποίες για να φτάσουν στο επιθυμητό στάδιο των α - , β - και γ - κυκλοδεξτρινών θα πρέπει να ενωθούν μεταξύ τους με α -1,4-γλυκοζιτικό δεσμό. [15]

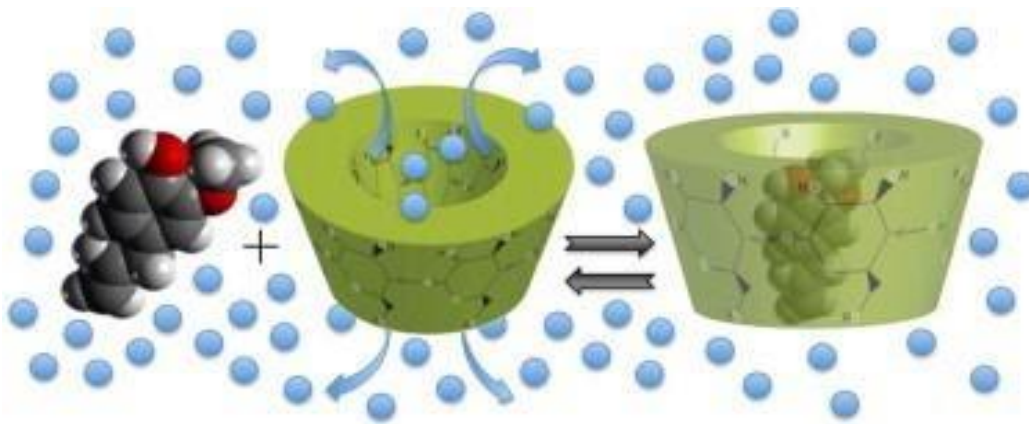
1.2.4. β -κυκλοδεξτρίνη και τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες

Πέρα από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες έχουν παρασκευαστεί τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες με στόχο τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Η τροποποίηση αφορά την αντικατάσταση ομάδων της φυσικής κυκλοδεξτρίνης με άλλες πλευρικές ομάδες. Οι ιδιότητες που συνήθως επηρεάζονται με την τροποποίηση ανάλογα με τον υποκαταστάτη που χρησιμοποιείται είναι η διαλυτότητα, η σταθερότητα και η εκλεκτικότητα.

Η πιο συνηθισμένη κυκλοδεξτρίνη είναι η β -κυκλοδεξτρίνη, λόγω της οικονομικότητας και της διαθεσιμότητας της. Ωστόσο παρουσιάζει πρόβλημα στην διαλυτότητά της στο νερό. Για τον λόγο αυτό έχουν μελετηθεί τροποποιημένες β -κυκλοδεξτρίνες με βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η 2-υδροξυπροπυλο- β -CD η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει ανώτερες φαρμακευτικές ιδιότητες και διαλυτότητα στο νερό από την β -CD καθώς και μεθυλο- β -CD. [9]

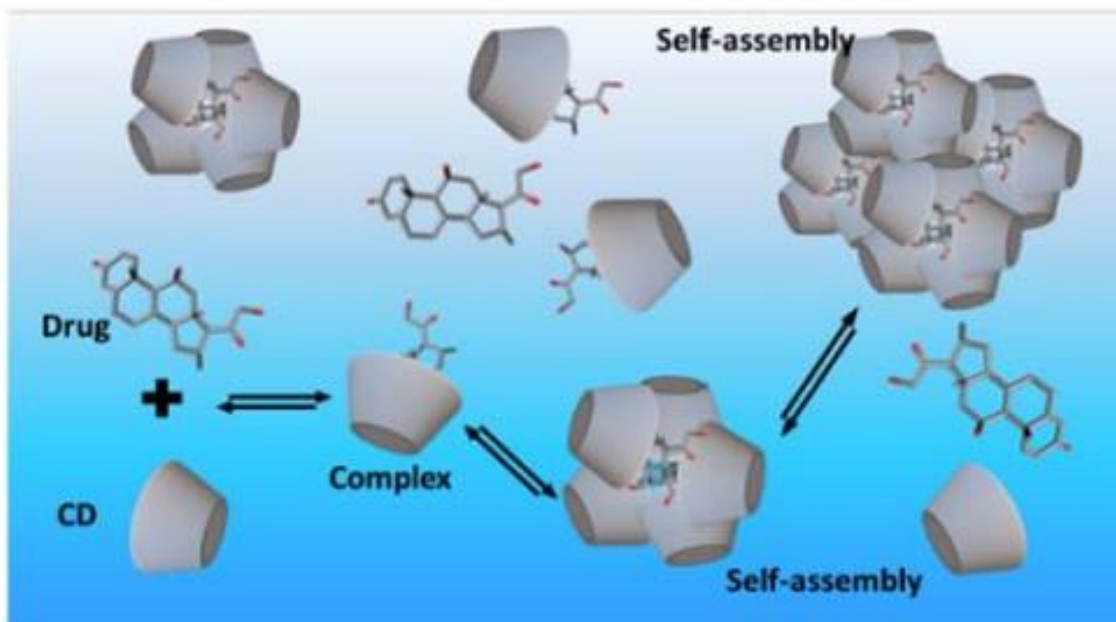
1.2.5. Σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με ένα ευρύ φάσμα στερεών, υγρών και αερίων βιοδραστικών ενώσεων. Ειδικότερα, όταν οι κυκλοδεξτρίνες βρεθούν σε ένα υδατικό μέσο και προστεθούν σε αυτό μη πολικά υδρόφοβα μόρια, τότε τα μόρια του νερού που βρίσκονται στην υδρόφοβη κοιλότητα της β -CD αντικαθίστανται από τα περισσότερα υδρόφοβα «φιλοξενούμενα» μόρια οδηγώντας σε μια πιο σταθερή κατάσταση, χαμηλότερης ενέργειας. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των υδρόφοβων μορίων και των μορίων της κυκλοδεξτρίνης περιλαμβάνουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, δυνάμεις διασποράς London και δεσμούς υδρογόνου.



Εικόνα 7: Απεικόνιση συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών.

Οι κυκλοδεξτρίνες καθώς και τα σύμπλοκά τους όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα έχουν την τάση να ενωθούν μεταξύ τους σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αλληλεπιδρούν με υδρόφοβα μόρια περικλύοντάς τα στο εσωτερικό τους. Οι δομές τύπου μικυλλίου που προκύπτουν χαρακτηρίζονται ως σύμπλοκα μη εγκλεισμού (non inclusion complexes).



Εικόνα 8: Απεικόνιση συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων.

1.2.6. Τεχνικές Εγκλεισμού

❖ Συγκαταβύθιση

Η κυκλοδεξτρίνη διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος είναι νερό με ή χωρίς την προσθήκη οργανικού διαλύτη, και η ένωση που πρόκειται να εγκλειστεί προστίθεται στο διάλυμα υπό ανάδευση. Η ένωση εγκλείεται στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης και για να καταβυθιστεί το ίζημα των συμπλόκων το σύστημα ψύχεται. Το ίζημα απομονώνεται από το διάλυμα και ξεπλένεται. Η μέθοδος αυτή είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα καθώς η διαλυτότητα των κυκλοδεξτρινών είναι σχετικά μικρή και απαιτούνται μεγάλες ποσότητες νερού που είναι δύσκολο να διαχειριστούν στη βιομηχανία.

❖ Συμπλοκοποίηση σε μορφή πολτού

Η κυκλοδεξτρίνη προστίθεται σε μεγάλη ποσότητα (50-60%) στο διαλύτη και αναδεύεται. Το διάλυμα είναι κορεσμένο από κυκλοδεξτρίνη. Στη συνέχεια προστίθεται η ένωση προς εγκλεισμό και σχηματίζονται τα σύμπλοκα εγκλεισμού. Σχηματίζεται ίζημα από τα σύμπλοκα εγκλεισμού λόγω του κορεσμού του διαλύματος. Το ίζημα διαχωρίζεται με απόχυση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Αυτή η μέθοδος πλεονεκτεί στο ότι πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος συνήθως και χρησιμοποιεί μικρές σχετικά ποσότητες νερού.

❖ Kneading

Μίγμα ένωσης και κυκλοδεξτρίνης στην κατάλληλη γραμμομοριακή αναλογία, λειοτριβείται σε ιγδίο για συγκεκριμένο χρόνο και παραλαμβάνεται ομογενοποιημένο μίγμα. Για την ομογενοποίηση του μίγματος και την μερική διάλυση των επιμέρους συστατικών χρησιμοποιείται κατάλληλο διάλυμα το οποίο προστίθεται στάγδην. [10]

❖ Εκβολή

Μέσα σε εκβολέα αναμιγνύονται η κυκλοδεξτρίνη, η ένωση προς εγκλεισμό και ο κατάλληλος διαλύτης. Ρυθμίζεται ο ρυθμός ανάδευσης, το ποσό θερμότητας και ο χρόνος θέρμανσης. Τα σύμπλοκα ανάλογα με την υγρασία που έχουν μπορούν να ξηραθούν απευθείας στην έξοδο του εκβολέα, είτε να ακολουθήσουν διαδικασία ξήρανσης σε φούρνο. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι είναι συνεχής διεργασία.

❖ Ξηρή Ανάμειξη

Υπάρχουν μόρια που μπορούν να εγκλειστούν στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης με απλή ανάμειξη χωρίς την παρουσία διαλύτη. Πρόκειται κυρίως για έλαια ή άλλα μόρια σε υγρή φάση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζεται έκπλυση του προϊόντος ούτε διαχωρισμός των συμπλόκων από το διαλύτη.

❖ Ξήρανση με ψεκασμό

Με τη μέθοδο αυτή παράγονται σύμπλοκα σε μορφή ξηρής σκόνης. Χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών. Διάλυμα κυκλοδεξτρίνης, ένωσης που πρόκειται να εγκλειστεί και κατάλληλου διαλύτη ψεκάζεται μέσω ακροφυσίου μέσα σε θάλαμο ξήρανσης με αποτέλεσμα παραγωγής συμπλόκων με τη μορφή ξηρής σκόνης. Αυτή η μέθοδος είναι απλή, συνεχής διεργασία με χαμηλό κόστος όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ενώσεις που είναι θερμικά σταθερές σε εύρος 50-70 °C.

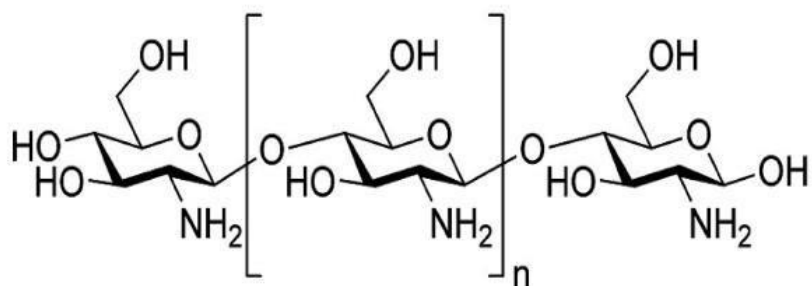
❖ Λυοφιλοποίηση

Η ένωση προς εγκλεισμό διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και ύστερα προστίθεται η κυκλοδεξτρίνη σε κατάλληλη ποσότητα. Το μίγμα αναδεύεται ώσπου να διαλυθεί η κυκλοδεξτρίνη. Ύστερα οδηγείται για λυοφιλοποίηση, δηλαδή την ξήρανση υπό κενό σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμικά ευαίσθητα μόρια, ωστόσο έχει μεγάλο κόστος.

1.2. Χιτοζάνη

1.2.1. Γενικά στοιχεία

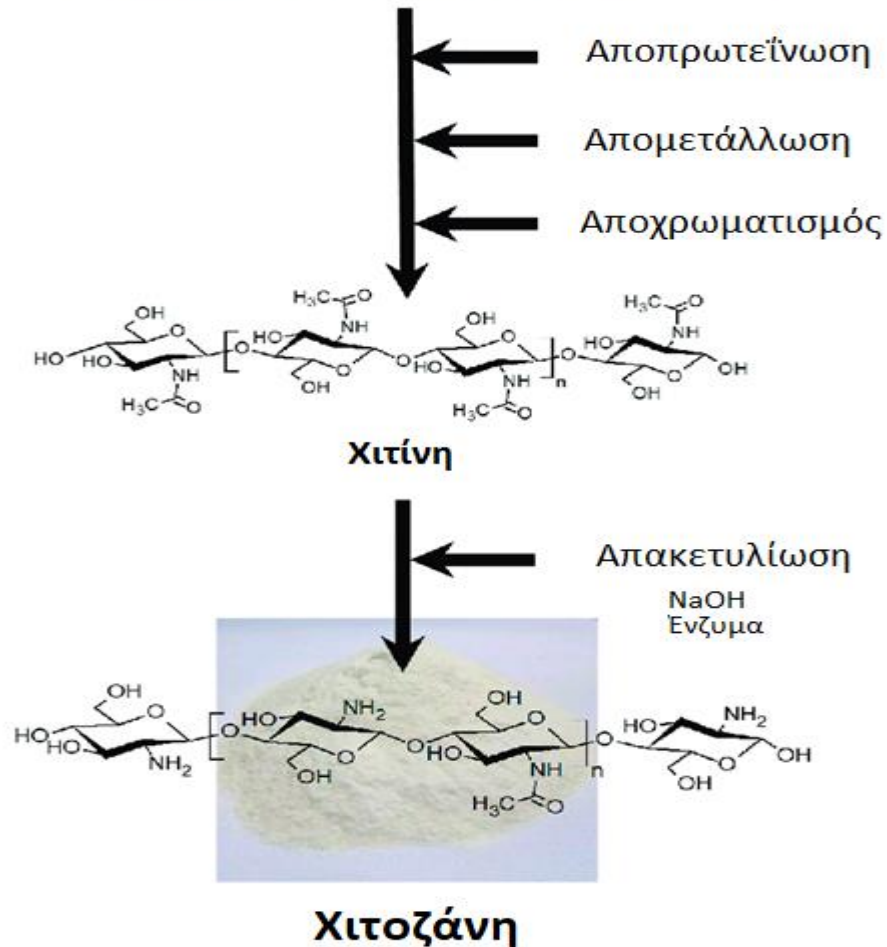
Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ο οποίος προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης, όταν ο βαθμός απακετυλίωσης ξεπεράσει το 50%. Ιδιότητες που την κάνουν να ξεχωρίζει στην φαρμακευτική είναι η βιοσυμβατότητα, βιοαποδομησιμότητα, υδροφιλία, η έλλειψη τοξικότητας, βιοδιαθεσιμότητα και άλλες. Το μονομερές του πολυσακχαρίτη είναι η γλυκοζαμίνη. Η χιτοζάνη έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να σχηματίσει νανοσωματίδια στα οποία μπορεί να εγκλειστεί η ενεργή ουσία και να παραδοθεί στον στόχο της. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ικανότητά να επιδρά θετικά στις νευρολογικές διεργασίες, καθιστώντας την ιδανική για χρήση σε νευρολογικές ασθένειες. [12]



Εικόνα 9: Δομή χιτοζάνης.

1.2.2. Παραγωγή χιτοζάνης

Όπως προαναφέρθηκε, η χιτοζάνη προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης. Συγκεκριμένα ο βαθμός απακετυλίωσης πρέπει να ξεπεράσει το 50%. Η χιτίνη είναι ο δεύτερος συνηθέστερος πολυσακχαρίτης που απαντάται στη φύση, μετά την κυτταρίνη. Η δομή της χιτίνης είναι ινώδης και βρίσκεται στους εξωσκελετούς των αρθροπόδων και στο κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων. Για την παραγωγή της χιτοζάνης η χιτίνη απακετυλιώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον ή με χρήση κατάλληλων ενζύμων. Το περιβάλλον θα πρέπει να είναι αδρανές με την προσθήκη αζώτου, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση παραγωγής χιτοζάνης.

1.2.3. Δομή χιτοζάνης

Η χιτοζάνη αποτελείται από τυχαία κατανεμημένες μονάδες D-γλυκοζαμίνης, η οποία προκύπτει από την απακετυλίωση και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης, δηλαδή τα μόρια που δεν απακετυλιώθηκαν. Οι δύο μονάδες συνδέονται με 1,4-β-γλυκοζιτικό δεσμό. Για το χαρακτηρισμό της χιτοζάνης θα πρέπει γενικά να αναφέρεται ο βαθμός απακετυλίωσης, καθώς αυτό κυμαίνεται από 50-98% και επηρεάζει τις ιδιότητες της χιτοζάνης.

1.2.4. Ιδιότητες χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι διαλυτή κυρίως σε όξινα υδατικά διαλύματα, καθώς εμφανίζει ετερογενή διασπορά των ακετυλομάδων στην κύρια πολυμερική της αλυσίδα. Λόγω της διαλυτότητας αυτής η χιτοζάνη είναι κατάλληλη για εφαρμογές σε μορφή γέλης, ινών και φιλμ. Σημαντικό ρόλο στη διαλυτότητα της χιτοζάνης παίζει ο βαθμός ακετυλίωσης.

Το μοριακό βάρος της χιτοζάνης κυμαίνεται από 1.000-250.000 g/mol και γενικά αναφέρεται στο σκεύασμα της. Μπορεί να προσδιοριστεί με ιξωδομετρία GPC και με High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

1.4. Μελέτη απελευθέρωσης

1.4.1. Χορήγηση φαρμάκων

Ιδιαίτερα σημαντική για τη φαρμακευτική είναι η μελέτη της κινητικής της απελευθέρωσης ενός φαρμάκου. Για τα φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα το πρώτο στάδιο είναι η διάλυση της ενεργής ουσίας και η απορρόφηση της από την γαστρεντερική οδό. Ελέγχον στάδιο εδώ μπορεί να είναι είτε η διάλυση της ουσίας είτε η απορρόφηση, ανάλογα την περίπτωση. Στη συνέχεια ακολουθεί η απελευθέρωση στο αίμα. Τα δύο παραπάνω προφίλ απελευθέρωσης μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους καθώς το pH του στομάχου διαφέρει πολύ από αυτό του φυσιολογικού ορού.

1.4.2. Διάχυση

Διάχυση είναι η κίνηση από μία περιοχή υψηλότερης συγκέντρωσης σε μία περιοχή χαμηλότερης συγκέντρωσης. Η κινητήρια δύναμη πίσω από τη διάχυση είναι η διαφορά συγκέντρωσης.

Για την μελέτη της διάχυσης χρησιμοποιείται ο Νόμος του Fick, σύμφωνα με τον οποίο τα μόρια της δραστικής ουσίας διαχέονται από μια περιοχή μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε μία περιοχή μικρότερης συγκέντρωσης έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Η διαφορά δυναμικού για τη συγκεκριμένη μεταφορά είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης και ο ρυθμός της διάχυσης θεωρείται ανάλογος της.

Εξίσωση του Νόμου του Fick:

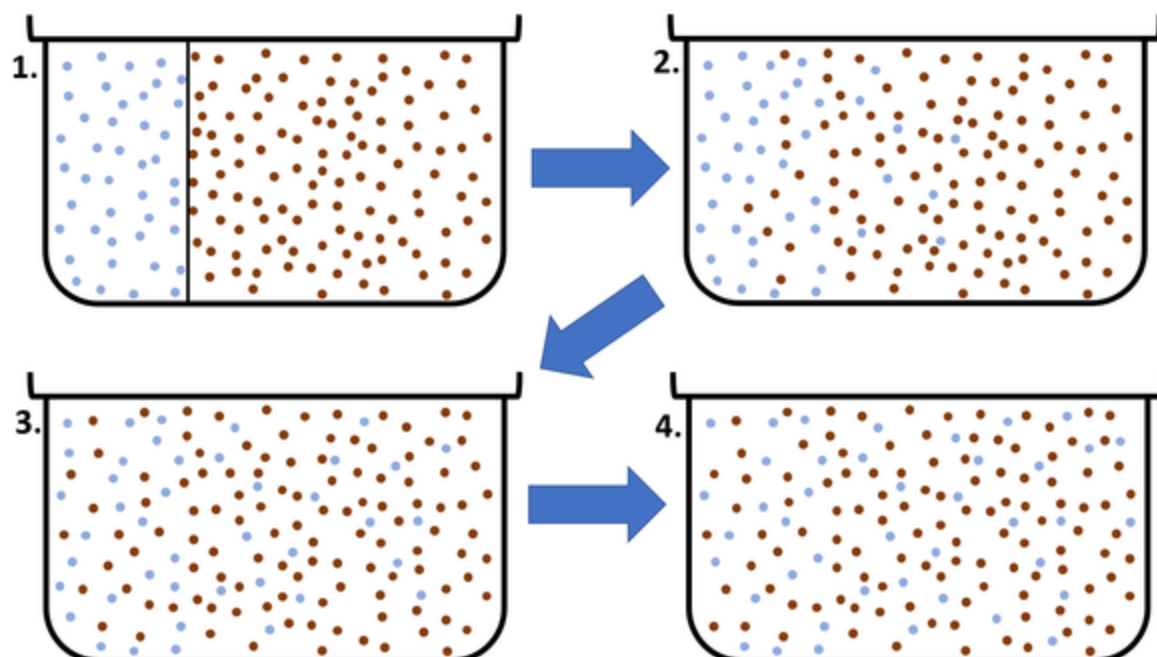
$$J = -D \frac{d\varphi}{dx} \quad (1)$$

Όπου, J: η ροή διάχυσης με μονάδες ποσότητα ουσίας προς μονάδα επιφάνειας προς χρόνο. Η ροή διάχυσης μετράει την ποσότητα ουσίας που θα περάσει μέσα από μια μονάδα επιφάνειας σε συγκεκριμένο χρόνο

D: συντελεστής διάχυσης ή διαχυτικότητα, με μονάδες μέτρησης επιφάνειας προς χρόνο

φ : η συγκέντρωση (για ιδανικά μίγματα), με μονάδες ποσότητα ουσίας προς όγκο

x: τη θέση, με μονάδες μήκους



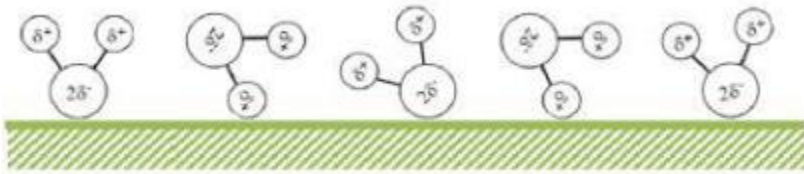
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της διάχυσης. [13]

1.4.3. Στάδια διαλυτοποίησης

Η διαλυτοποίηση των φαρμάκων γίνεται σε πέντε στάδια. Αυτά είναι: (1) διαβροχή της επιφάνειας του σωματιδίου με νερό, (2) διάσπαση δεσμών στερεάς κατάστασης, (3) διαλυτοποίηση των εξατομικευμένων μορίων, ιόντων, ατόμων φαρμάκου, (4) διάχυση των εξατομικευμένων μορίων, ιόντων, ατόμων φαρμάκου διαμέσου του υγρού και (5) μεταφορά στο καλά αναμεμιγμένο κύριο όγκο του υγρού.

Παρακάτω φαίνονται σχηματικά αυτά τα στάδια:

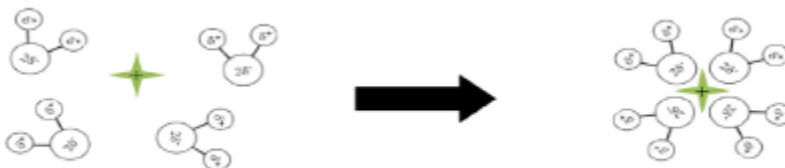
1) Διαβροχή της επιφάνειας των σωματιδίων με νερό



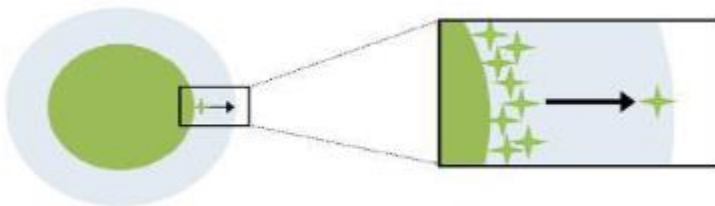
2) Διάσπαση των δεσμών στερεάς κατάστασης π.χ. σε έναν κρύσταλλο



3) Διαλυτοποίηση των εξατομικευμένων μορίων, ιόντων, ατόμων φαρμάκου



4) Διάχυση των εξατομικευμένων μορίων, ιόντων, ατόμων φαρμάκου διαμέσου του υγρού, ασταθούς οριακού στρώματος που περιβάλλει το σωματίδιο του φαρμάκου



5) Μεταφορά στο καλά αναμεμιγμένο κύριο όγκο του υγρού

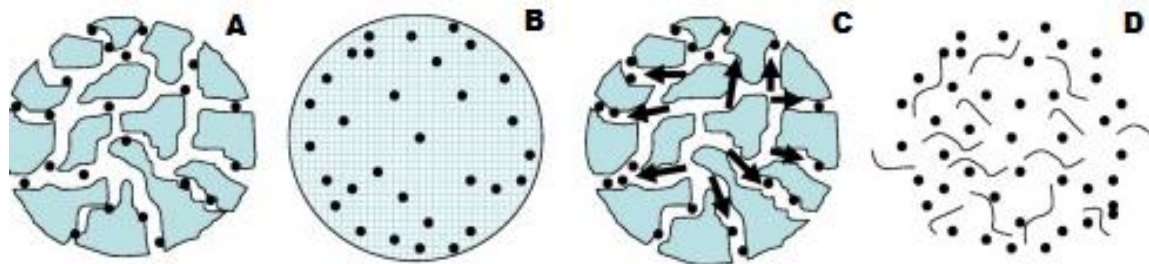


Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό απελευθέρωσης μπορεί να είναι :

1. Η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας
2. Η εκρόφιση της επιφανειακά απορροφημένης δραστικής ουσίας
3. Η διάχυση μέσω του πολυμερούς
4. Η διάβρωση/αποικοδόμηση του πολυμερούς
5. Ο συνδυασμός των διεργασιών διάχυσης και διάβρωσης

1.4.4. Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμάκου

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών των φαρμάκων στα πολυμερικά συστήματα. Αυτοί είναι (1) διάχυση των δραστικών ουσιών, (2) ωσμωτική άντληση, (3) αποικοδόμηση του πολυμερούς και (4) διάβρωση. Οι μηχανισμοί αυτοί περιγράφουν πως η δραστική ουσία μεταφέρεται στην εξωτερική επιφάνεια της μήτρας του πολυμερούς και έπειτα απελευθερώνεται στο περιβάλλον.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών απελευθέρωσης φαρμάκων σε πολυμερικά συστήματα. Από αριστερά προς τα δεξιά είναι A: διάχυση μέσω πόρων νερού, B: διάχυση διαμέσου της πολυμερούς μήτρας, C: ωσμωτική άντληση, D: διάβρωση.

1.4.5. Μαθηματικά μοντέλα

Υπάρχουν διάφορα μαθηματικά και εμπειρικά μοντέλα που περιγράφουν το προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκων [14]. Στην παρούσα εργασία εξετάζονται τα παρακάτω:

- **Μηδενικής τάξης**

Με βάση το μοντέλο αυτό η απελευθέρωση του φαρμάκου αναπαρίσταται από την εξίσωση:

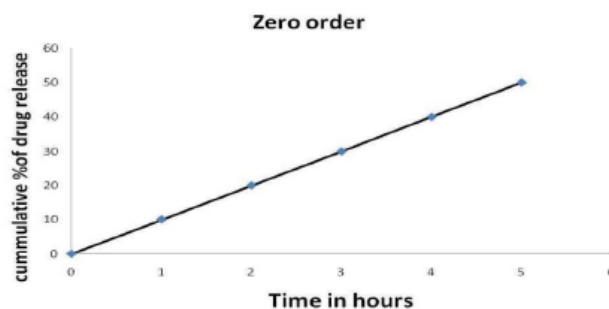
$$C_t = C_0 + K_0 \cdot t \quad (2)$$

Όπου:

C_t : η συγκέντρωση του φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί τη στιγμή t

C_0 : η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου

K_0 : η σταθερά μηδενικής τάξης



Εικόνα 13: Διάγραμμα κινητικής μηδενικής τάξης.

- **Πρώτης τάξης**

Με βάση το μοντέλο αυτό ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης εξαρτάται γραμμικά από το χρόνο, οπότε καταλήγει στην εξίσωση :

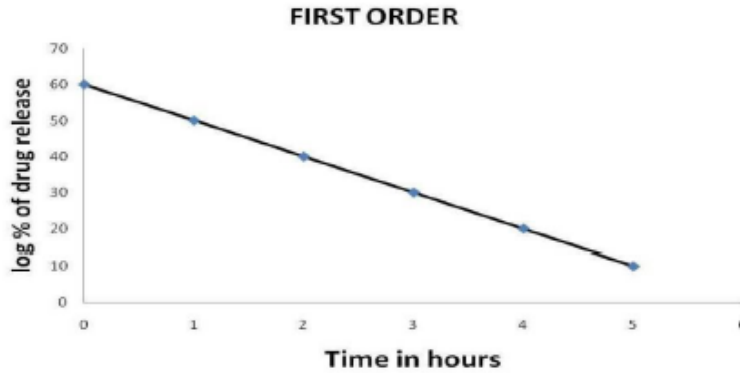
$$\ln C_t = \ln C_0 - K_1 \cdot t \quad (3)$$

όπου:

C_t : η συγκέντρωση του φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί τη στιγμή t

C_0 : η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου

K_1 : η σταθερά πρώτης τάξης



Εικόνα 14: Διάγραμμα κινητικής πρώτης τάξης.

- **Μοντέλο Higuchi**

Το μοντέλο Higuchi είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα στη φαρμακευτική για τη μελέτη της απελευθέρωσης. Ύστερα από απλοποιήσεις και παραδοχές η εξίσωση είναι :

$$Q = K_H \cdot t^{1/2} \quad (4)$$

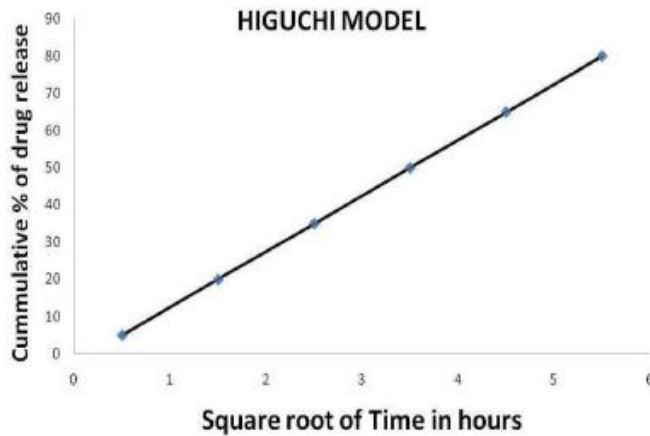
όπου:

Q: η συσσωρευμένη ποσότητα φαρμάκου που απελευθερώθηκε σε χρόνο t ανά μονάδα επιφάνειας

K_H : η σταθερά διάλυσης του Higuchi

Για την απλοποίηση των εξισώσεων οι παραδοχές είναι :

1. Η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου στο σύστημα είναι πολύ υψηλότερη της διαλυτότητας της μήτρας
2. Η συγκέντρωση του φαρμάκου που απελευθερώνεται δεν ξεπερνάει ποτέ το 10% της συγκέντρωσης κορεσμού
3. Η διαχυτότητα του φαρμάκου παραμένει σταθερή



Εικόνα 15: Διάγραμμα κινητικής μοντέλου Higuchi.

- **Μοντέλο Korsmeyer-Peppas**

Εφόσον έχει βρεθεί το μοντέλο της διάχυσης της απελευθέρωσης του φαρμάκου στη συνέχεια αναζητείται μοντέλο που προσομοιάζει την διάλυση. Το μοντέλο Korsmeyer-Peppas αποδίδει μια απλή σχέση για την διάλυση:

$$M_t/M = K_{sp} \cdot t^n \quad (5)$$

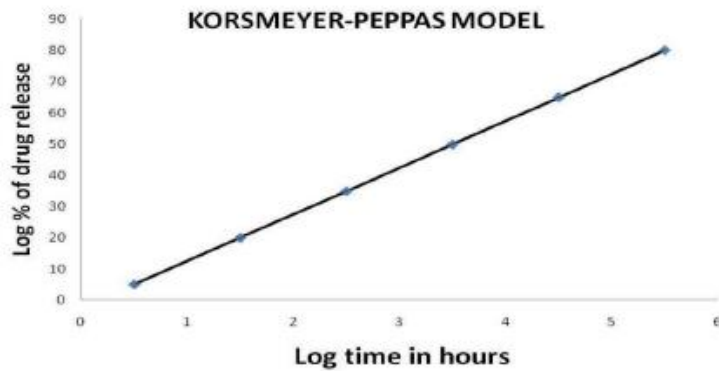
Όπου:

M_t : η ποσότητα του φαρμάκου που έχει απελευθερωθεί σε χρόνο t

M : η ποσότητα που απελευθερώνεται σε άπειρο χρόνο

n : ο εκθέτης της απελευθέρωσης

K_{sp} : η σταθερά Korsmeyer



Εικόνα 16: Διάγραμμα κινητικής μοντέλου *Korsmeyer-Peppas*.

- **Μοντέλο Hixson-Crowell**

Το μοντέλο αυτό περιγράφει τα συστήματα όπου υπάρχει αλλαγή στην επιφάνεια και στη διάμετρο των σωματιδίων ή των ταμπλετών. Λόγω της σχέσης όγκου-επιφάνειας των σωματιδίων προκύπτει ο εκθέτης $\frac{1}{3}$ στην εξίσωση:

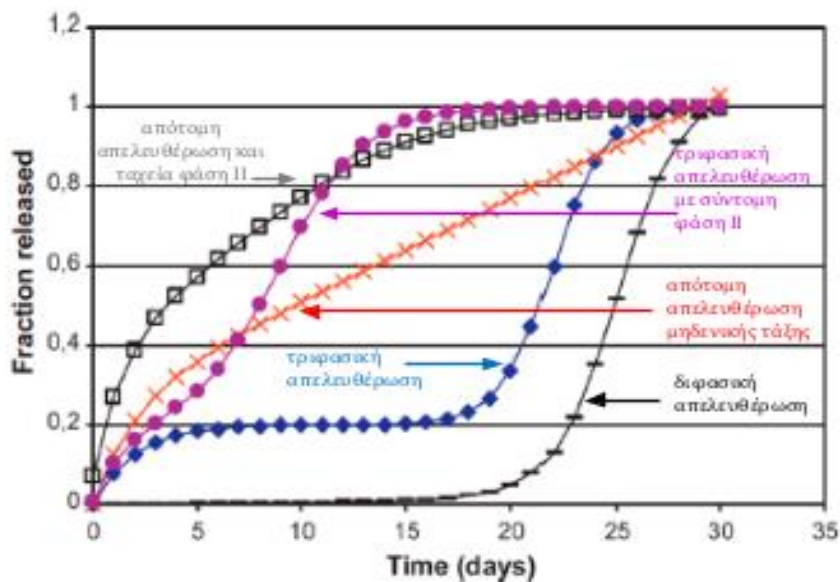
$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_{HC} \cdot t \quad (6)$$

Όπου:

W_0 : η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο σκεύασμα

W_t : η ποσότητα του υπολειπόμενου φαρμάκου στο σκεύασμα στο χρόνο t

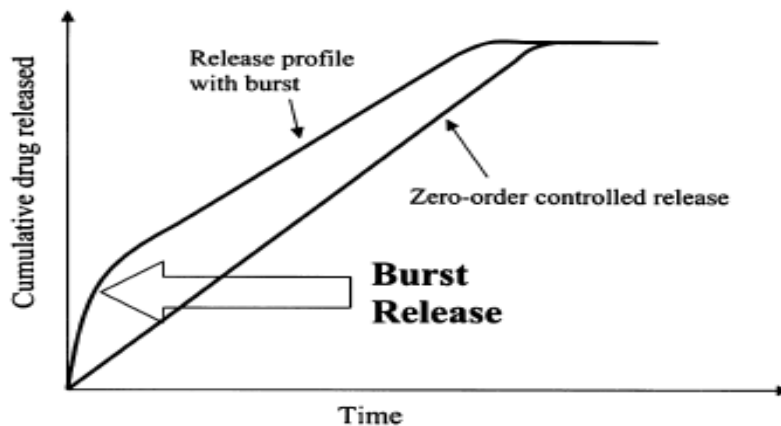
K_{HC} : η σταθερά Hixson-Crowell



Εικόνα 17: Απεικόνιση κινητικών απελευθέρωσης.

1.4.6. “Burst Effect”

Προφίλ τύπου “burst effect” προκύπτει όταν η ουσία απελευθερώνεται πολύ γρήγορα (“burst release”) όταν έρθει σε επαφή με το μέσο όπου γίνεται η απελευθέρωση. Το προφίλ που προκύπτει δείχνει μια ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης στην αρχή της απελευθέρωσης σε μικρό χρονικό διάστημα, ενώ μετά την πάροδο κάποιου χρόνου φτάνει σε ένα οριακό σημείο που ονομάζεται “plateau”. Απελευθέρωσης τύπου “burst release” συνήθως δεν είναι επιθυμητή, καθώς είναι απρόβλεπτη και μπορεί η υψηλή συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας να φθάνει σε τοξικά επίπεδα.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση “burst release” σε σύγκριση με μηδενικής τάξης.

1.3. Χαρακτηρισμοί

1.5.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Τα πρώτα φάσματα NMR έγιναν πρώτη φορά το 1938 στις ΗΠΑ, ενώ μερικά χρόνια αργότερα κυκλοφόρησε και ο πρώτος εμπορικός φασματογράφος NMR. Πρόκειται για μία από τις σημαντικότερες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης με τεράστιο εύρος εφαρμογών. Στηρίζεται στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, όπου οι πυρήνες της προς εξέτασης ένωσης εκπέμπουν ακτινοβολία σε χαρακτηριστικές συχνότητες, υπό κατάλληλες συνθήκες με τη χρήση μαγνητικού πεδίου. [16]

Συγκεκριμένα όταν στο δείγμα επιβληθεί ισχυρό μαγνητικό πεδίο αυτό θα απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων. Λόγω της απορρόφησης της ακτινοβολίας οι πυρήνες των ατόμων μεταβαίνουν από μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας σε μία υψηλότερης. Η μεταβολή αυτή γίνεται με αναστροφή του spin. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός.

Ένα φάσμα NMR είναι, όπως όλες οι φασματοσκοπικές τεχνικές, μια γραφική παράσταση της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα. Το συνηθισμένο εύρος συχνοτήτων στο NMR είναι 10-800 MHz. Μέσω του φάσματος NMR υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις, που δείχνουν τη διαφορά συχνοτήτων συντονισμού του προς εξέταση πυρήνα με τη συχνότητα συντονισμού αναφοράς. Στις οργανικές ενώσεις οι χαρακτηριστικές ομάδες (πυρήνες) εκπέμπουν σε συγκεκριμένες συχνότητες, συνεπώς το φάσμα NMR είναι κατάλληλο για την ταυτοποίηση ενώσεων. [17]

1.5.2. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μία μη επεμβατική, σύντομης διάρκειας, σχετικά οικονομική και εύκολη στην πραγματοποίηση μέθοδος προσδιορισμού του μεγέθους σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς PDI και του ζ-δυναμικού.

Για τον προσδιορισμό των επιθυμητών μεγεθών η μέθοδος βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης. Ακτίνα λέιζερ περνά από μονοχρωμάτορα και φωτοβολεί το δείγμα και λόγω των υπάρχοντων σωματιδίων, τμήμα της ακτινοβολίας σκεδάζεται. Τα διεσπαρμένα σωματίδια μέσα στο διαλύτη ακολουθούν κίνηση Brown και η ταχύτητα τους εξαρτάται από το μέγεθος τους. Λόγω της κίνησης αυτής υπάρχει διακύμανση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Από τη συνάρτηση αυτή και με κατάλληλες συσχετίσεις ανάλογα με το δείγμα υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης. Για να υπολογιστεί η υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιείται η εξίσωση Stokes-Einstein :

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (7)$$

Όπου :

d_H : υδροδυναμική διάμετρος

k_B : σταθερά Boltzmann

T : απόλυτη θερμοκρασία

η : ιξώδες του μέσου διασποράς

D_T : συντελεστής διάχυσης

Η υδροδυναμική διάμετρος πέρα από το πραγματικό μέγεθος των σωματιδίων, λαμβάνει υπόψη τη στιβάδα επιδιάλυτωσης / ενυδάτωσης της επιφάνειας τους. Συνεπώς η υδροδυναμική διάμετρος μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση των σωματιδίων στη διασπορά καθώς και τη συγκέντρωση και τον τύπο των ιόντων του μέσου διασποράς.

Ο δείκτης πολυδιασποράς δείχνει την ομοιομορφία του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος. Όσο πιο κοντά στο μηδέν είναι η τιμή του, τόσο μικρότερη διακύμανση μεγέθους υπάρχει μεταξύ των νανοσωματιδίων. Γενικά μια τιμή του PDI πάνω από 0.20 δείχνει σημαντική διακύμανση στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Τα συστήματα με μικρή διακύμανση στα μεγέθη των νανοσωματιδίων προτιμώνται για την ομοιομορφία που παρέχουν.

Τα στερεά σωματίδια μέσα σε ένα υγρό μέσο έχουν φορτίο με πρόσημο αντίστοιχο με το πρόσημο του φορτίου των ομάδων που αποτελούν το σωματίδιο και των προσροφημένων ιόντων από το μέσο διασποράς. Υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση ιόντων γύρω από το σωματίδιο ανάλογα με το πρόσημο του φορτίου των σωματιδίων. Σχηματίζονται δύο υγρές στιβάδες, προσκολλημένη στο σωματίδιο η στιβάδα Stern και γύρω από αυτή η εξωτερική στιβάδα. Στην εξωτερική στιβάδα όπως πριν με το σωματίδιο, υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση ιόντων με φορτίο ανάλογο με τη στιβάδα Stern. Γύρω από κάθε σωματίδιο προκύπτει μία διπλοστιβάδα ιόντων.

Το ζ-δυναμικό δείχνει τη σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος. Όσο πιο μακριά από το μηδέν είναι η τιμή του, τόσο μεγαλύτερη τάση έχουν τα σωματίδια να απωθούνται και συνεπώς για τιμές κοντά στο + και - 30 mV η διασπορά θεωρείται ότι δεν συσσωματώνεται και είναι σταθερή.

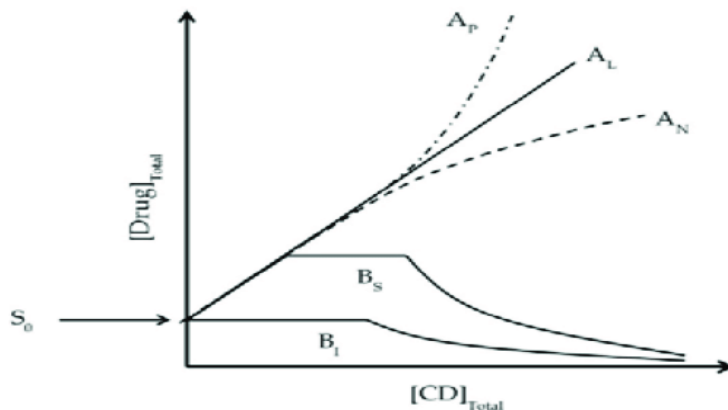
1.5.3. Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η ανάλυση TGA είναι μια απλή, καταστρεπτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας, οξειδωτικής σταθερότητας, χημικής σύνθεσης και περιεχόμενο νερού της προς ανάλυση ένωσης. Η ποσότητα του δείγματος θερμαίνεται σε φούρνο με συγκεκριμένο ρυθμό και ζυγίζεται κατά τη διάρκεια της θέρμανσης. Τελικά προκύπτει διάγραμμα συσχέτισης της μάζας με τη θερμοκρασία. Πρόκειται για μία τεχνική χαμηλού κόστους που όμως μπορεί για διάφορους λόγους να αδυνατεί να δώσει έμπιστα και σαφή αποτελέσματα. [18]

Στο γράφημα εξετάζονται οι μεταβολές στη μάζα ανάλογα με τη θερμοκρασία. Το θερμοκρασιακό εύρος αλλά και ο ρυθμός θέρμανσης ρυθμίζονται από τον πειραματιστή. Στο γράφημα οι μεταβολές μάζας σε χαμηλές θερμοκρασίες θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την απώλεια κρυσταλλικών νερών. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες παρατηρείται διάσπαση της ουσίας.

1.6 Μελέτη Διαλυτότητας (phase solubility)

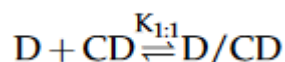
Η μελέτη phase solubility εξετάζει πως μεταβάλλεται η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας του φαρμάκου, όσο μεταβάλλεται η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης. Ανάλογα με τον τύπο διαγράμματος που προκύπτει, σύμφωνα με τον Higuchi και Connors, συμπεραίνεται και αν η διαλυτότητα του συμπλόκου εγκλεισμού είναι: διαλυτό με θετική απόκλιση (AP), διαλυτό γραμμικά (AL), διαλυτό με αρνητική απόκλιση (AN), με περιορισμένη διαλυτότητα (BS) ή αδιάλυτο (BL). [19]



Εικόνα 19: Πιθανά διαγράμματα phase solubility. [4]

Στα συστήματα κυκλοδεξτρινών μπορούν να προκύψουν διαγράμματα τύπου B, που υποδηλώνουν περιορισμένη ή καθόλου διαλυτότητα. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης έχουν την τάση να συσσωματώνονται, ειδικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις πράγμα που τα κάνει να φέρονται σαν μεγάλα μικροσωματίδια που δεν διαλυτοποιούνται. Προβλήματα στη διαλυτότητα παρουσιάζουν κυρίως οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες, καθώς οι τροποποιημένες έχουν κατάλληλες πλευρικές ομάδες ώστε να βελτιώνεται η διαλυτότητα τους.

Όταν η στοιχειομετρία ουσίας και κυκλοδεξτρίνης είναι 1:1, ορίζεται ως σταθερά $K_{1:1}$:



Όπου

D : συγκέντρωση της ουσίας

CD : συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης

D/CD : σύμπλοκο εγκλεισμού

Η τιμή της $K_{1:1}$ μπορεί να υπολογιστεί με βάση το διάγραμμα phase solubility ως :

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{S_0 \cdot (1 - \text{Slope})} \quad (8)$$

Όπου

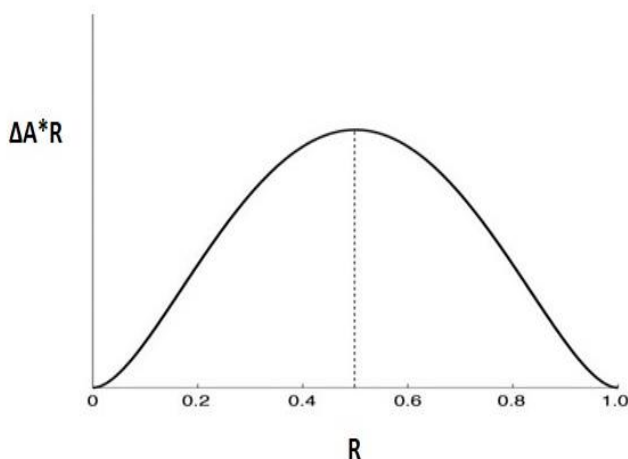
S_0 : είναι διαλυτότητα της ουσίας χωρίς την παρουσία φορέα

Slope : η κλίση του διαγράμματος phase solubility στην περίπτωση A₁

Γενικώς τα φάρμακα ταξινομούνται ανάλογα με τη διαλυτότητα τους και την ικανότητα τους να απορροφούνται από τα έντερα σε αντίστοιχες κλάσεις. Στην πρώτη κλάση ανήκουν τα φάρμακα με επαρκή διαλυτότητα και καλή απορρόφηση από την γαστρεντερική οδό. Στη δεύτερη κλάση ανήκουν φάρμακα με ανεπαρκή διαλυτότητα στο νερό, απορροφούνται όμως εύκολα από τη γαστρεντερική οδό όταν βρίσκονται σε διάλυμα. Για τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων κύριο ρόλο παίζει η διάλυση. Στην τρίτη κλάση ανήκουν φάρμακα με επαρκή διαλυτότητα στο νερό αλλά ανεπαρκή απορροφητικότητα από τη γαστρεντερική οδό. Αυτό οφείλεται στο ότι τα φάρμακα αυτά είναι πολύ υδρόφιλα. Τέλος στην τέταρτη κλάση ανήκουν φάρμακα που έχουν ταυτόχρονα χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν απορροφούνται εύκολα από τη γαστρεντερική οδό.

1.7. Μελέτη Job's plot

Η μέθοδος συνεχούς διακύμανσης ή Job's plot είναι μια απλή και διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρικής αναλογίας μια αντίδρασης ισορροπίας. Τα περισσότερα συστήματα εγκλεισμού έχουν αναλογία ένωσης : φορέα 1:1 ($R = 0.5$), ωστόσο μπορεί να προκύψει 1:2 ($R = 0.33$) ή 2:1 ($R = 0.66$) αναλογία. Η μέτρηση της απορρόφησης του κάθε μίγματος γίνεται μέσω UV-Vis. Το μέγιστο ή το ελάχιστο του διαγράμματος δίνει το καταλληλότερο σημείο τους αναλογίας τους. [20]



Εικόνα 20: Job's plot, $R = \frac{[ένωση]}{[ένωση]+[β-CD]}$, ΔA = διαφορά απορρόφησης της ένωσης με και χωρίς β -CD.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός των ενώσεων λεβοντόπα (L-DOPA) και ντοπαμίνη (DA) στους φορείς β-κυκλοδεξτρίνη (β -CD), 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (HP- β -CD) και Μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me- β -CD και ο εγκλεισμός των υπερμοριακών συμπλόκων ντοπαμίνης (DA- β -CD) σε νανοσωματίδια χιτοζάνης σχηματίζοντας διπλό σύστημα φορέων παρατεταμένης αποδέσμευσης. Τα νανোসυστήματα αυτά στοχεύουν στη βελτίωση των ιδιοτήτων των ενώσεων, συγκεκριμένα στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητάς τους. Για την παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού εξετάζονται δύο μέθοδοι : η μέθοδος λειοτρίβησης (kneading) και η μέθοδος συγκαταβύθισης (co-precipitation). Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με εγκλεισμένα τα υπερμοριακά σύμπλοκα χρησιμοποιείται η μέθοδος της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης. Πραγματοποιείται η μέθοδος συνεχών μεταβολών (Job's plot) για να διαπιστωθεί η κατάλληλη αναλογία ένωσης-φορέα για τις παρασκευές των συμπλόκων καθώς και μελέτες διαλυτότητας.

Πραγματοποιήθηκε πλήρης χαρακτηρισμός των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν. Για κάθε σύμπλοκο προσδιορίζεται η απόδοση εγκλεισμού και η απόδοση διεργασίας. Το μέγεθος των σωματιδίων, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό προσδιορίζονται με χρήση της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Ο δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιείται με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Οι θερμικές ιδιότητες των συμπλόκων μελετώνται μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA).

Επιπλέον, για τα σύμπλοκα εγκλεισμού και τα νανοσωματίδια πραγματοποιήθηκε μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης σε συγκεκριμένες συνθήκες ώστε να προσομοιάζει το περιβάλλον του οργανισμού. Στη συνέχεια γίνεται κινητική μοντελοποίηση ώστε να διαπιστωθεί σε ποιο μοντέλο από τα : μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi και Korsmeyer-Peppas προσαρμόζονται καλύτερα τα δεδομένα.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Όργανα και συσκευές

2.1.1. Όργανα χαρακτηρισμών

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Το όργανο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού που χρησιμοποιείται ανήκει στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και είναι συγκεκριμένα το μοντέλο Varian V300 MHz και V600MHz. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται δευτεριωμένο νερό (D₂O), το φάσμα αποδίδει τις χημικές μετατοπίσεις σε ppm, τις σταθερές σύζευξης (J) σε Hz, πολλαπλότητα κορυφής ανάλογα με τις κατηγορίες: singlet-s, doublet-d, triplet-t, quartet-q, multiplet-m, broad-br, double of doublets-dd, triple of triplets-tt και triplet of doublets-td. Η επεξεργασία του φάσματος γίνεται με χρήση του λογισμικού MestReNova.

Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Το όργανο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ονομάζεται Zetasizer Nano ZS. Τα δείγματα εισέρχονται σε ειδική κυψελίδα με προσοχή ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες και να ακουμπούν σωστά τα ηλεκτρόδια. Ως έξοδο δίνει μέτρηση για το ζ-δυναμικό και το δείκτη πολυδιασποράς τα οποία μετράει περισσότερες από μία φορές για λόγους επαλήθευσης.

Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA)

Το όργανο TGA είναι TGA/DSC 1 STAR e System Thermobalance (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA). Για τη μέτρηση τα δείγματα τοποθετούνται σε σκεύος κατάλληλου υλικού και θερμαίνονται από τους 25°C στους 600°C με σταθερό ρυθμό 10°C/min. Για την επίτευξη των επιθυμητών αδρανών συνθηκών στο φούρνο ρέει αέριο άζωτο με ρυθμό 10mL/min.

2.1.2. Φασματοφωτοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis)

Η διάταξη που χρησιμοποιείται είναι η UV-Vis V-770 UV-VIS JascoH του εργαστηρίου οργανικής χημείας. τεχνική αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς στη συγκεκριμένη εργασία μαζί με το φθορισμό για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Στο UV-Vis η ακτινοβολία απορροφάται μεταξύ 190-800nm, από τα μόρια της διαλυμένης ουσίας που έχουν υποστεί ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Οι περιοχές χωρίζονται σε εγγύς υπεριώδες φάσμα (190-400nm) και ορατό φάσμα (400-800nm). Δεν απορροφούν όλα τα μόρια στα συγκεκριμένα μήκη κύματος, παρά μόνο αυτά που έχουν χρωμοφόρες ομάδες, δηλαδή ακόρεστες ομάδες και μη δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων. Η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας προσδιορίζεται με το νόμο Lambert-Beer. Για τη συσχέτιση απορρόφησης και συγκέντρωσης στη γραμμική περιοχή κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς είναι απαραίτητη για κάθε ουσία που μελετάται.

$$\text{Εξίσωση Lambert-Beer: } A = -\log T = -\log(I/I_0) = \epsilon bc \quad (9)$$

Όπου,

A: η απορροφητικότητα

I_0 : η αρχική ένταση της ακτινοβολίας

I: η ένταση της ακτινοβολίας που διέρχεται από το δείγμα μετά την μερική απορρόφηση της από αυτό

T: η διαπερατότητα

ϵ : η μοριακή απορροφητικότητα

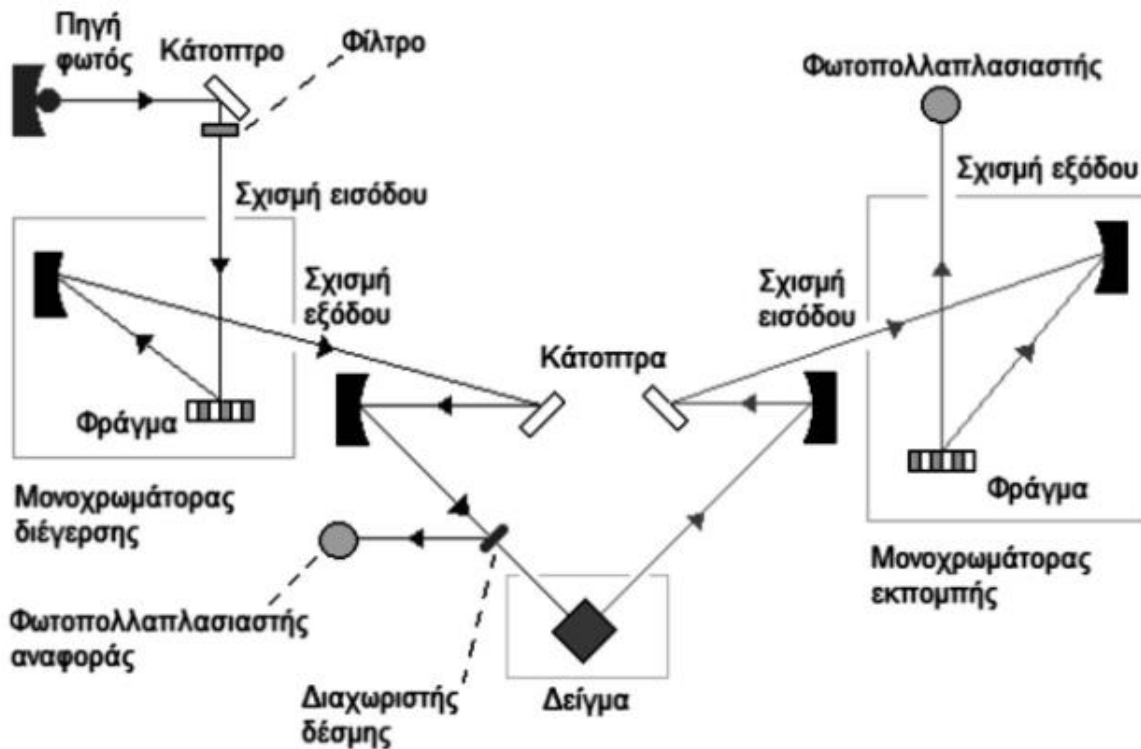
b: το πάχος της κυψελίδας

C: η συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα

2.1.3. Φασματοσκοπική συσκευή φθορισμού

Για την αξιολόγηση δειγμάτων, εκτός από συσκευή UV-Vis χρησιμοποιήθηκε και συσκευή φθορισμού του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Ηλεκτρονικών Υπολογιστών.

Το όργανο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ντοπαμίνης και λεβοντόπας ενώ έχουν υποστεί οξείδωση, καθώς το UV-Vis αδυνατεί να διαχωρίσει τις οξειδωμένες μορφές της ντοπαμίνης και της λεβοντόπας από τα κανονικά μόρια, καθώς αυτά φαίνονται να απορροφούν στα ίδια ή σε πολύ κοντινά μήκη κύματος.



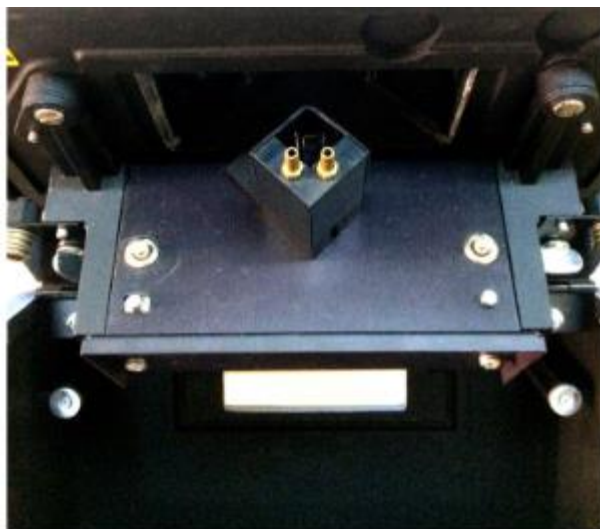
Εικόνα 21: Διάταξη φθορισμού σχηματικά.

Η συσκευή είναι Perkin-Elmer LS45 Luminescence Spectrometer. Η συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να ανιχνεύει ολόκληρα φάσματα αλλά και συγκεκριμένα μήκη κύματος. Για τον έλεγχο της χρησιμοποιείται το λογισμικό FL Winlab.

Οι μετρήσεις που έγιναν για τα συγκεκριμένα πειράματα απαιτούσαν εξέταση του φάσματος, συνεπώς σαν είσοδο η διάταξη λαμβάνει το μήκος κύματος όπου θα γίνει η διέγερση, στην περίπτωση της DA τα 280nm και το φάσμα όπου θα δώσει 200-500nm. Το όργανο δέχεται μία κυψελίδα τη φορά, συνεπώς η βαθμονόμηση με γραμμή αναφοράς (baseline) γίνεται με τον κατάλληλο διαλύτη, στην προκειμένη περίπτωση αιθανόλη, μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα, και στη συνέχεια ο διαλύτης απορρίπτεται για να χρησιμοποιηθεί η κυψελίδα για την μέτρηση. Η κυψελίδα δέχεται 3ml ουσίας προς μέτρηση. Το όργανο αυτό διαθέτει σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία από το UV-Vis που χρησιμοποιείται, αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύει είναι δύο περίπου τάξεις μεγέθους μικρότερες από το UV-Vis, συνεπώς οι μετρήσεις του θεωρούνται αρκετά αξιόπιστες.



Εικόνα 22: Εξωτερική όψη διάταξης φθορισμού.



Εικόνα 23: Σημείο τοποθέτησης κυψελίδας στη διάταξη φθορισμού.

2.1.4. Συμπληρωματικές συσκευές

- Φυγόκεντρος ALC K-40
- Vortex ZX4 Velp
- Περιστροφικός Εξατμιστήρας(Rotary) RotavaporR-114 Buchi
- Συσκευή υπερήχων 2210 Ultrasonic Bath Branson
- Αντλία Υψηλού Κενού RV-5 Edwards
- Ζυγός ακριβείας, Explorer OHAUS

2.2. Αντιδραστήρια

Για τους εγκλεισμούς και τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν :

- Ντοπαμίνη (Dopamine Hydrochloride) από Alfa Aesar
- L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) από Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States)
- β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) καθαρότητας >99% από Fluka (Gillingham, England)
- 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) από Acros Organics - Fisher Scientific (New Jersey, United States)
- Μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-CD) καθαρότητας >99% από Glentham Life Sciences
- Χιτοζάνη από Glentham Life Sciences

Συμπληρωματικά:

- Ασκορβικό οξύ
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- NaOH
- Θειικό οξύ
- Μεθανόλη
- αιθανόλη,
- φωσφορικά άλατα
- Sodium Tripoliphosphate (TPP)
- Οξικό οξύ

2.3. Αρχικές μελέτες

2.3.1. Μελέτη Job's Plot

Παρασκευάζονται διαλύματα DA/ β -CD και σκέτης DA συγκεντρώσεων από 0 μέχρι 100 μ M σε διαλύτη αιθανόλη/νερό 2:3 v/v. Σε κάθε διάλυμα μετριέται η απορρόφηση με χρήση UV-Vis και κατασκευάζεται διάγραμμα το οποίο στον άξονα X έχει τον όρο R ο οποίος εκφράζεται ως $R = [DA]/([DA] + [\beta\text{-CD}])$ και στον άξονα Y έχει τον όρο $\Delta A \cdot R$ όπου ΔA είναι η διαφορά απορρόφησης των διαλυμάτων DA, με και χωρίς β -CD.

2.3.2. Μελέτη Phase Solubility

Παρασκευάζονται διαλύματα περίσσειας DA 10mmol/L και διαλύματα β -CD με συγκεντρώσεις από 0 έως 5mmol/L στους 37°C. Τα διαλύματα αναμειγνύονται και αφήνονται για 2h όπου φτάνουν σε ισορροπία. Η ποσότητα διεσπαρμένης DA μετριέται με χρήση UV-Vis. Η μέθοδος αυτή για τη μελέτη Phase solubility έχει αναπτυχθεί από τους Higuchi και Connors.

2.4. Παρασκευές νανοσωματιδίων

2.4.1. Παρασκευή Συμπλόκων Εγκλεισμού με τη μέθοδο

Λειοτρίβησης

Για τη μέθοδο λειοτρίβησης (kneading), στην κατάλληλη αναλογία τοποθετούνται σε ιγδίο DA ή η L-DOPA και η συγκεκριμένη κυκλοδεξτρίνη. Προστίθενται μερικές σταγόνες μίγμα μεθανόλης/νερού αναλογίας 3:2 (v/v) και γίνεται λειοτρίβηση για 40-45 min. Μετά τα 40-45 min και αφού έχει φύγει η περισσότερη υγρασία, τα παραγόμενα σύμπλοκα μεταφέρονται στην αντλία για πλήρη ξήρανση για περίπου 48 ώρες. Οι αναλογίες των συστατικών υποδεικνύονται από τη μελέτη με τη μέθοδο Job's plot.

Τα παραγόμενα σύμπλοκα και ενδεικτικές αναλογίες εγκλεισμένης ουσίας και κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 : Αναλογίες παρασκευής συμπλόκων DA.

Σύμπλοκο	Αναλογία DA:β-CD (mol)
DA-β-CD	1:1
DA-β-CD	2:1
DA-HP-β-CD	1:1
DA-HP-β-CD	2:1
DA-Me-β-CD	1:1

Πίνακας 2 : Αναλογίες παρασκευής συμπλόκων L-DOPA.

Σύμπλοκο	Αναλογία DA:β-CD (mol)
L-DOPA – β-CD	1:1
L-DOPA – β-CD	2:1
L-DOPA – HP-β-CD	1:1

2.4.2. Παρασκευή Συμπλόκων Εγκλεισμού με τη μέθοδο Συγκαταβύθισης

Σε μίγμα μεθανόλης νερού 1:2(v/v) προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης. Το μίγμα διατηρείται στους 55 °C και προστίθεται η DA και τα δημιουργούμενα σύμπλοκα συγκαταβυθίζονται και φιλτράρονται. Ακολουθεί ξήρανση των συμπλόκων σε αντλία υψηλού κενού. Η μέθοδος αυτή έδωσε μικρές αποδόσεις σε σχέση με τη kneading και συνεπώς δεν χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τα συγκεκριμένα σύμπλοκα. Η ποσότητες κυκλοδεξτρίνης και DA που χρησιμοποιούνται είναι τέτοιες ώστε να υπάρχει στοιχειομετρική αναλογία 1:1.

2.4.3. Εγκλεισμός των υπερμοριακών συμπλόκων ντοπαμίνης σε νανοσωματίδια χιτοζάνης με τη μέθοδο της Ιονοτροπικής Πηκτωμάτωσης

Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs) που περιέχουν ICs χρησιμοποιείται χαμηλού μοριακού βάρους χιτοζάνη. Ο λόγος χιτοζάνης προς ICs είναι 2:1 , ενώ προστίθεται και TPP σε ποσότητα υποτετραπλάσια της χιτοζάνης. Τα συστατικά αυτά προστίθενται σε μίγμα 2% v/v οξικού οξέος ώστε το τελικό μίγμα να είναι 0.3% w/v περιεκτικότητας σε χιτοζάνη. Ακολουθεί μαγνητική ανάδευση για 45 min. Στη συνέχεια η διασπορά των νανοσωματιδίων υπερφυγοκεντρείται στα 28.000 rpm και 4°C για 40 min, τα νανοσωματίδια που συλλέγονται επαναδιασπείρονται με τη βοήθεια vortex. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για την ικανοποιητική έκπλυση των σωματιδίων¹. Τέλος τα σωματίδια λυοφιλοποιούνται (freeze drying) στους -50°C για 48 ώρες και παραλαμβάνονται ξηρά.

2.5. Προσδιορισμός αποδόσεων

2.5.1. Προσδιορισμός απόδοσης διεργασίας για τις παρασκευές των συμπλόκων

Η απόδοση διεργασίας νανοσωματιδίων /συμπλόκων εγκλεισμού υπολογίζεται από την ολική ποσότητα των νανοσωματιδίων που συλλέγονται και από τις ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Απόδοση Διεργασίας(\%)} = \frac{\text{Ολική ποσότητα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε(mg)}}{\text{Σύνολο αρχικών ποσοτήτων συστατικών(mg)}} * 100 \% \quad (10)$$

2.5.2. Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Η απόδοση εγκλεισμού δείχνει την ποσότητα της ουσίας που εγκλείστηκε σαν ποσοστό της συνολικής ποσότητας ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Οι αποδόσεις εγκλεισμού ανάλογα το σύστημα έχουν μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές τους και είναι επιθυμητό να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερες. Για τον προσδιορισμό της 10mg του εκάστοτε συμπλόκου, μετά την ξήρανση, διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη, που εδώ είναι μεθανόλη, αιθανόλη ή υδατικό διάλυμα συγκεκριμένου pH. Το μίγμα αφήνεται προς ανάδευση για τουλάχιστον 48 ώρες, ώστε να απελευθερωθεί όλη η ποσότητα ουσίας που είναι εγκλεισμένη. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης πρέπει το μίγμα να βρίσκεται σε σκιερό μέρος, σκεπασμένο όσο καλύτερα γίνεται, καθώς οι ουσίες που μελετώνται είναι πολύ ευαίσθητες σε οξείδωση με το φως του ήλιου.

Μετά την πάροδο των 48 ωρών το μίγμα προσδιορίζεται η ποσότητα ουσίας που περιέχει με χρήση των διατάξεων UV-Vis και φθορισμού. Στην περίπτωση που το μίγμα είναι θολό, πριν τη μέτρηση το μίγμα φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου 25μm. Η απόδοση εγκλεισμού τελικά δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού(\%)} = \frac{\text{Μάζα ουσίας που εγκλείστηκε}}{\text{Αρχική μάζα ουσίας που ζυγίζεται}} * 100\% \quad (11)$$

2.6. Μελέτη απελευθέρωσης

2.6.1. Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

Το ρυθμιστικό παρασκευάζεται με φωσφορικά άλατα. Η τιμή του pH ρυθμίζεται σε πεχάμετρο. Επειδή η οξείδωση των ουσιών που χρησιμοποιούνται στο πείραμα είναι έντονη και ταχεία, κρίθηκε σκόπιμη η χρήση αντιοξειδωτικών, για τον όσο το δυνατό περιορισμό της οξείδωσης. Συνεπώς πριν μετρηθεί το pH του ρυθμιστικού, στο όξινο διάλυμα προστίθενται 17.6mg ασκορβικό οξύ και 14.6mg EDTA. Το διάλυμα που προκύπτει είναι συγκέντρωσης 1μM ασκορβικού και 0.5μM EDTA.

2.6.2. Πρώτη μέθοδος μελέτης απελευθέρωσης

Για τη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης απαιτείται πρώτα η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH 7.4, όπως περιγράφεται παραπάνω. Χρησιμοποιούνται οκτώ φιαλίδια των 3ml σε καθένα από τα οποία προστίθεται 5mg συμπλόκου.

Στη συνέχεια προστίθενται 2ml ρυθμιστικού διαλύματος και τα α φιαλίδια τοποθετούνται σε επωαστήρα απουσία φωτός με ανάδευση στα 100rpm και σταθερή θερμοκρασία στους 37°C που προσομοιάζει τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος.

Η δειγματοληψία γίνεται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Για τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που περιέχουν ICs η δειγματοληψία παρατείνεται καθώς απαιτείται περισσότερος χρόνος για την απελευθέρωση της ουσίας. Το κάθε δείγμα μόλις συλλεχθεί, φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου 22μm και τη βοήθεια σύριγγας και απομονώνεται η ουσία που έχει απελευθερωθεί.

Στη συνέχεια γίνεται προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας με φασματοσκόπια υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και φασματοσκοπία φθορισμού.



Εικόνα 24 : Σχηματική απεικόνιση της πρώτης μεθόδου μελέτης του προφίλ απελευθέρωσης.

2.6.3. Δεύτερη μέθοδος μελέτης απελευθέρωσης

Παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 7.4. Ζυγίζονται 150mg συμπλόκου και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 250ml. Στη φιάλη προστίθεται 25ml ρυθμιστικού διαλύματος και υπόκεινται σε μαγνητική ανάδευση στους 37°C. Στην κορυφή του ψυκτήρα τοποθετείται ένα μπαλόνι με άζωτο, για την επίτευξη μη οξειδωτικών συνθηκών. Πραγματοποιείται δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Παραλαμβάνονται 2ml δείγματος από τη σφαιρική φιάλη και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 min στις 10,000 στροφές και 4°C. Το υπερκείμενο αναλύεται με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και με φασματοσκοπία φθορισμού. Το ίζημα επαναδιασπείρεται με ρυθμιστικό διάλυμα με τη βοήθεια vortex και επιστρέφει στη σφαιρική φιάλη.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της δεύτερης μεθόδου μελέτης του προφίλ απελευθέρωσης.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1. Αρχικές μελέτες

3.1.1. Job's plot

Η στοιχειομετρία μεταξύ ένωσης που εγκλείεται και β-CD μπορεί να προβλεφθεί με τη μέθοδο Job's plot. Η τιμή του R στη μέγιστη διακύμανση δίνει τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εγκλεισμού. Αν $R = 0.33$ τότε ένωση : β-CD είναι 1:2, αν $R = 0.5$ τότε ένωση : β-CD 1:1 και αν $R = 0.66$ τότε ένωση : β-CD είναι 2:1. Οι μετρήσεις γίνονται σε διάλυμα αιθανόλης-νερό 2:3 v/v. Με βάση τη μέτρηση των δειγμάτων στο UV-Vis κατασκευάζεται ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 : Στοιχεία με τα οποία κατασκευάζεται το Job's plot.

Συγκέντρωση DA(μM)	Συγκέντρωση β-CD (μM)	R	ΔA*R
0	100	0	0.01262875
10	90	0.1	0.0236152
20	80	0.2	0.0459273
30	70	0.3	0.0689796
40	60	0.4	0.098381
50	50	0.5	0.1341978
60	40	0.6	0.1603392
70	30	0.7	0.1042216
80	20	0.8	0.1042216
90	10	0.9	0.045432
100	0	1	0

Με τις δύο τελευταίες στήλες κατασκευάζεται το Job's plot ως εξής.



Διάγραμμα 1 : Job's plot. $R = \frac{[ένωση]}{[ένωση]+[β-CD]}$, ΔA = διαφορά απορρόφησης της ένωσης με και χωρίς β -CD.

Όπως απεικονίζεται και στο παραπάνω γράφημα (Διάγραμμα 1) το $R=0.66$, συνεπώς συμπεραίνεται ότι για το σύμπλοκο εγκλεισμού DA- β -CD η κατάλληλη στοιχειμετρική αναλογία είναι 2:1.

3.1.2. Μελέτη Phase solubility

Η μελέτη Phase solubility γίνεται για τα συστήματα DA με β -CD, Me- β -CD και HP- β -CD. Η μέθοδος που ακολουθείται περιγράφεται από τους Higuchi και Connors. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται οι σταθερές K_s και αξιολογείται η επίδραση του εγκλεισμού σε ουσίες που δεν παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα. Η K_s υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο :

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{S_0 \cdot (1 - \text{Slope})}$$

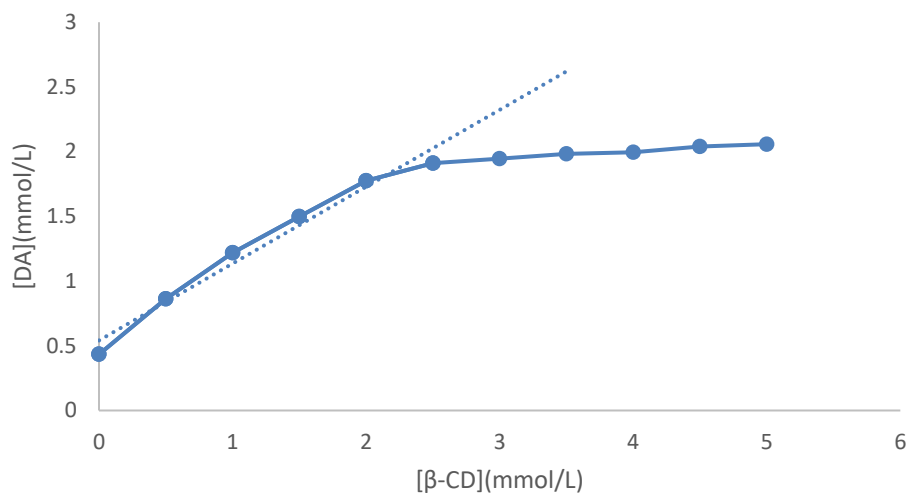
Όπου

$$K_s = K_{1:1}$$

S_0 : είναι διαλυτότητα της ουσίας χωρίς την παρουσία φορέα

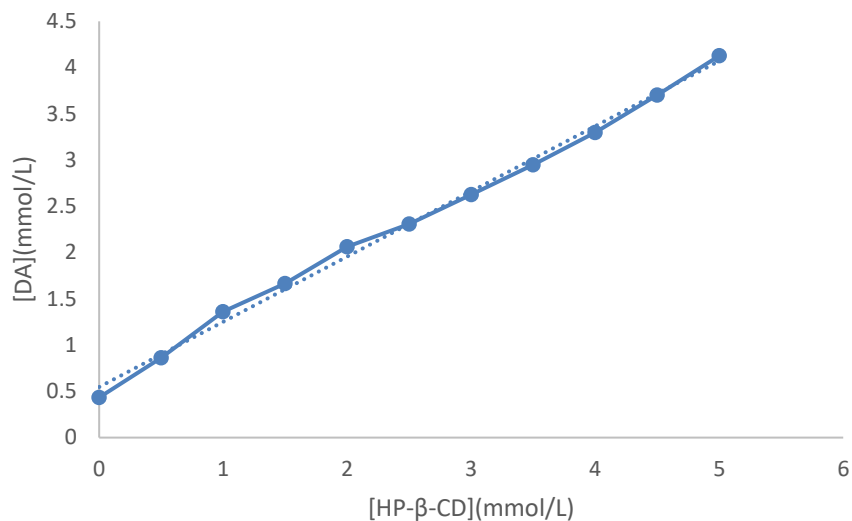
Slope : η κλίση του διαγράμματος phase solubility στην περίπτωση A₁

Δίνονται τα διαγράμματα που προέκυψαν για τα συστήματα :



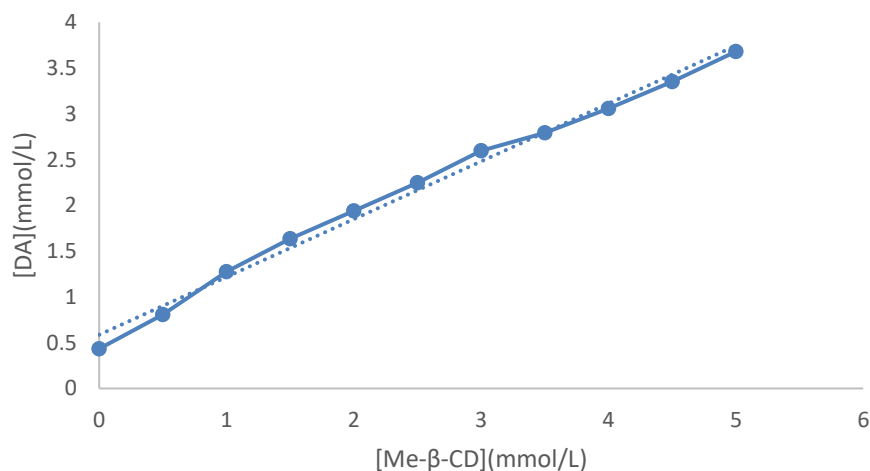
Διάγραμμα 2 : Μελέτη Phase solubility για το σύστημα DA-β-CD.

Από το διάγραμμα (Διάγραμμα 2) DA-β-CD υπολογίζεται η $K_s = 3372M^{-1}$. Πρόκειται για σχετικά χαμηλή τιμή. Αυτό αποδίδεται στη σχετικά μικρή διαλυτότητα που έχει από τη φύση της η β-CD και στη δυσκολία της ένωσης να σχηματίσει σταθερά σύμπλοκα.



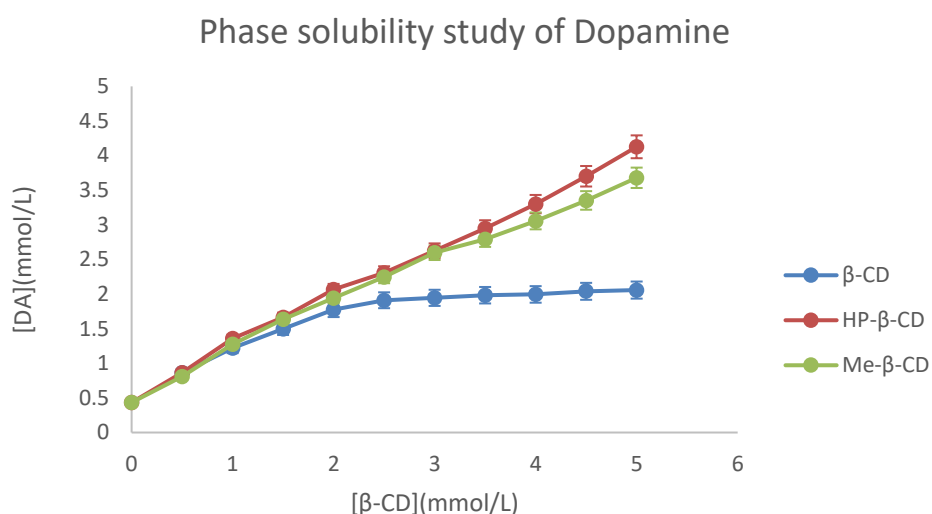
Διάγραμμα 3 : Μελέτη Phase solubility για το σύστημα DA-HP-β-CD.

Από το διάγραμμα (Διάγραμμα 3) DA-HP-β-CD υπολογίζεται $K_s = 5519M^{-1}$. Η τιμή της K_s είναι ικανοποιητική υποδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός υπερμοριακών συμπλόκων με την τροποποιημένη HP-β-CD ευνοείται θερμοδυναμικά. Είναι γνωστό ότι η HP-β-CD παρουσιάζει αυξημένη διαλυτότητα συγκριτικά με την β-CD.



Διάγραμμα 4 : Μελέτη Phase solubility για το σύστημα DA-Me-β-CD.

Από το διάγραμμα (Διάγραμμα 4) DA-Me-β-CD υπολογίζεται $K_s = 3971M^{-1}$. Όπως και στην περίπτωση της HP-β-CD η υποκατάσταση με την ομάδα του μεθυλίου δίνει στο σύστημα ικανοποιητική διαλυτότητα. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5 : Συγκεντρωτικό διάγραμμα της μελέτης *Phase solubility*.

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα της μελέτης *phase solubility*.

	Εξίσωση	$K_s (M^{-1})$
β-CD-DA	$y = 0.2962x + 0.8706$	974
HP-β-CD-DA	$y = 0.7049x + 0.5467$	5519
Me-β-CD-DA	$y = 0.6314x + 0.5867$	3971

3.2. Αποδόσεις

3.2.1. Αποδόσεις διεργασίας

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας όπως υπολογίστηκαν για τα σύμπλοκα. Η απόδοση υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση :

$$\text{Απόδοση Διεργασίας(\%)} = \frac{\text{Ολική ποσότητα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε}}{\text{Σύνολο αρχικών ποσοτήτων συστατικών}} * 100 \%$$

Πίνακας 5 : Αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων DA.

Σύμπλοκα Εγκλεισμού	Αναλογία ένωσης : CD	Απόδοση διεργασίας (%)
DA-β-CD	1:1	91
DA-HP-β-CD	1:1	63
DA-β-CD	2:1	92
DA-HP-β-CD	2:1	60
DA-Me-β-CD	2:1	65

Πίνακας 6 : Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων L-DOPA.

Σύμπλοκα Εγκλεισμού	Αναλογία ένωσης : CD	Απόδοση διεργασίας (%)
L-DOPA-β-CD	1:1	94
L-DOPA-HP-β-CD	1:1	71
L-DOPA-β-CD	2:1	90
L-DOPA-HP-β-CD	2:1	75

Φαίνεται ότι κύριο ρόλο τις αποδόσεις διεργασίας παίζει ο φορέας, και συγκεκριμένα η β-CD φαίνεται να έχει τις υψηλότερες αποδόσεις. Αυτό οφείλεται στην ευκολότερη μεταφορά

των συμπλόκων β-CD, μετά τη λειοτριβήση τις μεθόδου kneading, από το ιγδίο. Τα σύμπλοκα τις HP-β-CD είχαν την τάση να προσκολλώνται στο ιγδίο και να δυσχεραίνουν τη μεταφορά ολόκληρης τις ποσότητας τις. Η Me-β-CD παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά με την HP-β-CD. Ακόμα η ένωση που εγκλείεται φαίνεται να επηρεάζει την απόδοση διεργασίας αφού παρατηρούνται υψηλότερες αποδόσεις στην περίπτωση τις L-DOPA-HP-β-CD σε σχέση με τις αντίστοιχες DA-HP-β-CD. Η αναλογία ένωσης : κυκλοδεξτρίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει αυτή την απόδοση ιδιαίτερα.

3.2.2. Αποδόσεις εγκλεισμού

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 7) παρουσιάζονται οι αποδόσεις εγκλεισμού όπως μετρήθηκαν για τα δείγματα. Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται από τη σχέση :

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού(\%)} = \frac{\text{Μάζα ουσίας που εγκλείστηκε(mg)}}{\text{Αρχική μάζα ουσίας προς εγκλεισμό(mg)}} * 100\%$$

Πίνακας 7 : Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων DA.

Σύμπλοκα Εγκλεισμού	Αναλογία ένωσης : CD	Απόδοση εγκλεισμού (%)
DA-β-CD	1:1	38
DA-HP-β-CD	1:1	20
DA-β-CD	2:1	59
DA-HP-β-CD	2:1	21
DA-Me-β-CD	2:1	20

Πίνακας 8 : Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων L-DOPA.

Σύμπλοκα Εγκλεισμού	Αναλογία ένωσης : CD	Απόδοση εγκλεισμού (%)
L-DOPA-β-CD	1:1	73
L-DOPA-HP-β-CD	1:1	54
L-DOPA-β-CD	2:1	78
L-DOPA-HP-β-CD	2:1	55

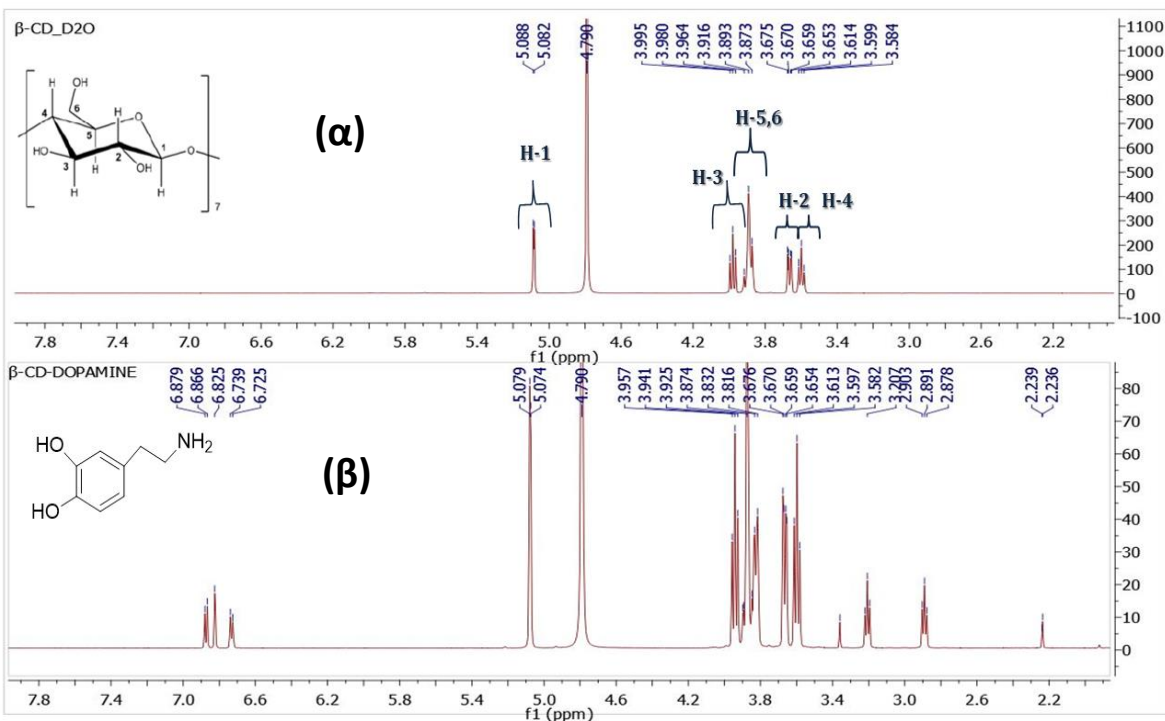
Όσον αφορά το φορέα, φαίνεται πως η απλή β-CD παρουσιάζει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού από τις τροποποιημένες HP-β-CD και Me-β-CD. Επίσης το μόριο της L-DOPA εγκλείεται πιο εύκολα από το μόριο της DA. Καθοριστικό ρόλο στην απόδοση εγκλεισμού παίζει η αναλογία ένωσης:CD. Συγκεκριμένα στο σύστημα DA-β-CD έχει υποδειχθεί από τη μέθοδο Job's plot ότι η κατάλληλη στοιχειομετρική αναλογία είναι 2:1. Αυτό αντανακλάται και στις αποδόσεις εγκλεισμού όπου παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην απόδοση στο κατάλληλο σύστημα.

3.3. Χαρακτηρισμοί

3.3.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

3.3.1.1. Σύστημα DA-β-CD

Δίνονται συγκριτικά τα φάσματα NMR της β-CD και του συμπλόκου DA-β-CD.



Διάγραμμα 6 : Φάσμα ¹H NMR (600MHz, D₂O) (α): της β-CD στην περιοχή 2.2-7.8 ppm, (β): του συμπλόκου β-CD-DA στην περιοχή 2.2-7.8 ppm.

Με βάση τα φάσματα υπολογίζονται και οι χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 : Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα της β-CD και του συμπλόκου DA-β-CD.

Πρωτόνιο	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) των πρωτονίων της β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) των πρωτονίων των ICs (ppm)	Δδ = δ2-δ1(ppm)
H-1	5.085	5.076	-0.009
H-2	3.664	3.665	0.001
H-3	3.980	3.941	-0.039
H-4	3.599	3.597	-0.002
H-5	3.893	3.841	-0.052
H-6	3.893	3.841	-0.052

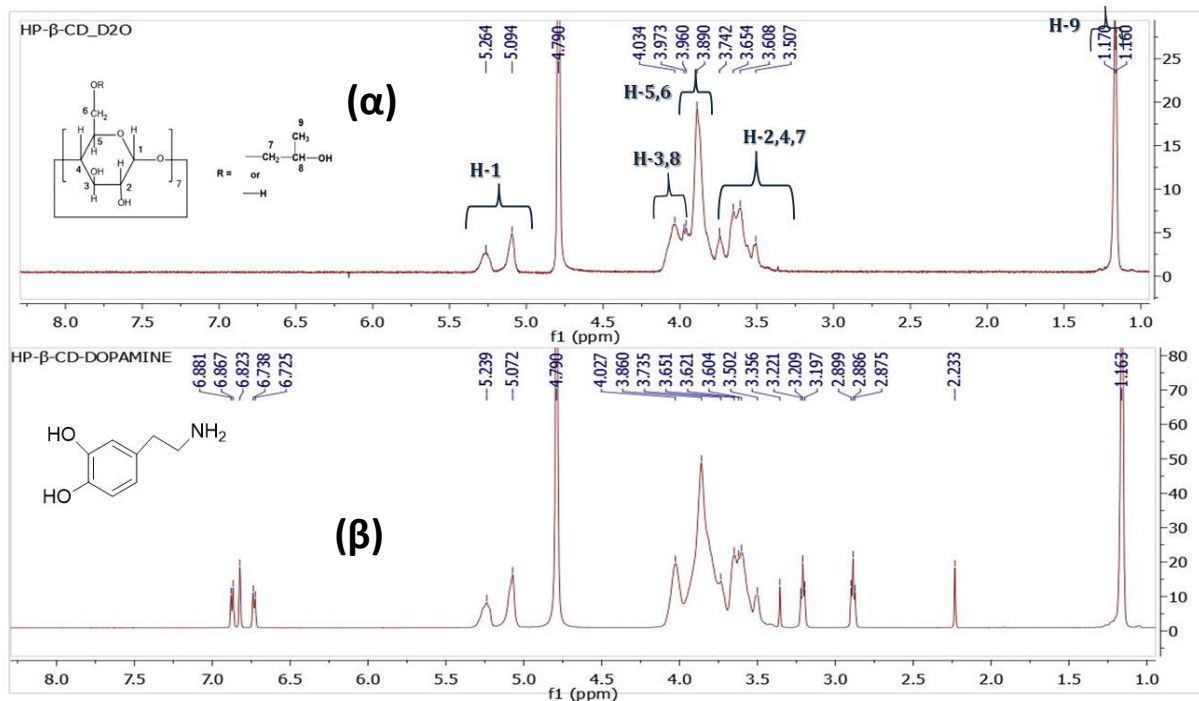


Εικόνα 26 : Οι θέσεις των πρωτονίων της β-CD.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 26) τα H-3 και H-5 βρίσκονται στο εσωτερικό της υδρόφοβη κοιλότητα της β-CD ενώ το H-6 βρίσκεται κοντά στην κοιλότητα της β-CD. Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της β-CD στο σύμπλοκο είναι σημαντικές κυρίως για τα πρωτόνια των θέσεων 3 ($\Delta\delta = -0.039$ ppm) και 5 ($\Delta\delta = -0.052$ ppm) παρουσιάζοντας μετατόπιση προς τα υψηλά πεδία και υποδεικνύοντας τον εγκλεισμό του αρωματικού δακτυλίου της DA στο εσωτερικό της κοιλότητας της β-CD.

3.3.1.2 Σύστημα DA-HP-β-CD

Δίνονται συγκριτικά τα φάσματα HP-β-CD και του συμπλόκου DA-HP-β-CD.



Διάγραμμα 7 : Φάσμα ¹H NMR (600MHz, D₂O) (α): της HP-β-CD στην περιοχή 1.0-8.0 ppm, (β): του συμπλόκου HP-β-CD-DA στην περιοχή 1.0-8.0 ppm.

Με βάση τα φάσματα υπολογίζονται και οι χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10 : Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα της HP-β-CD και του συμπλόκου DA-HP-β-CD.

Πρωτόνιο	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) των πρωτονίων της HP-β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) των πρωτονίων της HP-β-CD στα ICs (ppm)	Δδ = δ2-δ1(ppm)
H-1	5.179	5.155	-0.022
H-2	3.626	3.618	-0.008
H-3	4.033	4.027	-0.006

H-4	3.636	3.618	-0.008
H-5	3.890	3.860	-0.030
H-6	3.890	3.860	-0.030
H-7	3.626	3.618	-0.008
H-8	4.033	4.027	-0.006
H-9	1.165	1.163	0.002

Στο σύμπλοκο DA-HP-β-CD η διαφορά χημικών μετατοπίσεων για τα H-5 ($\Delta\delta = -0.030$ ppm) και H-6 ($\Delta\delta = -0.030$ ppm) είναι οι μεγαλύτερες, πράγμα που υποδηλώνει την πιθανή εισαγωγή του μορίου της DA από το στενό άνοιγμα της β-CD, όπου βρίσκονται αυτά τα πρωτόνια. Μεγάλη διαφορά μετατοπίσεων εντοπίζεται και στο H-1 ($\Delta\delta = -0.022$ ppm), παρουσιάζοντας μετατόπιση της τα υψηλά πεδία. Αυτό υποδεικνύει την προσκόλληση του μορίου της DA στο εξωτερικό της HP-β-CD, κάτι το οποίο επαληθεύεται και από τη μελέτη φθορισμού που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

3.3.2. Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης DLS για τα δείγματα όσον αφορά το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς (Pdl) και το ζ-δυναμικό.

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός για τα σύμπλοκα της DA και τα νανοσωματίδια επικαλυμμένα με χιτοζάνη.

	Στοιχειομετρική αναλογία ουσίας:β-CD	Μέγεθος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (Pdl)	ζ-δυναμικό (mV)
Σύμπλοκα DA-β-CD	1:1	372.8 ± 4.8	0.399 ± 0.094	-40.4 ± 7.9
Σύμπλοκα DA-β-CD	2:1	326.7 ± 5.5	0.369 ± 0.054	-38.1 ± 4.7
Σύμπλοκα DA-HP-β-CD	1:1	353.2 ± 11.6	0.376 ± 0.022	-16.7 ± 2.2
Σύμπλοκα DA-Me-β-CD	2:1	336.2 ± 7.4	0.347 ± 0.063	-18.7 ± 2.1
Νανοσωματίδια CS-β-CD-DA	2:1	323.6 ± 5.5	0.301 ± 0.064	+18.3 ± 1.5

Τα σύμπλοκα της DA είχαν μέσο όρο μεγέθους από 323.6 μέχρι 372.8 nm, τιμές PdI από 0.301 και τιμές ζ-δυναμικού από -18.7 έως -40.4 mV.

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης παρουσίασαν μέσο μέγεθος 323.6 nm, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό +18.3 mV. Οι τιμές του μεγέθους και του PdI θεωρούνται ικανοποιητικές. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αλλαγή του ζ-δυναμικού από μεγάλης κατά απόλυτη τιμή αρνητικής τιμής στα σύμπλοκα εγκλεισμού DA-β-CD σε αντίστοιχα μεγάλης θετικής τιμής στα νανοσωματίδια CS-β-CD-DA. Η μεταβολή αυτή υποδεικνύει την επιτυχή επικάλυψη των συμπλόκων εγκλεισμού.

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τα σύμπλοκα της L-DOPA.

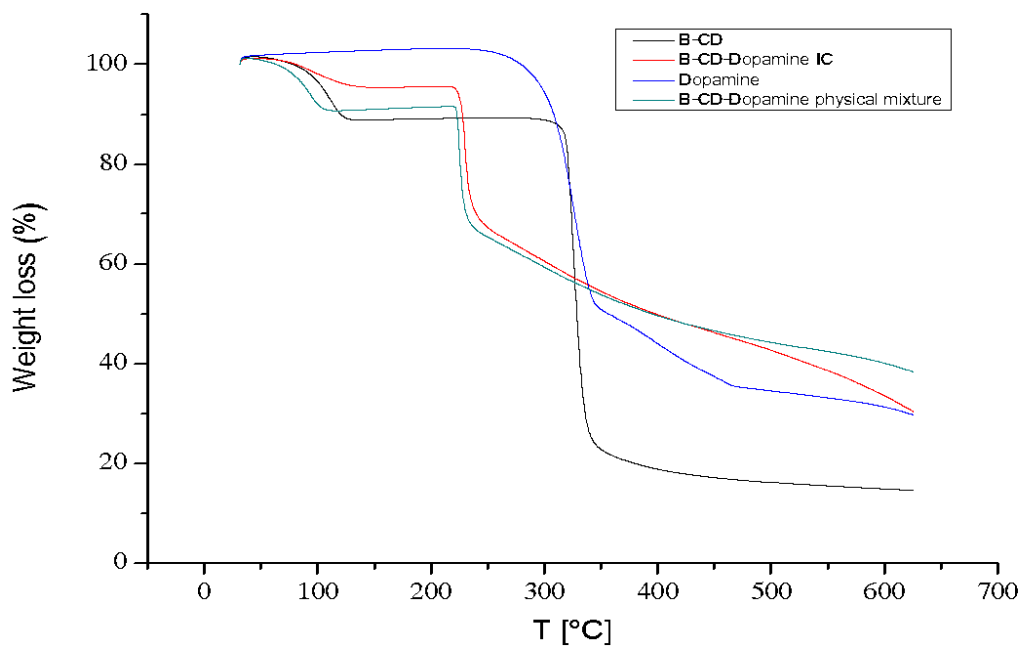
	Στοιχειομετρική αναλογία ουσίας:β-CD	Μέγεθος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PdI)	ζ-δυναμικό (mV)
Σύμπλοκα DOPA-β-CD	L- 1:1	120 ± 4.8	0.375 ± 0.064	-31.6 ± 3.7
Σύμπλοκα DOPA-HP-β-CD	L- 1:1	210 ± 5.2	0.390 ± 0.034	-15.9 ± 6.3
Σύμπλοκα DOPA-Me-β-CD	L- 1:1	316.2 ± 4.7	0.317 ± 0.042	-16.4 ± 2.1

Τα σύμπλοκα της L-DOPA παρουσίασαν μέσο όρο μεγέθους από 120.0 έως 316.2 nm, τιμές PdI από 0.317 έως 0.390 και τιμές ζ-δυναμικού από -15.9 έως -31.6 mV. Οι τιμές για το μέγεθος, την κατανομή και την σταθερότητα των συμπλόκων εγκλεισμού της DA και της L-DOPA θεωρούνται ικανοποιητικές.

3.3.3 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

3.3.3.1 Σύστημα DA-β-CD

Δίνεται το διάγραμμα (Διάγραμμα 9) TGA του συστήματος DA-β-CD



Διάγραμμα 9 : Συνολικό διάγραμμα TGA της β-CD, της DA, του φυσικού μίγματος β-CD και DA και των συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-DA.

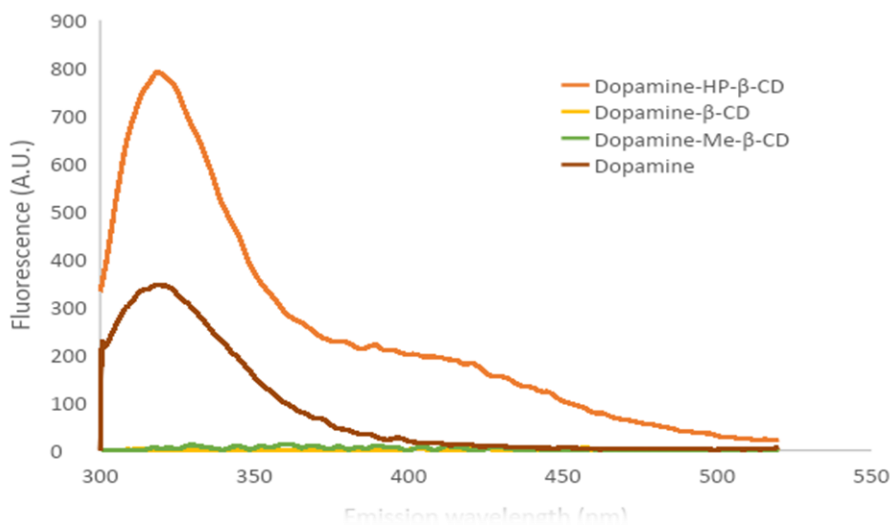
Το γράφημα της β-CD εμφανίζει απώλεια βάρους σε δύο στάδια: η πρώτη απώλεια μάζας με ποσοστό 12% εμφανίζεται στο θερμοκρασιακό εύρος 80-120°C ενώ η δεύτερη απώλεια με ποσοστό 29% στο θερμοκρασιακό εύρος 310-330°C. Η πρώτη απώλεια μάζας αποδίδεται στην απομάκρυνση μορίων νερού τα οποία βρίσκονται στην κοιλότητα της β-CD, ενώ η δεύτερη στην αποσύνθεση της β-CD.

Η απώλεια νερού παρατηρείται και στο φυσικό μίγμα DA, β-CD με απώλεια βάρους 10% σε θερμοκρασίες 80-120°C. Η απώλεια βάρους σε αυτό το θερμοκρασιακό εύρος περιορίζεται σημαντικά στην περίπτωση του συμπλόκου εγκλεισμού, στο 5%, πράγμα που υποδηλώνει τον επιτυχή εγκλεισμό και την αντικατάσταση των μορίων νερού από μόρια DA. Το στερεό υπόλειμμα είναι για τα σύμπλοκα DA-β-CD 53%, για την καθαρή DA 41% και για τη β-CD 16%, πράγμα που επίσης υποδεικνύει τον επιτυχή σχηματισμό των συμπλόκων.

3.3.4. Φθορισμός

Η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων συγκεντρώσεων στα πειράματα. Εκτός όμως από αυτό δείχνει και μία σημαντική ιδιότητα

των συμπλόκων εγκλεισμού. Ο εγκλεισμός στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης επηρεάζει τον φθορισμό του μορίου της DA. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 11), η ένταση φθορισμού της DA μειώνεται πολύ έντονα όταν αυτή εγκλείεται στο εσωτερικό της β -CD και της Me- β -CD. Αυτό αποδίδεται στο ότι η DA έχει εγκλειστεί στο εσωτερικό των κοιλοτήτων των κυκλοδεξτρινών και ο φθορισμός της ουσίας παρεμποδίζεται.



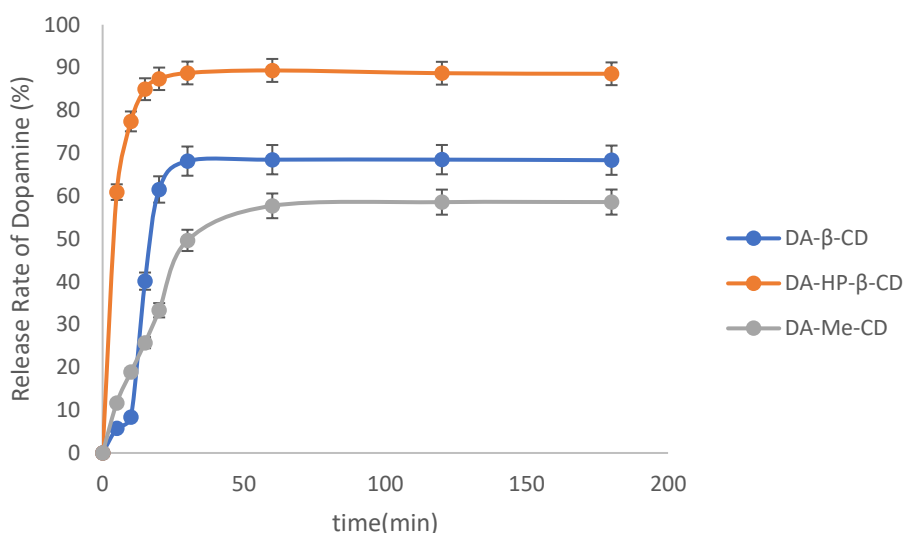
Διάγραμμα 10 : Τα φάσματα φθορισμού της DA και DA- β -CD ICs.

Σε αντίθεση με την Me- β -CD και τη β -CD, ο φθορισμός της DA στα σύμπλοκα με HP- β -CD αυξάνεται πράγμα που υποδηλώνει ότι η ουσία βρίσκεται και στο εξωτερικό του μορίου της κυκλοδεξτρίνης, σχηματίζοντας και σύμπλοκα μη εγκλεισμού, και η αλληλεπίδραση τους αυξάνει τον φθορισμό της ουσίας. Το συμπέρασμα ότι η DA βρίσκεται και στο εξωτερικό της HP- β -CD επαληθεύεται και από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR.

3.4. Μελέτη απελευθέρωσης

3.4.1. Συστήματα DA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD και νανοσωματίδια CS-β-CD-DA

Στο παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 12) παρουσιάζεται το προφίλ απελευθέρωσης των συστημάτων DA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD και CS-β-CD-DA.

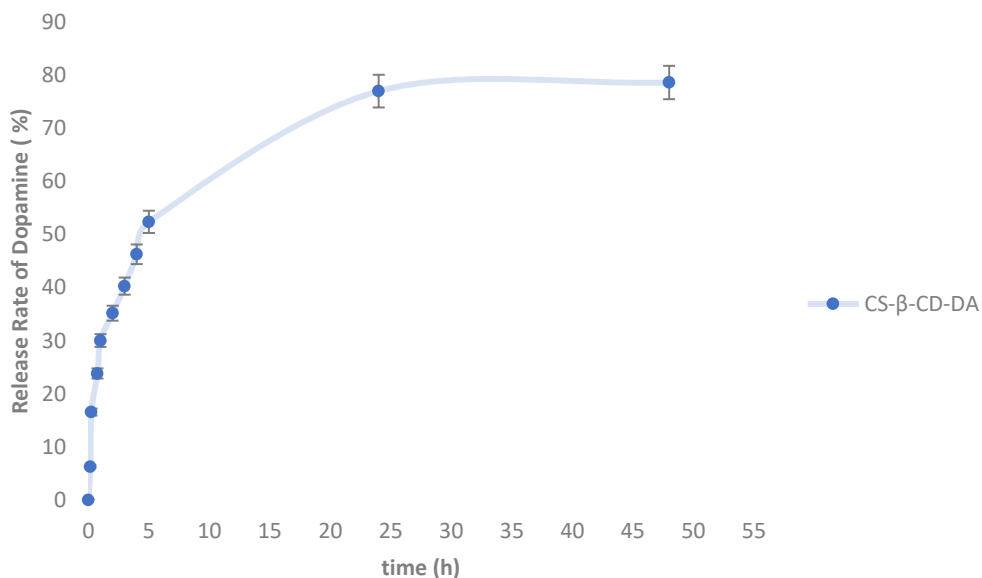


Διάγραμμα 11 : Προφίλ απελευθέρωσης της ντοπαμίνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού.

Όπως φαίνεται στο γράφημα (Διάγραμμα 12) το προφίλ των συμπλόκων DA-β-CD/HP-β-CD/Me-β-CD της DA παρουσιάζει “burst effect” μέσα στα πρώτα 20 min, ενώ μετά την πάροδο 1h η απελευθέρωση μειώνεται δραστικά και σταθεροποιείται. Η αρχική απότομη απελευθέρωση της DA οφείλεται στο ότι τα μόρια της ουσίας είναι ασθενώς συνδεδεμένα στο φορέα.

Τη μεγαλύτερη ποσοστιαία απελευθέρωση παρουσιάζει ο φορέας HP-β-CD, όπου απελευθερώνεται περίπου το 89% της εγκλεισμένης ένωσης σύμφωνα με την απόδοση εγκλεισμού που έχει υπολογιστεί. Το μικρότερο ποσοστό απελευθέρωσης φαίνεται να έχει η Me-β-CD όπου απελευθερώνεται περίπου το 58%.

Το προφίλ των νανοσωματιδίων(Διάγραμμα 13) φαίνεται να διαφέρει από των προηγούμενων συστημάτων. Εδώ στα πρώτα 20 min απελευθερώνεται μόνο το 16% DA, ενώ η απελευθέρωση φτάνει σε plateau μετά από 24 ώρες, όπου και απελευθερώνεται το 77% της DA. Ο φορέας αυτός δείχνει να είναι κατάλληλος για παρατεταμένη απελευθέρωση της DA.



Διάγραμμα 12 : Προφίλ απελευθέρωσης της ντοπαμίνης από το διπλό σύστημα φορέων.

Στα δεδομένα απελευθέρωσης γίνεται κινητική μελέτη με βάση τα μοντέλα μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi και Korsmeyer-Peppas συγκρίνοντας το R^2 του κάθε μοντέλου ώστε να διαπιστωθεί σε ποιο ταιριάζει το κάθε προφίλ καλύτερα. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13).

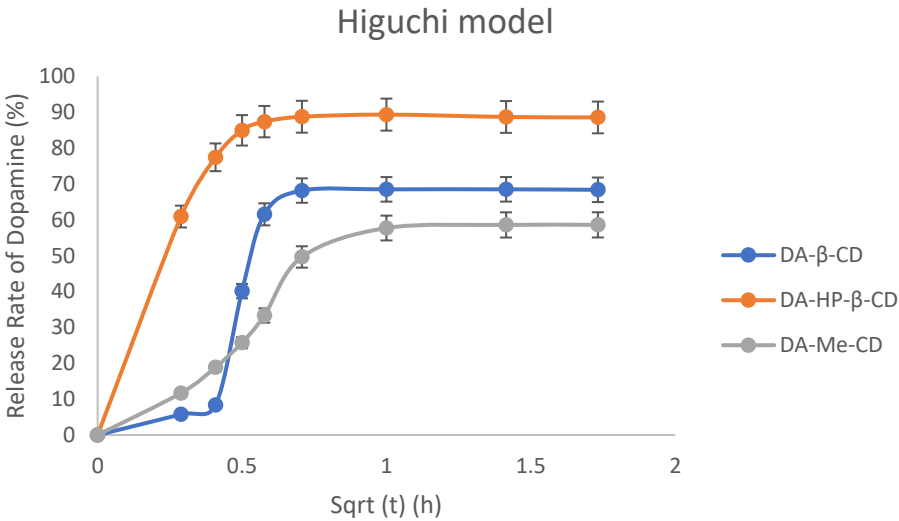
Πίνακας 13 : Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης για τα σύμπλοκα της DA.

	Μηδενικής τάξης	Πρώτης τάξης	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Εξίσωση Higuchi	Εξίσωση Korsmeyer-Peppas
	R^2	R^2	R^2	R^2		
DA-HCl-β-CD	0.622	0.498	0.768	0.8117	$y = 80.614x - 1.7857$	$y = 0.8547x + 0.2622$
DA-HP-β-CD	0.752	0.566	0.949	0.5493	$y = 156.44x + 6.6155$	$y = 0.6777x + 0.8183$
DA-Me-β-CD	0.593	0.312	0.815	0.841	$y = 36.27x + 8.2006$	$y = 0.6663x + 0.1722$

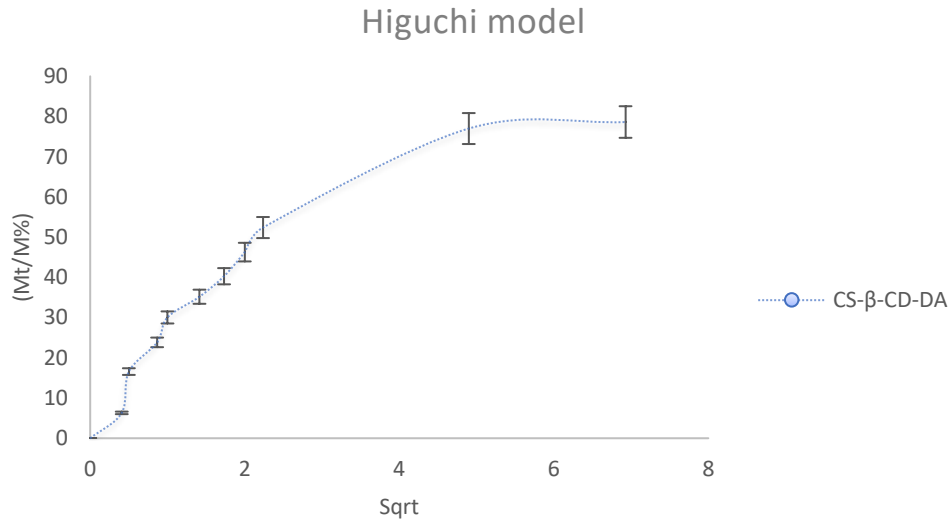
CS-β-CD-DA	0.461	0.258	0.854	0.938	$y = 11.312x + 14.351$	$y = 0.6663x + 0.1722$
-------------------	-------	-------	-------	-------	------------------------	------------------------

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συμπεραίνεται για αυτά τα συστήματα ότι προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο Higuchi και ο μηχανισμός της *in vitro* αποδέσμευσης της DA είναι η διάχυση μεσω ανώμαλης μεταφοράς (non-Fickian).

Δίνεται το διάγραμμα (Διάγραμμα 14) του μοντέλου Higuchi αυτών των συστημάτων .



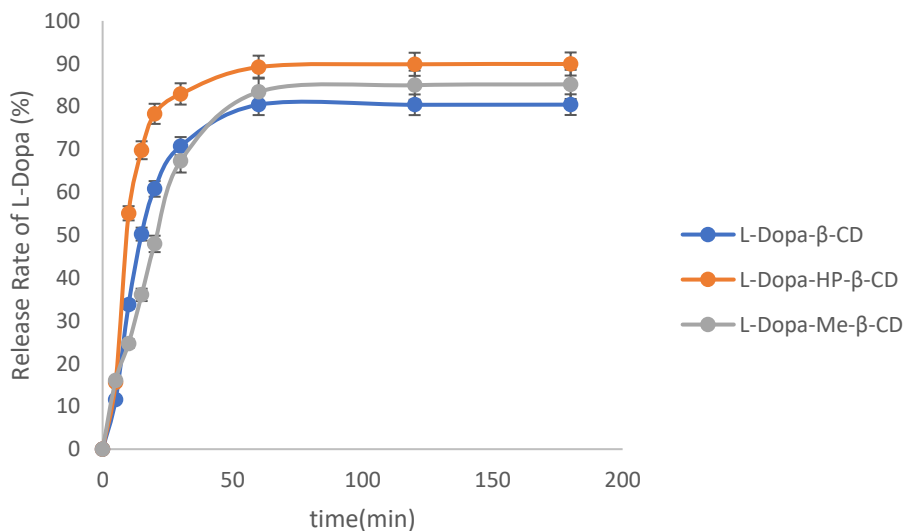
Διάγραμμα 13 : Μοντέλο Higuchi των συμπλόκων της DA.



Διάγραμμα 14 : Μοντέλο Higuchi των νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με χιτοζάνη.

3.4.2. Συστήματα L-DOPA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD

Στο παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 16) παρουσιάζεται το προφίλ απελευθέρωσης των συστημάτων L-DOPA-β-CD/HP β-CD/Me-β-CD.



Διάγραμμα 15 : Προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων της L-DOPA.

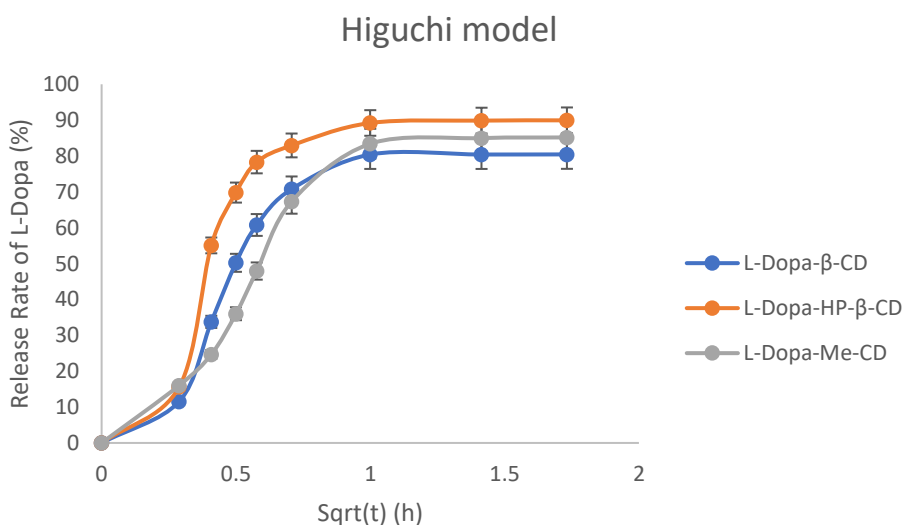
Και στην περίπτωση των συστημάτων της L-DOPA φαίνεται να υπάρχει "burst effect" στην απελευθέρωση. Συγκεκριμένα τα πρώτα 20 min απελευθερώνεται το 60%, 78% και 47% της εγκλεισμένης L-DOPA των συστημάτων β-CD, HP-β-CD και Me-β-CD αντίστοιχα. Μετά την πάροδο 3h και αφού το σύστημα έχει φτάσει σε plateau έχουν απελευθερωθεί συνολικά

στα ίδια συστήματα το 80%, 89% και 85% αντίστοιχα. Συγκεκριμένα το σύμπλοκο της L-DOPA-Me-β-CD φαίνεται να έχει τη δυνατότητα κατάλληλου προφίλ παρατεταμένης απελευθέρωσης. Ακολουθεί κινητική μελέτη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14):

Πίνακας 14 : Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης για τα σύμπλοκα της L-DOPA.

	Μηδενικής τάξης	Πρώτης τάξης	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Εξίσωση Higuchi	Εξίσωση Korsmeyer-Peppas
	R ²	R ²	R ²	R ²		
L-DOPA-β-CD	0.748	0.442	0.916	0.7875	$y = 91.11x - 1.3833$	$y = 0.7971x + 0.4738$
L-DOPA-HP-β-CD	0.596	0.370	0.835	0.7206	$y = 100.56x + 5.8385$	$y = 0.7849x + 0.5793$
L-DOPA-Me-β-CD	0.593	0.312	0.815	0.8341	$y = 36.27x + 8.20006$	$y = 0.8025x + 0.4446$

Για τα συστήματα της L-DOPA το μοντέλο στο οποίο προσαρμόζονται καλύτερα τα δεδομένα είναι το μοντέλο Higuchi με τιμές του R² από 0.815-0.916. Με βάση το μοντέλο Korsmeyer-Peppas, η L-DOPA απελευθερώνεται με διάχυση μέσω ανώμαλης μεταφοράς (non-Fickian). Ακολουθεί το διάγραμμα (Διάγραμμα 17) του μοντέλου Higuchi αυτών των συστημάτων.



Διάγραμμα 16 : Μοντέλο Higuchi των συμπλόκων της L-DOPA.

4. Συμπεράσματα

- Από τη μελέτη συνεχών μεταβολών και τη μελέτη διαλυτότητας προέκυψαν οι βέλτιστες αναλογίες για τα συστήματα (2:1 DA-β-CD/DA-Me-β-CD και 1:1 DA-HP-β-CD, L-DOPA-β-CD/HP-β-CD)
- Για τα συστήματα DA/L-DOPA- β-CD/HP-β-CD/Me-β-CD η μέθοδος kneading επιλέχθηκε ως καταλληλότερη για τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού.
- Τα νανοσωματίδια/σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος (DA- β-CD ICs: 326.7-372.8 nm, L-DOPA- β-CDs: 120-316 nm) και το ζ-δυναμικό. Με βάση τις τιμές του ζ-δυναμικού (-15.9 έως -40.4mV) τα σύμπλοκα θεωρούνται σταθερά. Η επικάλυψη με χιτοζάνη θεωρείται επιτυχημένη καθώς μεταβάλλεται η τιμή του ζ-δυναμικού σε +18.3mV.
- Οι αποδόσεις διεργασίας στα συστήματα που αναπτύχθηκαν παρουσίασαν υψηλά ποσοστά (60-94%).
- Οι αποδόσεις εγκλεισμού ήταν ικανοποιητικές (20-78%), και ιδιαίτερα για το σύμπλοκο L-DOPA-HP-β-CD (78%).
- Στην περίπτωση των συμπλόκων εγκλεισμού, η μελέτη της δομής των συμπλόκων πραγματοποιείται με φασματοσκοπία NMR. Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των H-3 ($\Delta\delta = -0.039$ ppm) και H-5 ($\Delta\delta = -0.052$ ppm), τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας της β-CD και του H-6, το οποίο βρίσκεται κοντά στην κοιλότητα υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλεισμό της DA στην κοιλότητα της β-CD. Η μεγάλη διαφορά μετατοπίσεων στο H-1 της HP-β-CD ($\Delta\delta = -0.022$ ppm), το οποίο βρίσκεται στη εξωτερική επιφάνεια της HP-β-CD, υποδεικνύει την προσκόλληση του μορίου της DA στο εξωτερικό της HP-β-CD, κάτι το οποίο επαληθεύεται και από τη μελέτη φθορισμού.
- Τα προφίλ απελευθέρωσης της DA/L-DOPA από τα σύμπλοκα εγκλεισμού είναι διφασικά με “burst effect” και σταδιακή σταθεροποίηση (“plateau”) μετά από τις πρώτες ώρες. Τα δεδομένα της απελευθέρωσης προσαρμόζονται καλύτερα στο

μοντέλο Higuchi και μηχανισμό απελευθέρωση την διάχυση μεσω ανώμαλης μεταφοράς (non-Fickian).

- Τα καταλληλότερο σύστημα για παρατεταμένη αποδέσμευση είναι τα νανοσωματίδια CS-β-CD-DA με απελευθέρωση 16% στα πρώτα 20min και 77% τις πρώτες 24h.

5. Προτάσεις για μελλοντική Έρευνα

- Χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού με μέθοδο FT-IR.
- Επικάλυψη συμπλόκων εγκλεισμού HP-β-CD και Me-β-CD με χιτοζάνη και μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης τους και κινητική μοντελοποίηση.
- Μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης σε διαφορετικές συνθήκες, όπως στο pH που προσομοιάζει του στομάχου ή του εντέρου.
- Μελέτη της αναλογίας ένωσης:φορέα σε περισσότερα σύμπλοκα, με χρήση Job's plot αλλά και πιο εξελιγμένων μεθόδων, για την επίτευξη των βέλτιστων αποδόσεων.
- Μελέτη των συμπλόκων με τη μέθοδο Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) για τη μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων τους.
- Μελέτη των παραγώγων της οξειδωσης της DA, των ρυθμών σχηματισμού τους και των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα, καθώς φαίνεται ότι πρόκειται για ιδιαίτερα πολύπλοκη διεργασία.

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Δομή ντοπαμίνης ($C_8H_{11}NO_2$).

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση νευροδιαβιβαστών. Οι νευρώνες επικοινωνούν στέλνοντας ηλεκτροχημικές πληροφορίες με τη μορφή ενός νευροδιαβιβαστή από τη μία μεριά της σύναψης στην απέναντι.

Εικόνα 3: Δομή της λεβοντόπας ($C_9H_{11}NO_4$).

Εικόνα 4: Απεικόνιση φθοράς στους ντοπαμινικούς νευρώνες .

Εικόνα 5 : (A) Χημική Δομή της β -CD (B) Σχηματική απεικόνιση κόλπου κώνου.

Εικόνα 6: Απεικόνιση δομών α , β και γ κυκλοδεξτρίνης.

Εικόνα 7: Απεικόνιση συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών.

Εικόνα 8: Απεικόνιση συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων.

Εικόνα 9: Δομή χιτοζάνης.

Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση παραγωγής χιτοζάνης.

Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της διάχυσης.

Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών απελευθέρωσης φαρμάκων σε πολυμερικά συστήματα. Από αριστερά προς τα δεξιά είναι A: διάχυση μέσω πόλων νερού, B: διάχυση διαμέσου της πολυμερούς μήτρας, C: ωσμωτική άντληση, D: διάβρωση

Εικόνα 13: Διάγραμμα κινητικής μηδενικής τάξης.

Εικόνα 14: Διάγραμμα κινητικής πρώτης τάξης.

Εικόνα 15: Διάγραμμα κινητικής μοντέλου Higuchi.

Εικόνα 16: Διάγραμμα κινητικής μοντέλου Korsmeyer-Peppas

Εικόνα 17: Απεικόνιση κινητικών απελευθέρωσης.

Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση “burst release” σε σύγκριση με μηδενικής τάξης.

Εικόνα 19: Πιθανά διαγράμματα phasesolubility.

Εικόνα 20: Job’s plot, $R = \frac{[\text{ένωση}]}{[\text{ένωση}] + [\beta\text{-CD}]}$, ΔA = διαφορά απορρόφησης της ένωσης με και χωρίς $\beta\text{-CD}$.

Εικόνα 21: Διάταξη φθορισμού σχηματικά.

Εικόνα 22: Εξωτερική όψη διάταξης φθορισμού.

Εικόνα 23: Σημείο τοποθέτησης κυψελίδας στη διάταξη φθορισμού.

Εικόνα 24 : Σχηματική απεικόνιση της πρώτης μεθόδου μελέτης του προφίλ απαλευθέρωσης.

Εικόνα 25 : Σχηματική απεικόνιση της δεύτερης μεθόδου μελέτης του προφίλ απαλευθέρωσης

Εικόνα 26 : Δομή πρωτονίων της $\beta\text{-CD}$.

Εικόνα 27 Παράρτημα Εικόνων : Κατανομή μεγέθους συμπλόκων L-DOPA-HP- $\beta\text{-CD}$ σε αναλογία 1:1.

Εικόνα 28 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους συμπλόκων L-DOPA- $\beta\text{-CD}$ σε αναλογία 1:1.

Εικόνα 29 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή ζ-δυναμικού συμπλόκων L-DOPA- $\beta\text{-CD}$ σε αναλογία 1:1.

Εικόνα 30 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων CS- $\beta\text{-CD-DA}$.

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1 : Αναλογίες παρασκευής συμπλόκων DA.

Πίνακας 2 : Αναλογίες παρασκευής συμπλόκων L-DOPA.

Πίνακας 3 : Στοιχεία με τα οποία κατασκευάζεται το Job's plot.

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα της μελέτης phasesolubility.

Πίνακας 5 : Αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων DA.

Πίνακας 6 : Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων L-DOPA.

Πίνακας 7 : Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων DA.

Πίνακας 8 : Αποδόσεις εγκλεισμού συμπλόκων L-DOPA.

Πίνακας 9 : Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα της β -CD και του συμπλόκου DA- β -CD.

Πίνακας 10 : Χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα της HP- β -CD και του συμπλόκου DA-HP- β -CD.

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός για τα σύμπλοκα της DA και τα νανοσωματίδια επικαλυμένα με χιτοζάνη.

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τα σύμπλοκα της L-DOPA.

Πίνακας 13 : Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης για τα σύμπλοκα της DA.

Πίνακας 14: Μελέτη κινητικής απελευθέρωσης για τα σύμπλοκα της L-DOPA.

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 : Job's plot. $R = \frac{[\text{ένωση}]}{[\text{ένωση}] + [\beta\text{-CD}]}$, ΔA = διαφορά απορρόφησης της ένωσης με και χωρίς $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 2 : Μελέτη Phasesolubilityγια το σύστημα DA- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 3 : Μελέτη Phasesolubilityγια το σύστημα DA-HP- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 4 : Μελέτη Phasesolubilityγια το σύστημα DA-Me- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 5 : Συγκεντρωτικό διάγραμμα της μελέτης Phasesolubility.

Διάγραμμα 6 : Συγκριτικά τα φάσματα NMRτων $\beta\text{-CD}$ και DA- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 7 : Συγκριτικά τα φάσματα NMRτων HP- $\beta\text{-CD}$ και DA-HP- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 8 : Συγκριτικά τα φάσματα NMRτων $\beta\text{-CD}$ και L-DOPA- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 9 : Αποτελέσματα της μεθόδου TGAγια το σύστημα DA- $\beta\text{-CD}$.

Διάγραμμα 10 : Τα φάσματα φθορισμού της DA και DA- $\beta\text{-CD}$ ICs.

Διάγραμμα 11 : Προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων της DA.

Διάγραμμα 12: Προφίλ απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με χιτοζάνη.

Διάγραμμα 13 : Μοντέλο Higuchiτων συμπλόκων της DA.

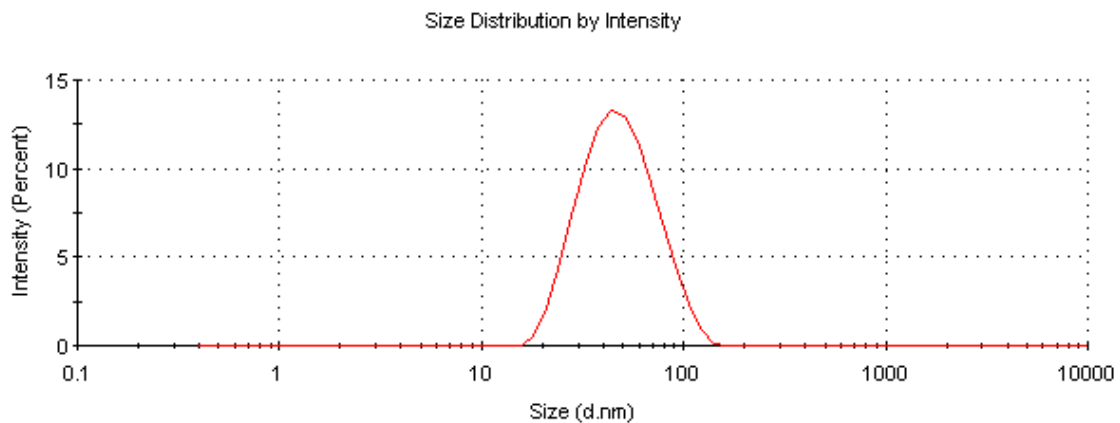
Διάγραμμα 14 : Μοντέλο Higuchiτων νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με χιτοζάνη.

Διάγραμμα 15 : Προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων της L-DOPA.

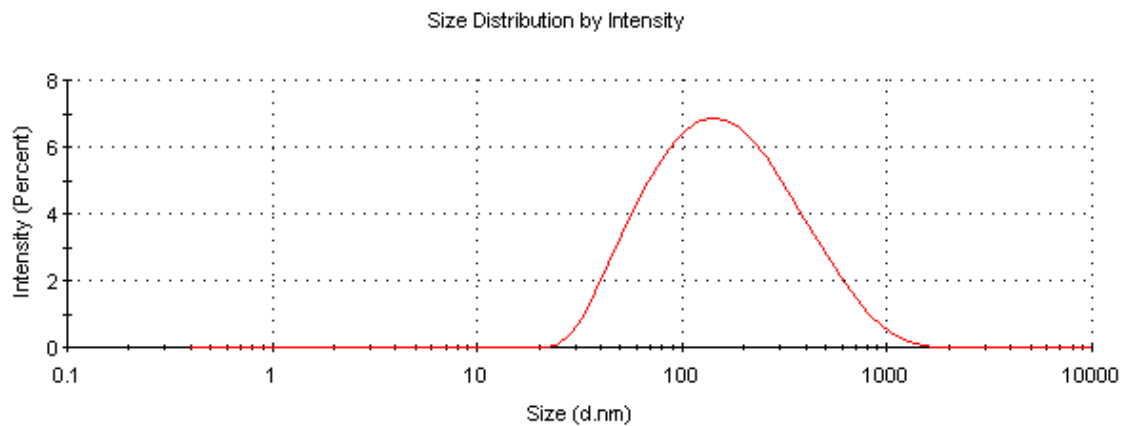
Διάγραμμα 16 : Μοντέλο Higuchi των συμπλόκων της L-DOPA.

Παράρτημα

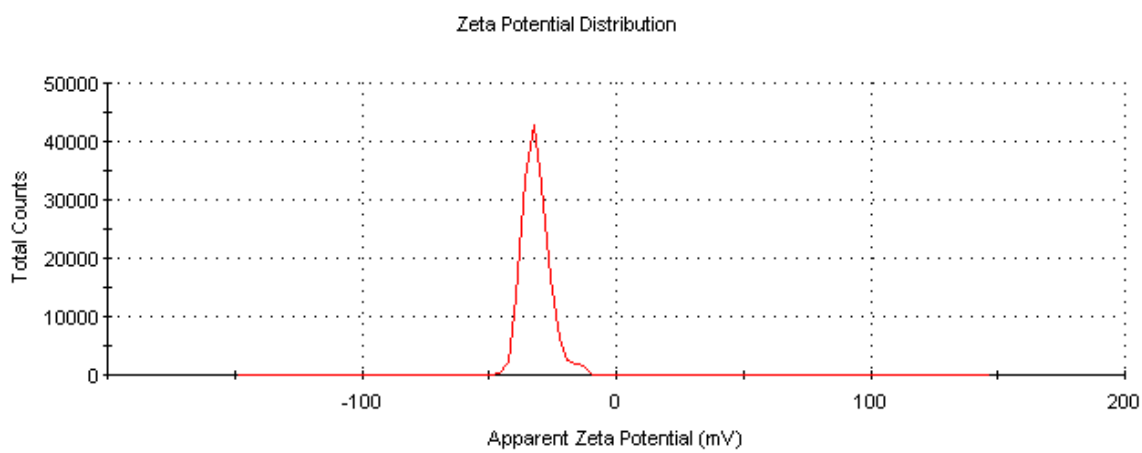
Παρακάτω παρατίθενται κάποια ενδεικτικά φάσματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού. Ο σχολιασμός τους γίνεται στο κεφάλαιο 3.3.2.



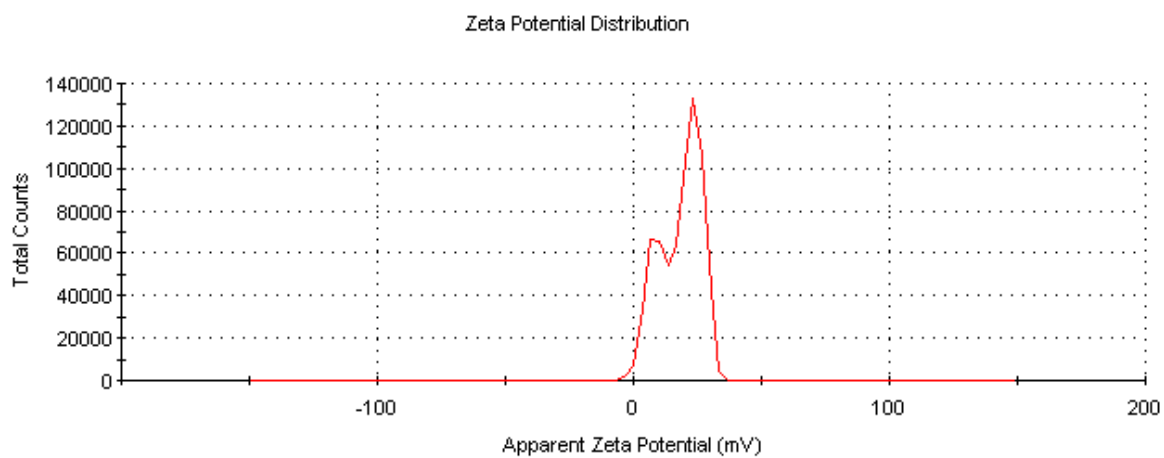
Εικόνα 27 Παράρτημα Εικόνων : Κατανομή μεγέθους συμπλόκων L-DOPA-HP-β-CD σε αναλογία 1:1.



Εικόνα 28 Παράρτημα Εικόνων : Κατανομή μεγέθους συμπλόκων L-DOPA-β-CD σε αναλογία 1:1.



Εικόνα 29 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή ζ-δυναμικού συμπλόκων L-DOPA-β-CD σε αναλογία 1:1.



ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ioanna Pitterou, **Isidoros Stamatiou**, Eleni Kavetsou, Eleni Alexandratou, Anastasia Detsi, Encapsulation of Dopamine and L-DOPA in various biodegradable nanosystems, Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference 2021, March 24-25-26, 2021, Online Conference **(Accepted)**

2. Ioanna Pitterou, **Isidoros Stamatiou**, Eleni Kavetsou, Eleni Alexandratou, Grigorios Megariotis, Doros N. Theodorou, Anastasia Detsi, Inclusion complexes of Dopamine and L-DOPA in β -cyclodextrin and modified cyclodextrins: investigation of the properties of sustained release nanosystems, 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, February 25 - 26 - 27, 2021, Online Symposium **(Accepted)**

Βιβλιογραφία

1. Iversen, Susan D., and Leslie L. Iversen. "Dopamine: 50 years in perspective." Trends in neurosciences 30.5 (2007): 188-193.
2. Beaulieu, Jean-Martin, and Raul R. Gainetdinov. "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacological reviews 63.1 (2011): 182-217.
3. Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean? Nature Neuroscience, 21(6), 787–793. doi:10.1038/s41593-018-0152-y
4. Graybiel, Ann M. "The basal ganglia." Current biology 10.14 (2000): R509-R511.
5. Snyder, Solomon H., et al. "Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia." Science 184.4143 (1974): 1243-1253.
6. Parkinson Study Group. "Levodopa and the progression of Parkinson's disease." New England Journal of Medicine 351.24 (2004): 2498-2508.
7. Rodríguez-Nogales, C., et al. "Brain aging and Parkinson's disease: new therapeutic approaches using drug delivery systems." Maturitas 84 (2016): 25-31.

8. Del Valle, EM Martin. "Cyclodextrins and their uses: a review." *Process biochemistry* 39.9 (2004): 1033-1046.
9. Deng, Yinghui, et al. "Host-guest inclusion systems of daidzein with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD): Preparation, binding behaviors and water solubility." *Journal of Molecular Structure* 1118 (2016): 307-315.
10. Ozdemir, Necla, et al. "Preparation of black pepper oleoresin inclusion complexes based on beta-cyclodextrin for antioxidant and antimicrobial delivery applications using kneading and freeze drying methods: A comparative study." *LWT* 91 (2018): 439-445.
11. Sun, Xiuxiu, et al. "Antimicrobial and mechanical properties of β -cyclodextrin inclusion with essential oils in chitosan films." *Journal of agricultural and food chemistry* 62.35 (2014): 8914-8918.
12. Ragusa, Andrea, et al. "Neuroprotective investigation of chitosan nanoparticles for dopamine delivery." *Applied Sciences* 8.4 (2018): 7111-7121.
13. Crank, John. *The mathematics of diffusion*. Oxford university press, 1979.
14. Gouda, Radhakant, Himankar Baishya, and Zhao Qing. "Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets." *J. Dev. Drugs* 6.02 (2017): 1-10.
15. J. Szejtli, "Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry," *Chem. Rev.*, vol. 98, no. 5, pp. 1743–1754, Jul. 1998
16. Preston, Caroline M. "Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects." *Soil science* 161.3 (1996): 144-166.
17. Keeler, James. *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2011.
18. De Moraes, Mariana Agostini, Classius Ferreira Da Silva, and Rodrigo Silveria Vieira, eds. *Biopolymer Membranes and Films: Health, Food, Environment, and Energy Applications*. Elsevier, 2020.
19. Saokham, Phennapha, et al. "Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes." *Molecules* 23.5 (2018): 1161.

20. Saokham, Phennapha, et al. "Inclusion complexes of p-hydroxybenzoic acid esters and γ -cyclodextrin." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 90.1 (2018): 111-122.
21. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48:412–22.
22. Marsden S. Blois. Determinations, Antioxidant Radical, Stable Free. *Nature.* 1958;1199–200.
23. Barros, Marisa CF, Ana CF Ribeiro, and Miguel A. Estes. "Cyclodextrins in Parkinson's disease." *Biomolecules* 9.1 (2019): 3.
24. Charumanee, Suporn, et al. "Effect of cyclodextrin types and co-solvent on solubility of a poorly water soluble drug." *Scientia pharmaceutica* 84.4 (2016): 694-704.
25. Kotronia, Margarita, et al. "Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in β -cyclodextrin (β -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes." *Bioengineering* 4.3 (2017): 74.
26. López, Tessa, et al. "Treatment of Parkinson's disease: nanostructured sol-gel silica-dopamine reservoirs for controlled drug release in the central nervous system." *International journal of nanomedicine* 6 (2011): 19.
27. Khan, M. Shah Nawaz, et al. "Controlled delivery of dopamine hydrochloride using surface modified carbon dots for neuro diseases." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 134 (2015): 140-146.
28. Dash, Suvakanta, et al. "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems." *Acta Pol Pharm* 67.3 (2010): 217-223.
29. Loftsson, Thorsteinn, and Marcus E. Brewster. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development." *Journal of pharmacy and pharmacology* 62.11 (2010): 1607-1621.
30. Pinna, Alessandra, et al. "A MOF-based carrier for in situ dopamine delivery." *RSC advances* 8.45 (2018): 25664-25672.
31. Ryzhakov, Alexey, et al. "Self-assembly of cyclodextrins and their complexes in aqueous solutions." *Journal of pharmaceutical sciences* 105.9 (2016): 2556-2569.
32. Zhai, Cuiping, et al. "Interactions of dopamine and dopamine hydrochloride with ethanol." *Journal of Molecular Liquids* 223 (2016): 420-426.

33. Gao, Shuang, et al. "Enhanced solubility, stability, and herbicidal activity of the herbicide diuron by complex formation with β -cyclodextrin." *Polymers* 11.9 (2019): 1396.
34. Nutho, B., Khuntawee, W., Rungnim, C., Pongsawasdi, P., Wolschann, P., Karpfen, A., ... & Rungrotmongkol, T. (2014). Binding mode and free energy prediction of fisetin/ β -cyclodextrin inclusion complexes. *Beilstein journal of organic chemistry*, 10(1), 2789-2799.
35. Fredenberg, Susanne, et al. "The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review." *International journal of pharmaceutics* 415.1-2 (2011): 34-52.
36. Ferreira, José Augusto, et al. "A new look to non-Fickian diffusion." *Applied Mathematical Modelling* 39.1 (2015): 194-204.
37. Pardridge, William M. "Blood–brain barrier delivery." *Drug discovery today* 12.1-2 (2007): 54-61.

