



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Βιομηχανική Φαρμακευτική

**«Θερμική Ανάλυση
και αξιολόγηση λιποσωμακών συστημάτων και
κλασσικών εκδόχων με
Φουροσεμίδα»**

Κυριλή Αιμιλία

A.M.: 150406

Απρίλιος 2017

Αφιερώνεται με αγάπη στους γονείς μου και
την αδερφή μου, για την υπομονή και τη
στήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Βλάχου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

Κ. Δεμέτζος, Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

Ε. Καραλής, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Βιομηχανική Φαρμακευτική” του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα και το σύνολο των εργασιών, διεξήχθησαν στο Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Μαριλένας Βλάχου, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του ερευνητικού θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση, την πολύτιμη συμβολή της στην περάτωση της εργασίας, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο, μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής, για τη σημαντική βοήθειά του και τις εύστοχες υποδείξεις του, καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγησή του στο σκέλος των πειραμάτων Νανοτεχνολογίας, που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριό του.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Καραλή, μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής, για τις εύστοχες και λεπτομερείς παρατηρήσεις του, που συνέβαλαν στο αρτιότερο τελικό αποτέλεσμα.

Τις κ. Νατάσσα Πίππα, Μεταδιδάκτωρ, και κ. Αγγελική Σιαμίδα, υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Φαρμακευτικής για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν, την υπομονή και τις εύστοχες συμβουλές τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Διευθυντή του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Στέργιο Πίσπα, από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, για την προμήθεια του πολυμερούς.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τη Μαρία Χουντουλέση, συμφοιτήτριά μου, για τη διαρκή στήριξή της καθ’ όλη την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 11 |
| A.1. Θερμική Ανάλυση..... | 11 |
| A.1.1 Εισαγωγικά..... | 11 |
| A.1.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Θερμικής Ανάλυσης..... | 11 |
| A.1.3 Μέθοδοι θερμικής ανάλυσης..... | 12 |
| A.1.4 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) . | 13 |
| A.1.4.1 Εισαγωγικά..... | 13 |
| A.1.4.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Διαφορικής Θερμιδομετρικής Σάρωσης..... | 14 |
| A.1.4.3 Τύποι οργάνων Διαφορικής Θερμιδομετρικής Σάρωσης..... | 15 |
| A.1.4.4 Τυπικό Θερμογράφημα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης..... | 17 |
| A.1.4.4.1 Γενικά..... | 17 |
| A.1.4.4.2 Χαρακτηριστικές θερμοκρασίες θερμογράμματος..... | 18 |
| A.1.4.4.3. Θερμικές μεταβολές που παρατηρούνται σε ένα θερμοδιάγραμμα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης..... | 19 |
| A.1.4.5 Σημεία εξέχουσας προσοχής κατά την εκτέλεση DSC πειραμάτων..... | 22 |
| A.1.4.6 Τρόποι διατήρησης πειραματικής ακρίβειας και επαναληψιμότητας..... | 25 |
| A.1.4.7 Εφαρμογές Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης στις Φαρμακευτικές Επιστήμες..... | 25 |
| A.1.4.7.1 Εφαρμογές στην Ανάπτυξη και τον Έλεγχο Φαρμάκων..... | 26 |
| A.1.4.7.1.1 Χαρακτηρισμός ενός συστατικού..... | 26 |
| A.1.4.7.1.1.1 Προσδιορισμός Καθαρότητας Κρυσταλλικής Ουσίας..... | 26 |
| A.1.4.7.1.1.2 Ποσοτικοποίηση της κρυσταλλικότητας..... | 27 |
| A.1.4.7.1.1.3 Πολυμορφισμός..... | 28 |
| A.1.4.7.1.1.4 Διάσπαση, αποσύνθεση και καθορισμός σταθερότητας..... | 28 |
| A.1.4.7.1.1.5 Υαλώδης μετάπτωση..... | 29 |
| A.1.4.7.1.1.6 Μετρήσεις θερμοχωρητικότητας..... | 29 |
| A.1.4.7.1.2 Χαρακτηρισμός πολύπλοκων μιγμάτων..... | 29 |
| A.1.4.7.2 Εφαρμογές στη μελέτη βιομορίων (πρωτεϊνών)..... | 30 |
| A.1.4.7.3 Εφαρμογή ως συμπληρωματικού διαγνωστικού εργαλείου για τον έλεγχο βιολογικών δειγμάτων..... | 30 |
| A.1.4.7.4 Εφαρμογή στην ανίχνευση παράνομων παρτίδων δισκίων..... | 31 |
| A.1.4.7.5 Εφαρμογή στη μελέτη λιπιδικών διπλοστοιβάδων..... | 31 |
| A.1.5 Εξελίξεις στη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης..... | 32 |

| | |
|--|----|
| A.1.6 Προκλήσεις και Προοπτικές..... | 33 |
| A.2. Συνεργασιμότητα υλικών – Αλληλεπιδράσεις..... | 34 |
| A.2.1 Γενικά..... | 34 |
| A.2.2 Επίδραση της υγρασίας..... | 34 |
| A.2.2.1 Επίδραση του νερού στη φυσική αστάθεια..... | 35 |
| A.2.2.2 Επίδραση του νερού στη χημική αστάθεια..... | 35 |
| A.2.3 Φυσική αστάθεια..... | 35 |
| A.2.3.1 Αλλαγές οργανοληπτικών ιδιοτήτων..... | 35 |
| A.2.3.2 Μεταβολές της διάλυσης και/ή της αποδέσμευσης δραστικής ουσίας..... | 35 |
| A.2.3.3 Αλλαγές μορφής της δραστικής ουσίας..... | 36 |
| A.2.4 Χημική αστάθεια..... | 36 |
| A.2.4.1 Αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – εκδόχων..... | 36 |
| A.2.4.1.1 Χημικές αλληλεπιδράσεις..... | 36 |
| A.2.4.1.1.1 Απευθείας αντίδραση δραστικής ουσίας – εκδόχων..... | 36 |
| A.2.4.1.1.2 Κατάλυση αποσύνθεσης δραστικής ουσίας από έκδοχο..... | 37 |
| A.2.4.1.1.3 Επίδραση εκδόχων στο pH του μικροπεριβάλλοντος..... | 37 |
| A.2.4.1.2 Φυσικές αλληλεπιδράσεις..... | 37 |
| A.2.4.2 Αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – impurities εκδόχων..... | 37 |
| A.2.4.2.1 Υπεροξειδία..... | 37 |
| A.2.4.2.2 Αλδεϋδες και οξέα..... | 38 |
| A.2.4.2.3 Μέταλλα..... | 38 |
| A.2.5 Περιορισμοί και προοπτικές εξέλιξης μελετών συμβατότητας..... | 38 |
| A.3. Έκδοχα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη..... | 39 |
| A.3.1 Καινοτόμα έκδοχα..... | 39 |
| A.3.1.1 L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)..... | 40 |
| A.3.1.2 (n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70..... | 41 |
| A.3.2 Κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης..... | 43 |
| A.3.2.1 Αλγινικό νάτριο χαμηλού ιξώδους (2% viscosity)..... | 44 |
| A.3.2.2 Στεατικό Μαγνήσιο..... | 46 |
| A.3.2.3 Μονοϋδρική Λακτόζη..... | 47 |
| A.3.2.4 Πολυβινυλοπυρρολιδόνες χαμηλού (MW:10,000 και MW:29,000) και υψηλού μοριακού βάρους (MW:55,000)..... | 48 |
| A.3.2.5 Πολυαιθυλενοξειδία (MW:4,000,000 και MW:7,000,000)..... | 49 |
| A.3.3 Δραστική ουσία..... | 51 |

| | |
|---|----|
| A.4. Στόχος της εργασίας..... | 53 |
| B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 55 |
| B.1. Παρασκευή χμιαϊρικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70..... | 55 |
| B.1.1 Υλικά..... | 55 |
| B.1.2 Όργανα | 55 |
| B.1.3 Μέθοδος..... | 56 |
| B.1.3.1 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης..... | 56 |
| B.1.3.2 Παρασκευή λεπτού λιπιδικού υμενίου σε χμιαϊρικές διπλοστοιβάδες, σύσταση HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0..... | 56 |
| B.2. Παρασκευή χμιαϊρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη | 57 |
| B.2.1 Υλικά..... | 57 |
| B.2.2 Όργανα | 57 |
| B.2.3 Μέθοδοι..... | 58 |
| B.2.3.1 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης..... | 58 |
| B.2.3.2 Παρασκευή χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0 | 59 |
| B.2.3.3 Παρασκευή χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στη μοριακή αναλογία 9:0.1:0.0 | 59 |
| B.2.3.4 Παρασκευή χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στη μοριακή αναλογία 9:0.1:1.0 | 60 |
| B.3. Παρασκευή μιγμάτων εκδόχων – δραστηκής ουσίας..... | 61 |
| B.3.1 Υλικά..... | 61 |
| B.3.2 Όργανα | 61 |
| B.3.3 Μέθοδοι..... | 62 |
| B.3.3.1 Παρασκευή ομοιογενών μιγμάτων Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, στην αναλογία 1.0:1.0, και Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, στην αναλογία 1.0:1.0..... | 62 |
| B.3.3.2 Παρασκευή ομοιογενούς μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW 55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο στην αναλογία 1.0:0.5:1.0:0.01 | 62 |
| B.4. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry – DSC) | 63 |
| B.4.1. Υλικά | 63 |
| B.4.2 Όργανα | 65 |

| | |
|--|----|
| B.4.3 Μέθοδοι..... | 65 |
| B.4.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων | 65 |
| B.4.3.2 Βαθμονόμηση (Calibration) | 66 |
| B.4.3.3 Επιλογή πειραματικών συνθηκών | 66 |
| B.4.3.3.1 Μέτρηση καινοτόμων εκδόχων και τμημάτων τους | 66 |
| B.4.3.3.2 Μέτρηση κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης, δραστικής ουσίας, μιγμάτων κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης – δραστικής ουσίας..... | 66 |
| Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 68 |
| Γ.1. Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0..... | 68 |
| Γ.1.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0, σε Phosphate buffered saline (pH 7.4) και σε Citrate buffer (pH 4.0) κατά τη θέρμανση (Heating) | 68 |
| Γ.1.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0, σε Phosphate buffered saline (pH 7.4) και σε Citrate buffer (pH 4.0) κατά την ψύξη (Cooling) | 73 |
| Γ.2. Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών λιποσωμαϊκών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0 | 76 |
| Γ.2.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών λιποσωμαϊκών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0 κατά τη θέρμανση (Heating) | 76 |
| Γ.2.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χμιαϊρικών λιποσωμαϊκών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0 κατά την ψύξη (Cooling) | 79 |
| Γ.3. Θερμοτροπική συμπεριφορά των κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης Αλγινικό Νάτριο, Στεαϊκό Μαγνήσιο, Μονοϋδρική Λακτόζη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη χαμηλού μοριακού βάρους (PVP MW:10,000 και MW:29,000), Πολυβινυλοπυρρολιδόνη υψηλού μοριακού βάρους (PVP MW:55,000), Πολυαιθυλενοξειδίο MW:4,000,000, Πολυαιθυλενοξειδίο MW:7,000,000 και της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης..... | 81 |
| Γ.3.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Αλγινικού Νατρίου | 81 |
| Γ.3.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Στεαϊκού Μαγνησίου | 83 |
| Γ.3.3 Θερμοτροπική συμπεριφορά της Μονοϋδρικής Λακτόζης..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| Γ.3.4 Θερμοτροπική συμπεριφορά Πολυβινυλοπυρρολιδονών (PVP) διαφορετικών μοριακών βαρών..... | 87 |
| Γ.3.5 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Πολυαιθυλενοξειδίου διαφορετικών μοριακών βαρών..... | 90 |
| Γ.3.6 Θερμοτροπική συμπεριφορά της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης | 92 |
| Γ.4. Θερμοτροπική συμπεριφορά των μίγμάτων κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης – δραστικής ουσίας Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000): Αλγινικό Νάτριο: Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01 | 94 |
| Γ.4.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0 | 94 |
| Γ.4.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0 | 97 |
| Γ.4.3 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01 | 99 |
| Γ.5. Συμπεράσματα..... | 101 |
| Γ.5.1 Συμπεράσματα για χημεικές διπλοστοιβάδες και χημεικά λιποσωμιακά συστήματα παρουσία και απουσία της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης..... | 101 |
| Γ.5.2 Συμπεράσματα για κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης και μίγματα αυτών, παρουσία και απουσία της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης..... | 102 |
| Γ.5.3 Τελικά συμπεράσματα | 104 |
| Δ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 105 |
| ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 107 |
| Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 117 |
| Z.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα χημεικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0... | 117 |
| Z.1.1 Υλικά | 117 |
| Z.1.2 Όργανα..... | 117 |
| Z.1.3 Αρχή λειτουργίας όργανου Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων | 117 |
| Z.1.4 Εφαρμογή Δείγματος..... | 118 |
| Z.1.5 Μέτρηση – Αποτελέσματα – Παρατηρήσεις | 119 |
| Z.1.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:PnBA-PAA 30/70 χημεικών λιποσωμάτων (σε PBS), την t=0 days..... | 119 |
| Z.1.5.2 Μελέτη σταθερότητας HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 χημεικών λιποσωμάτων, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0 | 121 |
| Z.1.5.3 Όξινο πρωτόκολλο..... | 123 |

Z.2. Οπτικές παρατηρήσεις κατά την παρασκευή των χμαιοικών λιποσωμάτων
HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0...126

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Θερμική Ανάλυση

A.1.1 Εισαγωγικά

Η Θερμιδομετρία (Calorimetry) αποτελεί μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των θερμικών αλλαγών που προκύπτουν σε ένα δείγμα, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε φυσικές, χημικές ή βιολογικές διεργασίες. Οι μετρήσεις αυτές διεξάγονται είτε υπό σταθερό όγκο, είτε υπό σταθερή θερμοκρασία και μπορούν να ταξινομηθούν βάσει της αρχής της μέτρησης, ή της μεθόδου λειτουργίας του οργάνου (Knopp et al., 2016; Demetzos, 2008).

Με τον όρο Θερμική Ανάλυση (Thermal Analysis) ορίζεται, σύμφωνα με την International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) “Το σύνολο των τεχνικών θερμιδομετρίας στις οποίες μετρώνται οι φυσικοχημικές ιδιότητες ενός δείγματος ή των προϊόντων αντίδρασής του, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο, ενώ το δείγμα υποβάλλεται σε μια διεργασία ελεγχόμενης θερμοκρασίας· είτε διατηρώντας ισόθερμα τις συνθήκες, είτε χρησιμοποιώντας τμήματα διαφορετικής θερμοκρασίας (αύξησης ή μείωσης), σε καθορισμένο περιβάλλον (πίεση)” (Χατζηγεωργίου, 2012).

Η χρήση θερμοαναλυτικών μεθόδων στα αρχικά στάδια μελετών προμορφοποίησης έχει συνεισφέρει σημαντικά στην ταχεία πρόβλεψη, την καταγραφή και το χαρακτηρισμό ασυμβατότητας του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού (Active Pharmaceutical Ingredient, API). Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η κοστοβόρα σπατάλη υλικών και μειώνεται σημαντικά ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει η κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή του προϊόντος (Chadha et al., 2014).

A.1.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Θερμικής Ανάλυσης

Η θερμική ανάλυση παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, έναντι των υπολοίπων αναλυτικών τεχνικών (π.χ. φασματοσκοπικών ή ηλεκτροχημικών). Πιο συγκεκριμένα, υπερέχει στα εξής σημεία :

1. Είναι μια τεχνική γρήγορη, αφού ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης μπορεί να είναι από μερικά λεπτά μέχρι μερικές ώρες.
2. Λόγω πολλών επιλογών προγραμμάτων θέρμανσης και ψύξης, οι ιδιότητες του δείγματος/της ουσίας μπορούν να μελετηθούν σε ένα μεγάλο εύρος

- θερμοκρασιών και έτσι να ληφθούν πολλές πληροφορίες για την εξεταζόμενη ουσία (π.χ. θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, βαθμός κρυσταλλικότητας, κλπ).
3. Το δείγμα μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε μορφή (υγρή, στερεή, γέλη) καθώς υπάρχουν διάφοροι τύποι υποδοχέων, από διαφορετικά υλικά, που μπορούν να προσαρμοστούν στα διαφορετικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε υλικού του δείγματος.
 4. Δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος. Το μόνο που ενδέχεται να χρειαστεί είναι λειοστρίβηση (υπό συγκεκριμένες συνθήκες και όρια), καθώς και ομογενοποίηση των στερεών δειγμάτων.
 5. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται είναι πολύ μικρή (της τάξεως των 0,1-10 μg). Ωστόσο, είναι απαραίτητο να δίνεται έμφαση στην ομοιογένεια του μίγματος, ώστε το υπό ανάλυση δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό.
 6. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία οργάνων, τα οποία έχουν σχετικά μικρό κόστος αγοράς και συντήρησης.

Ωστόσο, η απουσία εκλεκτικότητας αυτών των τεχνικών τις καθιστά κάποιες φορές επικουρικό συμπλήρωμα άλλων τεχνικών ανάλυσης, όπως η Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου (IR) ή η Φασματοσκοπία Μάζας (Mass Spectrometry, MS), κλπ. Τέλος, οι τεχνικές θερμικής ανάλυσης αποφεύγονται σε περιπτώσεις ποσοτικών μετρήσεων, καθώς η ευαισθησία και η ακρίβειά τους δεν ξεπερνούν το $\pm 2\%$ (Δεμέτζος, 2014).

A.1.3 Μέθοδοι θερμικής ανάλυσης

Για τη μέτρηση της φυσικής (πχ. τήξη, κρυστάλλωση) ή χημικής (πχ. οξείδωση ή αποσύνθεση) απόκρισης ενός δείγματος σε ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα θερμοκρασίας, γίνεται χρήση των παρακάτω μεθόδων θερμικής ανάλυσης (οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες) (Gardikis et al., Chapter, 2006; Δεμέτζος, 2014):

1. Differential Thermal Analysis (DTA) - Διαφορική Θερμική Ανάλυση, κατά την οποία μετράται η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του προς εξέταση δείγματος και του δείγματος αναφοράς, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η παρακολούθηση μεταβολών στη θερμοχωρητικότητα του υλικού.
2. Thermogravimetric Analysis (TGA) - Θερμοσταθμική Ανάλυση, κατά την οποία εκτιμώνται οι μεταβολές της μάζας του δείγματος σε συνάρτηση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία.

3. Thermomechanical Analysis (TMA) - Θερμομηχανική Ανάλυση, όπου χωρίς την εφαρμογή μηχανικής τάσης, καταγράφεται η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών με τη μεταβολή της θερμοκρασίας
4. Dynamic Mechanical Analysis (DMA) - Δυναμική Μηχανική Ανάλυση, όπου με την επίδραση μηχανικής τάσης, καταγράφεται η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών με τη μεταβολή της θερμοκρασίας
5. Hot-stop Microscopy (HSM)
6. Evolved Gas Analysis (EGA) - Θερμική Ανάλυση Αερίων
7. Differential Scanning Calorimetry (DSC) - Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, η οποία θα αναλυθεί αμέσως μετά
8. Thermo-optical Analysis (TOA) - Θερμοοπτική ανάλυση.

A.1.4 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

A.1.4.1 Εισαγωγικά

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, που εισήχθη στις αρχές του 1960 από τον Perkin Elmer, ορίζεται ως η τεχνική κατά την οποία εκτιμώνται ποιοτικά οι μεταβολές της ενθαλπίας, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα καταγράφεται η θερμοχωρητικότητα της ουσίας (Heat Capacity at constant pressure, C_p) καθώς το προς εξέταση δείγμα υποβάλλεται σε ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης, υπό σταθερή πίεση (Dooren et al., 1984).

Με αυτή τη μέθοδο μετράται η συνολική ποσότητα της παρεχόμενης θερμότητας (Heat input, q) που απαιτείται για να αυξηθεί η θερμοκρασία ενός δείγματος κατά ένα βαθμό Κελσίου, υπό σταθερή πίεση (γι' αυτό και οι μονάδες μέτρησης της C_p είναι $\text{cal } ^\circ\text{C}^{-1}$ ή $\text{J } ^\circ\text{C}^{-1}$). Δηλαδή, ορίζεται ως: $C_p = (\partial q / \partial T)_p$, όπου T είναι η θερμοκρασία και q η παρεχόμενη θερμότητα.

Παρ' όλα αυτά, η συνολική ποσότητα εισερχόμενης ενέργειας που μετράται, κανονικοποιείται διαιρώντας την C_p με τον αριθμό γραμμαρίων (ή τον αριθμό mole του δείγματος). Έτσι, προκύπτει η Ειδική Θερμοχωρητικότητα (Specific Heat Capacity, c_p), που είναι η θερμότητα η οποία απαιτείται για να αυξηθεί η θερμοκρασία κατά ένα βαθμό Κελσίου, ενός γραμμαρίου του δείγματος.

Το θερμιδόμετρο καταγράφει τη διαφορική θερμότητα ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και αυτό απεικονίζεται ως μια καμπύλη η οποία αναλόγως με την

ταυτότητα του φαινομένου (ενδόθερμο ή εξώθερμο) στρέφει τα κοίλα προς κάτω ή προς τα πάνω (αυτό εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο όργανο και το λογισμικό ανάλυσης των δεδομένων που επιλέγουμε) (Gardikis et al., Chapter, 2006; Matsingou et al., 2007; Pippa et al., 2014).

Παρατηρώντας τις θερμικές μεταβάσεις, γίνεται αντιληπτό πως η θερμοχωρητικότητα σχετίζεται με τη δεύτερη παράγωγο της ελεύθερης ενέργειας. Αν η θερμοκρασία μετρηθεί από T_0 σε T_1 , η ενθαλπία της μετάβασης (ΔH) ορίζεται ως : $\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT$.

Επειδή, όμως, η τιμή του ΔT είναι μικρή, η C_p θεωρείται ανεξάρτητη της θερμοκρασίας μεταξύ T_0 και T_1 , και έτσι η ενθαλπία μετάβασης (ΔH) υπολογίζεται από το ολοκλήρωμα της καμπύλης (διαφορική θερμότητα δείγματος προς μέτρηση-δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με χρόνο): $\Delta H=C_p dT$ (Δεμέτζος, 2014).

A.1.4.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Διαφορικής Θερμιδομετρικής Σάρωσης
Η DSC αποτελεί μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές σε πάρα πολλά πεδία, καθώς μπορεί και προσδιορίζει φαινόμενα, όπως το σημείο/εύρος τήξης, η θερμότητα τήξης (Heat of fusion), η καθαρότητα, ο πολυμορφισμός, η εξάτμιση, η εξάχνωση, η εξαέρωση, η συμβατότητα, η υαλώδης μετάπτωση, η αλληλεπίδραση, η οξείδωση, η αποσύνθεση, κλπ. ουσιών ή μιγμάτων του. Παρέχεται λοιπόν, ακριβής πληροφόρηση, γρήγορα, εύκολα, τόσο για φυσικές ιδιότητες, όσο και για το ενεργειακό περιεχόμενο (Demetzos, 2008; Dooren et al., 1984). Πολλές φορές αυτός ο όγκος πληροφοριών είναι αδύνατο να συλλεχθεί άμεσα και εύκολα, χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε άλλη τεχνική. Είναι γεγονός πως η DSC θα συνεχίσει να βρίσκεται στο προσκήνιο των τεχνικών ανάλυσης που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις διάφορες επιστήμες, ιδίως όταν παράλληλα αναπτύσσονται ειδικά προγράμματα που ρυθμίζουν προγραμματισμένα τη θερμοκρασία, με σχηματισμούς ελέγχων μικροκλίμακας ή ακόμη και ρομποτικά συστήματα (Clas et al., 1999). Επιπρόσθετα, ως τεχνική, η Θερμικής Ανάλυση διαθέτει και τα υπόλοιπα προτερήματα αυτού του είδους αναλυτικών τεχνικών, τα οποία προαναφέρθηκαν (A.1.2.).

Ωστόσο, η τεχνική της κλασσικής DSC έχει κάποιους φυσικούς περιορισμούς. Συγκεκριμένα, σε κάποια θερμογράμματα που παρουσιάζουν σύνθετες ή ασθενείς

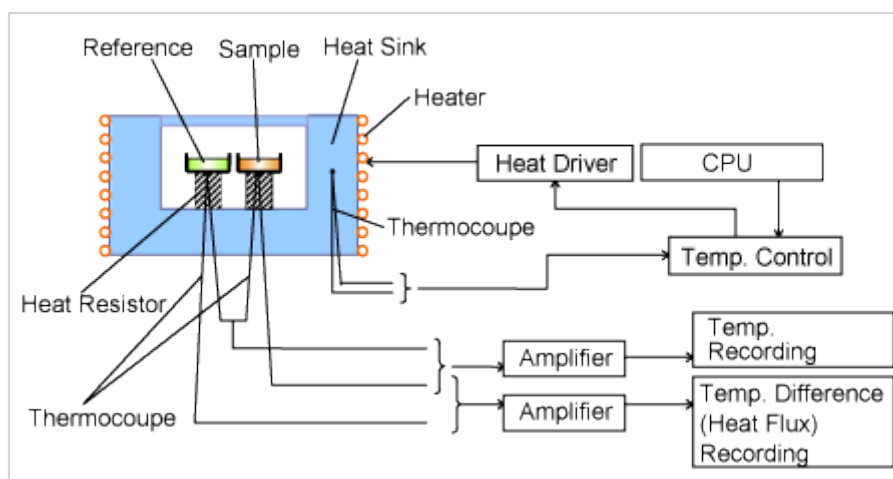
μεταβάσεις, και/ή θερμικά γεγονότα, που υπερκαλύπτουν το ένα το άλλο (όπως τήξη/κρυσταλλοποίηση ή εξάτμιση/υαλώδης μετάπτωση), καθίσταται πολύ δύσκολος ο προσδιορισμός των συστατικών που συνεισφέρουν ξεχωριστά σε αυτές τις καταστάσεις. Λύση σε αυτούς τους περιορισμούς μπορεί να δοθεί μειώνοντας το ρυθμό θέρμανσης ή το μέγεθος του δείγματος και έτσι να διαχωριστούν οι κορυφές που υπερκαλύπτονται. Αντίθετα, για να μπορέσουν να ανιχνευθούν οι ασθενείς μεταβάσεις, απαιτείται μια αυξημένη ευαισθησία, η οποία επιτυγχάνεται αυξάνοντας το ρυθμό θέρμανσης και το μέγεθος του δείγματος. Εάν όλες αυτές οι διορθωτικές ενέργειες εφαρμοστούν σε μία κλασική DSC, τα θερμογράμματα που θα προκύψουν θα είναι πολύ δύσκολο να κατανοηθούν και η ερμηνεία τους ιδιαίτερα σύνθετη. Αυτός είναι και ο λόγος που στις συγκεκριμένες ιδιαίτερες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται τροποποιημένες DSC τεχνικές, όπως η Modulated Temperature DSC (MDSC), οι οποίες θα αναλυθούν συνοπτικά στο A.1.5.

A.1.4.3 Τύποι οργάνων Διαφορικής Θερμιδομετρικής Σάρωσης

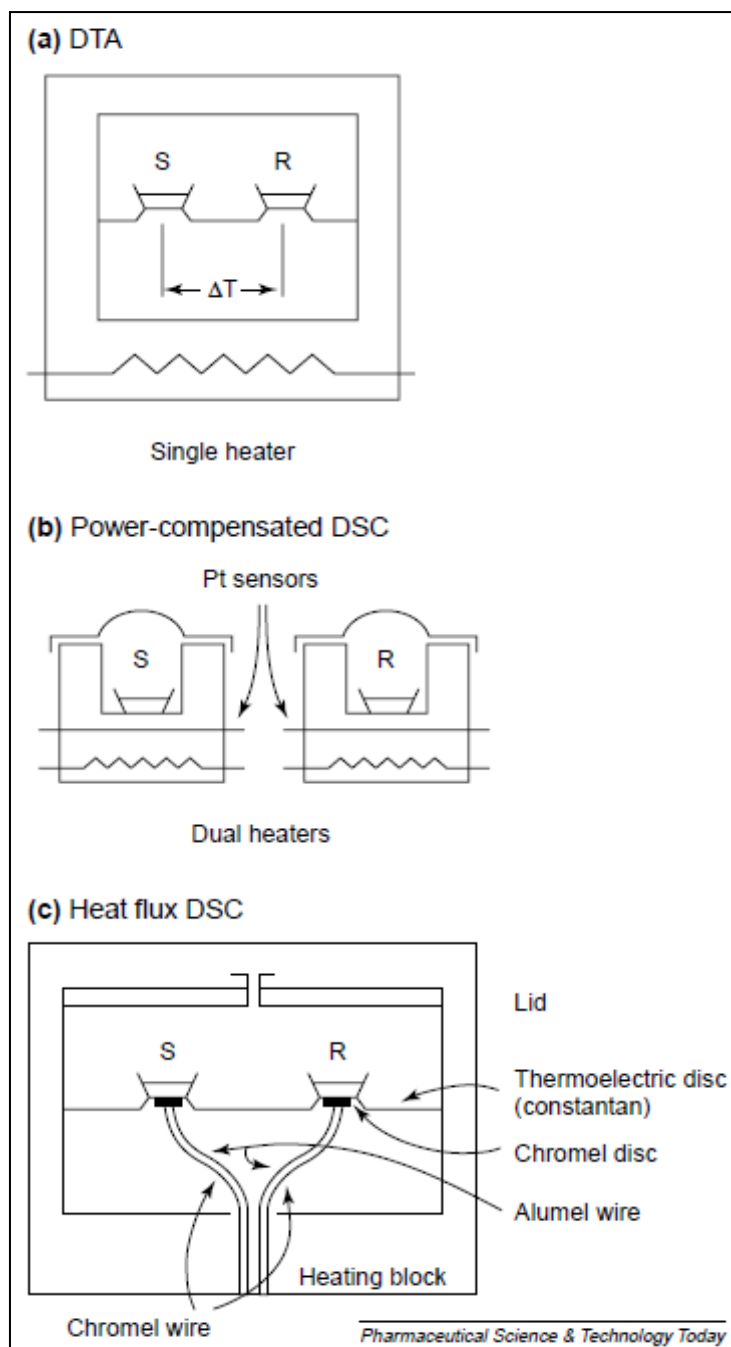
Κατά τη διαφορική θερμιδομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε διαφορικός θερμικός αναλυτής (Differential Thermal Analyzer, DTA) είτε διαφορικό θερμιδόμετρο σάρωσης (Differential Scanning Calorimeter, DSC). Με αυτό τον τρόπο παρέχεται ποσοτικοποίηση των πληροφοριών που αφορούν μεταβάσεις εξώθερμες, μεταβάσεις ενδόθερμες, καθώς και αλλαγές της θερμοχωρητικότητας, ως μια συνάρτηση της θερμοκρασίας και του χρόνου. Και στις δύο τεχνικές υπάρχουν δύο χώροι: ένας για το προς εξέταση δείγμα (Sample, S) και ένας για το δείγμα αναφοράς (Reference, R). Η βασική διαφοροποίηση έγκειται στο ότι με τον DTA αναλυτή μετρώνται διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ Sample και Reference, ενώ με το DSC ενεργειακές διαφορές, (λόγω της διαφοράς της ροής της θερμότητας που εκλύεται κατά την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος, η οποία μεταφράζεται ως μεταβολή μίας ιδιότητας).

Υπάρχουν 2 τύποι οργάνων DSC: ο DSC αντιστάθμισης ισχύος (power-compensation DSC) και ο DSC ροής θερμότητας (heat-flux DSC). Στον πρώτο τύπο, οι υποδοχείς του Sample και του Reference θερμαίνονται από ανεξάρτητες πηγές θερμότητας (αντιστάσεις), αφού υπάρχουν δύο ξεχωριστοί χώροι στους οποίους τοποθετούνται τα δείγματα. Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή, κάτι που σημαίνει πως η πλεονάζουσα ποσότητα θερμότητας προστίθεται ή αφαιρείται κατά μία μετάπτωση μεταξύ των δύο υποδοχέων. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται εξισορρόπηση της θερμοκρασίας και

απόδοση της καμπύλης της θερμοδομετρικής μέτρησης της ενέργειας μετάπτωσης (ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του δείγματος). Εν αντιθέσει με το DSC αντιστάθμισης ισχύος, ο DSC ροής θερμότητας περιλαμβάνει μόνο ένα ενιαίο χώρο-κλίβανο (furnace), μέσα στον οποίο διοχετεύεται θερμότητα μεταξύ των υλικών S και R, διαμέσου μιας κατάλληλης συνδεσμολογίας θερμοζυγών (αισθητήρων). Η μέτρηση ροής της θερμότητας είναι ανεξάρτητη των ιδιοτήτων του δείγματος και ανάλογη της διαφοράς κατά την έξοδο από τους θερμοζυγούς (Clas et al., 1999; Δεμέτζος, 2014).



Εικόνα A1: Σχηματικό διάγραμμα DSC ροής θερμότητας (<http://Hitachi-Hightec.com>) (Bibi et al., 2015).



Εικόνα Α2: Σχηματικό διάγραμμα του (a) διαφορικού θερμικού αναλυτή (DTA), του (b) αναλυτή αντιστάθμισης ισχύος (power-compensation DSC) και του (c) ροής θερμότητας (heat-flux DSC) (Clas et al., 1999).

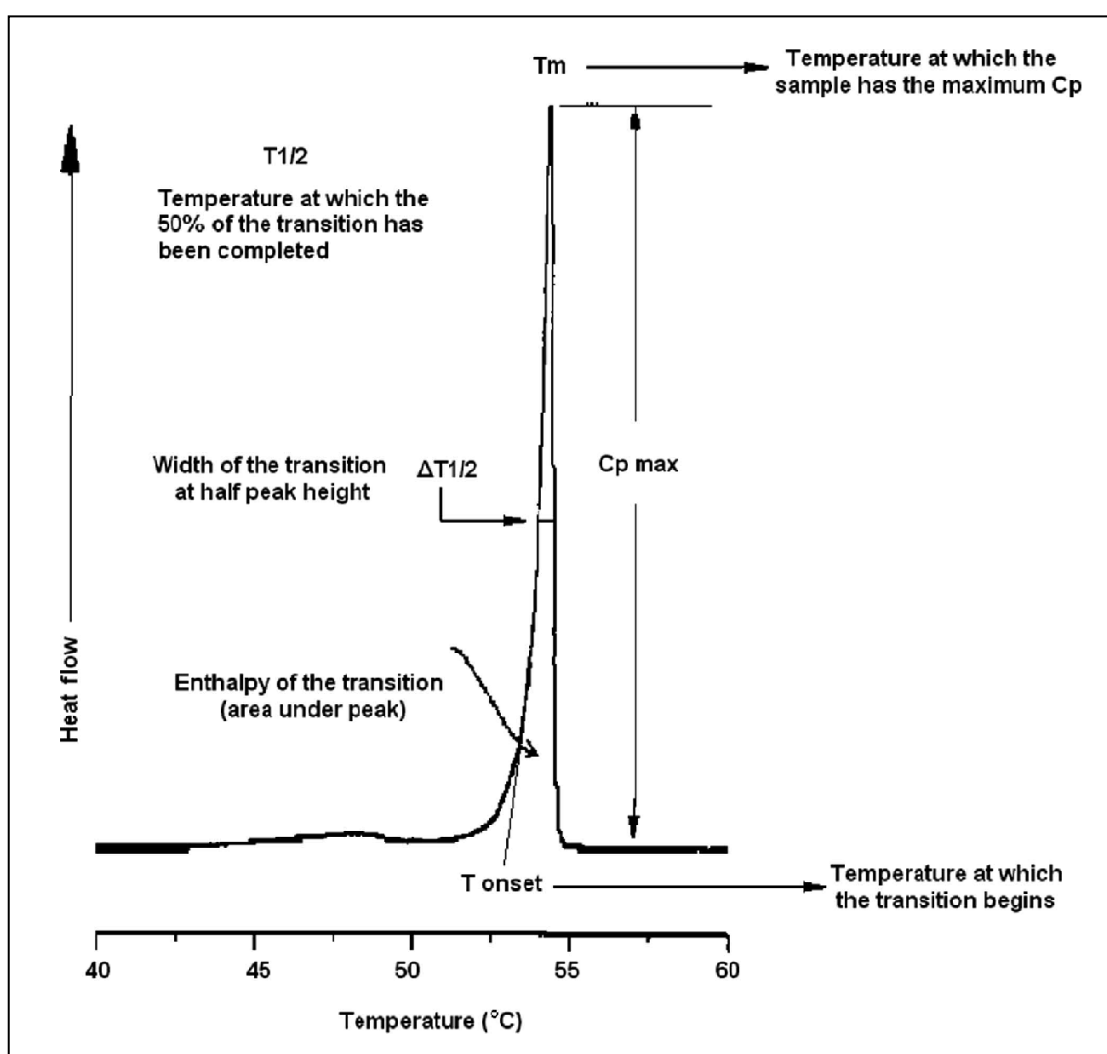
A.1.4.4 Τυπικό Θερμογράφημα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης

A.1.4.4.1 Γενικά

Καθώς πραγματοποιείται η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, καταγράφεται στον υπολογιστή ένα ηλεκτρικό σήμα, με τη μορφή κορυφών, ενδόθερμων ή εξώθερμων, ανάλογα με τις μεταβολές που υφίσταται το δείγμα. Το προκύπτον θερμογράφημα DSC φέρει στον άξονα των τετμημένων τη θερμοκρασία, T , ενώ στον άξονα των

τεταγμένων απεικονίζεται η διαφορά της θερμικής ισχύος μεταξύ των χώρων S και R, dq/dt (δηλαδή: η διαφορά στην ενέργεια που παρέχεται στο σύστημα υπό μορφή θερμότητας στη μονάδα του χρόνου). Επειδή ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας είναι συγκεκριμένος (προκαθορίζεται από το χρήστη), ο χρόνος συνδέεται με τη θερμοκρασία και έτσι ο όρος dq/dt ισοδυναμεί με τον όρο dH/dt (αφού $dH=C_p \cdot dT$), ο οποίος είναι ανάλογος της θερμοχωρητικότητας. Συνεπώς, τελικά, παρατηρούνται μεταβολές της θερμοχωρητικότητας της ουσίας, (μονάδες: mcal/s) συναρτήσει της θερμοκρασίας (μονάδες: °C).

A.1.4.4.2 Χαρακτηριστικές θερμοκρασίες θερμογράμματος



Εικόνα Α3: Χαρακτηριστικές θερμοδυναμικές παράμετροι σε ένα θερμογράμμα DSC (Demetzos, 2008).

Η DSC έχει αρκετές χαρακτηριστικές θερμοκρασίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν διάφορα φαινόμενα που μπορεί να λάβουν χώρα κατά τη διαδικασία της θέρμανσης.

Αναλυτικά, είναι σημαντικό για κάθε μεταβολή-φαινόμενο να προσδιορίζονται:

1. Η θερμοκρασία έναρξης (Onset temperature, T_{onset}), κατά την οποία ξεκινά το φαινόμενο της μεταβολής της υπάρχουσας φάσης, σε συνάρτηση με τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Η T_{onset} προκύπτει από την τομή της εφαπτομένης στη γραμμή βάσης (baseline) με την εφαπτομένη της πλευράς της κορυφής που οδηγεί στην ενδόθερμη ή εξώθερμη μετάβαση.
2. Η θερμοκρασία κορυφής (Peak temperature, T_m), που είναι η θερμοκρασία στην κορυφή της καμπύλης.
3. Η θερμοκρασία λήξης (Recovery or endset temperature, T_{endset}) όπου είναι η θερμοκρασία στην οποία το φαινόμενο ολοκληρώνεται και η μετάβαση συναντά εκ νέου τη γραμμή βάσης (Gardikis et al., Chapter, 2006; Gardikis et al., 2006; Δεμέτζος, 2014).

Επιπρόσθετα, στις παραπάνω θερμοκρασίες, μπορούν να οριστούν η $T_{1/2}$, η οποία αποτελεί τη θερμοκρασία που ανταποκρίνεται στο μισό της μεταβολής της ενθαλπίας (δηλαδή στο μέσο της ασύμμετρης καμπύλης μετάβασης φάσης), κατά τη διεξαγωγή της μετάβασης, και η $\Delta T_{1/2}$, όπου είναι το εύρος της θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της κορυφής, και συνήθως σχετίζεται με τη συνεργασιμότητα των υλικών κατά τη μετάβαση φάσης, σε συνάρτηση με τη μεταβολή της θερμοκρασίας (Ionova et al., 2011; Gardikis et al., 2010).

A.1.4.4.3. Θερμικές μεταβολές που παρατηρούνται σε ένα θερμοδιάγραμμα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης

Κατά τη θέρμανση ενός δείγματος με την τεχνική DSC μπορούν να λάβουν χώρα τα εξής φαινόμενα (σειρά που εμφανίζονται αυξανόμενης της θερμοκρασίας).

1. Υαλώδης Μετάπτωση (Glass transition, T_g) (θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης)

Πρόκειται για μια μετάβαση ψευδο-δευτέρας τάξεως, η οποία δεν συνοδεύεται από μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας του συστήματος, και έτσι, τελικά, αυξάνεται η θερμοχωρητικότητα του υλικού. Αυτή η μετάπτωση αφορά άμορφα ή ημικρυσταλλικά υλικά, τα οποία μεταπίπτουν σε ένα εύρος θερμοκρασίας (άρα η κορυφή δεν είναι οξεία και εξαρτάται από τη μοριακή δομή του υλικού), από τη σκληρή υαλώδη φάση σε μία πιο μαλακή-εύκαμπτη-ιξωδοελαστική. Όπως προαναφέρθηκε, η κορυφή δεν είναι οξεία, καθώς δεν υπάρχει 100% κρυσταλλικό

πολυμερές και άρα η μετάβαση γίνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών, ανεξάρτητα από το ότι τελικώς ορίζεται η T_g . Η T_g εξαρτάται από πολλές μοριακές παραμέτρους, με χαρακτηριστικές την ευκαμψία της μακρομοριακής πολυμερικής αλυσίδας, την ισχύ των διαμοριακών δυνάμεων, την ύπαρξη πλαστικοποιητών (όπως είναι η υγρασία), το μοριακό βάρος (MW) (για τα πολυμερή είναι γνωστό ότι η T_g παρουσιάζει εξάρτηση από το MW σε χαμηλές τιμές MW, ενώ σε υψηλότερες τιμές παρουσιάζει ασυμπτωτική συμπεριφορά. Αντίθετα, για μικρά μόρια, η T_g τείνει να ακολουθεί την πορεία της θερμοκρασίας τήξης), το βαθμό δικτύωσης, την κρυσταλλικότητα, κλπ. (Baird et al., 2012).

2. Κρυστάλλωση (Crystallization, T_c)

Πρόκειται για μια εξώθερμη μετάβαση, η οποία θεωρείται ως η αντίστροφη πορεία της τήξεως ενός υλικού, δηλαδή πραγματοποιείται υπό ελεγχόμενη ψύξη του μίγματος, και εντοπίζεται πάντοτε μεταξύ της T_g και της θερμοκρασίας τήξεως του υλικού (T_m). Το φαινόμενο της κρυστάλλωσης πραγματοποιείται σε υλικά που κρυστάλλωσαν και σε υλικά που δεν έχουν κρυσταλλώσει, αλλά είναι δυνατόν να κρυσταλλώσουν μέχρι ενός βαθμού. Συνήθως, η κρυστάλλωση δεν είναι πλήρης και έτσι οι ενθαλπίες τήξεως και κρυσταλλώσεως δεν ταυτίζονται. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα περισσότερα οργανικά και πολυμερικά υλικά κρυσταλλώνουν σταδιακά, περνώντας από το αρχικό στάδιο της πυρήνωσης (nucleation), κατά το οποίο σχηματίζονται κέντρα-πυρήνες της κρυστάλλωσης, και ακολουθεί το στάδιο ανάπτυξης των κρυστάλλων (growth). Είναι σημαντικό να τονιστεί πως ο ρυθμός ψύξεως πρέπει να είναι μικρός, διότι εάν ξεπερνά κάποιο όριο υπάρχει κίνδυνος να μετατραπεί, κατά μεγάλο ποσοστό, το τήγμα σε άμορφο υλικό. Αν συμβεί κάτι τέτοιο, σε επακόλουθη τήξη του δείγματος, θα αναδιοργανωθεί το άμορφο τμήμα προς σταθερότερες θερμοδυναμικά μορφές και έτσι θα σχηματιστούν νέοι κρύσταλλοι. Ο σχηματισμός τους θα αποτελεί μια εξώθερμη διαδικασία, η οποία εκλύοντας θερμότητα, οδηγεί στην εμφάνιση μίας κορυφής στο θερμοδιάγραμμα, πριν την T_m . Αυτή η κορυφή αποτελεί την ψυχρή κρυστάλλωση και είναι πιθανό να συμβεί σε μακρομοριακές ενώσεις.

3. Τήξη (Melting, T_m)

Πρόκειται για το πιο σύνηθες θερμικό φαινόμενο ενδόθερμης (απαιτεί ενέργεια), πρωτοταξικής μετάβασης (αφού οι θερμοδυναμικές παράμετροι -όγκος, ενθαλπία, εντροπία- παρουσιάζουν ασυνέχεια στο σημείο μετάβασης) (Baird et al., 2012). Αν πρόκειται για μικρά μόρια (όπως και για 100% καθαρές κρυσταλλικές ενώσεις), η κορυφή αναμένεται να είναι πολύ οξεία. Αντίθετα, αν πρόκειται για μεγαλομόρια (όπως, τα πολυμερή ή οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες ή οι ακαθαρσίες (impurities) σε δείγματα), η κορυφή διευρύνεται και η θερμοκρασία τήξης μειώνεται (Clas et al., 1999; Demetzos, 2008). Η ολοκλήρωση της περιοχής κάτω από την καμπύλη της κορυφής τήξης δίνει τη θερμότητα που απορροφήθηκε κατά τη διαδικασία της τήξης. Η θέση, η μορφή και η οξύτητα της καμπύλης έχουν άμεση εξάρτηση από την καθαρότητα, το είδος του υλικού, καθώς και την κρυσταλλική τελειότητα. Πιο συγκεκριμένα, αξίζει να αναφερθούν κάποιες συχνές μετατοπίσεις/αλλαγές που πιθανώς παρατηρούνται στην καμπύλη, αλλά, και πώς αυτές ερμηνεύονται τις περισσότερες φορές, πέρα από την παρουσία impurities, που προαναφέρθηκαν. Για μη τέλεια αναπτυγμένους κρυστάλλους, οι οποίοι παρουσιάζουν μικρότερη T_m , μπορεί να γίνει απαλοιφή τους από το δείγμα εάν θερμανθούν σε μια θερμοκρασία μικρότερη από τη μέγιστη θερμοκρασία τήξεως των τέλειων κρυστάλλων (που χρειάζονται μεγάλη ενέργεια για να τακούν και ιδίως για όσους απαιτούνται υψηλότερες θερμοκρασίες τήξεως) και το δείγμα να ψυχθεί απότομα σε χαμηλή θερμοκρασία (φαινόμενο Ανόπτωσης) (Χατζηγεωργίου, 2012).

Υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν κορυφές πριν και μετά από την κύρια μετάβαση, οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις υποδεικνύουν το σχηματισμό υποπεριοχών (domains), και έτσι οδηγούν σε ετερογένεια το σύστημα, δηλαδή σε διαχωρισμό φάσεων (πχ. αν υπάρχει μεγάλο ποσοστό μοριακού περιεχομένου ενός πολυμερούς ενσωματωμένο στη λιπιδική διπλοστοιβάδα) (Gardikis et al., 2006).

Τέλος, φαινόμενα όπως η εξαφάνιση της προμετάβασης, η εμφάνιση χαρακτηριστικών «shoulders», η ενδοεισχώρηση, αλλά και ο σχηματισμός «solution-like» models είναι κάποια φαινόμενα που είθισται να παρατηρούνται σε θερμογράμματα χμιαϊκών λιπιδικών διπλοστοιβάδων και θα αναλυθούν εκτενώς στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Εκτός των παραπάνω χαρακτηριστικών φαινομένων, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν και άλλες κορυφές που μπορούν να αποδοθούν είτε σε απώλεια μορίων του διαλύτη,

όπως είναι η εξάτμιση (κυρίως πρόκειται για ενδόθερμα φαινόμενα), είτε και σε χημικές αντιδράσεις, όπως η αποσύνθεση. Συνοπτικά, τα παραπάνω παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας Α1: Ενθαλπικές μεταβολές που παρατηρούνται κατά τη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Clas et al., 1999; Δεμέτζος, 2014)

| Ενδόθερμες | Εξώθερμες |
|-------------------|--------------|
| Τήξη | Κρυστάλλωση |
| Εξάτμιση | Συμπύκνωση |
| Εξάχνωση | Στερεοποίηση |
| Εκρόφηση | Προσρόφηση |
| Αποδιαλύτωση | Επιδιαλύτωση |
| Διάσπαση | Διάσπαση |
| Αναγωγή | Οξειδωση |
| Αποσύνθεση | Αποσύνθεση |
| Υαλώδης μετάπτωση | |
| Εκτόνωση υάλου | |

A.1.4.5 Σημεία εξέχουσας προσοχής κατά την εκτέλεση DSC πειραμάτων

Η επιτυχία των DSC πειραμάτων εξαρτάται από κάποια βασικά σημεία, στα οποία δίνεται προσοχή κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, κατά την επιλογή των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών, αλλά και κατά τη ρύθμιση των οργάνων. Αρχικά, είναι αναγκαίο να γίνει η κατάλληλη επιλογή μικρής μεταλλικής επιφάνειας εναπόθεσης του υλικού (pan), με σκοπό τη βέλτιστη θερμική αγωγιμότητα, αλλά και την ελάχιστη πιθανή αλληλεπίδραση με το υλικό του pan (αλουμίνιο, πλατίνα, ανοξείδωτο ατσάλι, ασήμι). Τα διάφορα είδη pan παρέχονται από τον κατασκευαστή του οργάνου και μπορεί να είναι τεσσάρων τύπων: i) ανοιχτά, ii) με οπή, iii) καλυμμένα, iv) σφραγισμένα.



Εικόνα A4: Διαφορετικοί τύποι pan που χρησιμοποιούνται στη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (ανοιχτός, με οπή, καλυμμένος και σφραγισμένος) (Clas et al., 1999).

Για την επίτευξη άμεσης ποσοτικοποίησης, είναι προτιμότερο οι μάζες των pan, του Sample και του Reference, να ταυτίζονται. Τα σφραγισμένα pans χρησιμοποιούνται συνήθως, για την αποτροπή της επαγόμενης από τη θερμότητα απελευθέρωσης του δείγματος (ή κάποιων προϊόντων αντίδρασης). Παρόλα αυτά, όμως, και αυτά τα pan δεν είναι τέλεια κλεισμένα και είναι πιθανόν να καούν εάν θερμανθούν σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, κάτι που θα αποτυπωθεί ως ανωμαλία θερμικών συμβάντων στο θερμογράμμα. Αυτός είναι και ο λόγος που προέκυψε η ιδέα των pan με οπή, ώστε να περιορίζονται/αποφεύγονται φαινόμενα έκλουσης σε υψηλές θερμοκρασίες.

Δεύτερο σημείο που χρήζει προσοχής είναι το μέγεθος του δείγματος. Είναι γεγονός πως προτιμώνται, στις περισσότερες περιπτώσεις, μικρά μεγέθη δείγματος (2-5mg), καθώς υφίστανται λιγότερες θερμικές διαφοροποιήσεις (thermal gradients). Κατά την τοποθέτηση στο pan, ζυγίζονται άμεσα, και εάν πρόκειται για δείγματα σε μορφή κόνεως (πολύ σημαντικό για υλικά χαμηλής πυκνότητας, όπως λυοφιλοποιημένα δείγματα), καλό θα είναι να πιέζονται ελαφρά στον πάτο του pan, ώστε να διασφαλίζεται η καλή θερμική επαφή (Clas et al., 1999).

Τρίτο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η παράμετρος του μεγέθους των σωματιδίων, καθώς επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο που θα εγκιβωτιστεί το δείγμα. Η εξέχουσα σημασία αυτής της παραμέτρου, μπορεί να παρουσιαστεί μέσα από ένα παράδειγμα που αφορά στην εφαρμογή της DSC στον προσδιορισμό ακαθαρσιών. Συγκεκριμένα, συχνά διαπιστώνεται, ότι σωματίδια μεγάλου μεγέθους έχουν υψηλότερη καθαρότητα, ενώ ακόμη μεγαλύτερα σωματίδια παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές καθαρότητας, καθώς υπάρχει χαμηλότερη ποσότητα μεταφερόμενης θερμότητας, η οποία διευρύνει την καμπύλη του θερμογράμματος και οδηγεί σε τιμές καθαρότητας μικρότερου βαθμού. Αντιθέτως, σωματίδια μικρότερου μεγέθους παρουσιάζουν σχετικά χαμηλές τιμές καθαρότητας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα πιο πολλά κρυσταλλικά “ελλείμματα”, που παρουσιάζουν τα μικρότερα σωματίδια, τα οποία

αυξάνουν την ενεργειακή τους κατάσταση, μειώνοντας το ύψος της κορυφής και διευρύνοντάς την, οδηγώντας σε χαμηλότερες τιμές καθαρότητας. Έχει αποδειχθεί ότι περαιτέρω αύξηση των κρυσταλλικών ελλειμμάτων-ατελειών μπορεί να οδηγήσει σε άμορφη κατάσταση τελικώς, που με τη σειρά της θα σήμαινε ολική εξαφάνιση της κορυφής τήξης. Επίσης, οι χαμηλές τιμές καθαρότητας μπορεί να σχετίζονται με μεγαλύτερη, συνολικά σχηματιζόμενη από μικρά σωματίδια, επιφάνεια, με αποτέλεσμα να είναι ανομοιογενώς διασκορπισμένη η ποσότητα των ακαθαρσιών. Πολλές φορές τα σωματίδια μπορεί να συσσωματώνονται, γεγονός που οδηγεί σε ψευδώς υψηλότερη τιμή καθαρότητας, μολονότι κοστίζει ενεργειακά η έναρξη της τήξης των συσσωματωμάτων, μόλις ξεκινήσει, επιταχύνεται απότομα, οδηγώντας σε πιο οξεία κορυφή, συγκριτικά με τα μη συσσωματωμένα σωματίδια. Από όλα τα παραπάνω, η Αμερικανική Φαρμακοποιία κατέληξε και εξέδωσε οδηγία το 1980 κατά την οποία τα δείγματα πρέπει να κονιοποιούνται πριν την εισαγωγή τους για DSC ανάλυση, τόσο ώστε να μη συσσωματώνονται, λόγω δημιουργίας ηλεκτροστατικών φορτίων, διασφαλίζοντας υψηλή θερμική αγωγιμότητα μεταξύ του δείγματος και της επιφάνειας του pan (Dooren et al., 1984).

Όσον αφορά στις πειραματικές συνθήκες, είναι σημαντικό να επιλεχθούν με προσοχή οι θερμοκρασίες έναρξης και λήξης οποιουδήποτε σταδίου θέρμανσης ή τήξης, καθώς και ο ρυθμός (ή οι ρυθμοί) σάρωσης. Η πλειονότητα των οργάνων δεν μπορεί να επιτύχει ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, ακριβώς τη στιγμή της έναρξης και ακριβώς στο τέλος της σάρωσης, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του γνωστού “start-up loop” φαινομένου. Για να διασφαλιστεί, λοιπόν, ότι η μετάβαση θα παρατηρηθεί και δεν θα χαθεί, προτάσσεται να προγραμματίζεται το όργανο να μετράει στην αρχή τουλάχιστον 30K κάτω από τη θερμοκρασία έναρξης και τουλάχιστον 10K πάνω από τη θερμοκρασία, όπου ολοκληρώνεται το υπό μελέτη φαινόμενο. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται μία σταθερή γραμμή βάσης πριν και μετά την οποιαδήποτε καταγραφή μετάβασης. Οι ρυθμοί σάρωσης διαφοροποιούνται και εξαρτώνται τόσο από το όργανο (υπάρχουν συσκευές DSC που δεν ξεπερνούν τους 40K min^{-1} , και άλλα που μπορούν να σαρώσουν με ρυθμό μικρότερο από 1K min^{-1}). Πολύ σημαντικός παράγων, που αξίζει να προβλεφθεί, είναι οι συνθήκες φέροντος αερίου (purge gas conditions), όπως και ο ρυθμός της ροής, αλλά και ο τύπος του αερίου. Συνήθως επιλέγεται, ως φέρον αέριο το άζωτο, αλλά σε ιδιαίτερες περιπτώσεις (όπως όταν γίνονται εναλλαγές/ρυθμίσεις της θερμοκρασίας ανά πολύ

σύντομες χρονικές περιόδους, δηλαδή βραχύτερες των 40 δευτερολέπτων), επιλέγεται το ήλιο ως φέρον αέριο, καθώς έχει μεγαλύτερη θερμική αγωγιμότητα και παρέχει βελτιωμένο χρόνο απόκρισης (Knorr et al., 2016).

Τέλος, προκειμένου να θεωρούνται αξιόπιστα τα DSC αποτελέσματα, είναι αναγκαίο όλες οι μετρήσεις να πραγματοποιούνται σε βαθμονομημένα όργανα (Calibration). Η βαθμονόμηση πρέπει να πραγματοποιείται ξεχωριστά για κάθε ρυθμό σάρωσης που χρησιμοποιείται, τόσο για τη θέρμανση, όσο και για την ψύξη. Τα calibration standards που χρησιμοποιούνται, πιο συχνά, είναι τα μέταλλα, όπως το ίνδιο, ο κασσίτερος, το βισμούθιο και ο μόλυβδος. Περιορισμένη είναι η χρήση του υδραργύρου, καθότι τοξικός, όπως και του γαλλίου, εξαιτίας της δυσκολίας χειρισμού του. Όταν μελετώνται οργανικά υλικά, προτιμώνται για τη βαθμονόμηση οργανικά υλικά, εξαιτίας των σημαντικών διαφορών θερμικής αγωγιμότητας, χωρητικότητας και θερμοκρασίες τήξεως.

A.1.4.6 Τρόποι διατήρησης πειραματικής ακρίβειας και επαναληψιμότητας

Κατά το χειρισμό οργανικών υλικών, είναι σύνηθες το φαινόμενο της εναπόθεσης καταλοίπων άνθρακα στον DSC ανιχνευτή, καθώς κατά τη θέρμανση μπορεί να συμβούν αποσυνθέσεις του προς μελέτη αγνώστου υλικού. Για να αποφευχθεί κάτι τέτοιο, εκτιμάται ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας αποσύνθεσης, με τη βοήθεια της θερμοσταθμικής ανάλυσης. Για να μπορέσει να γίνει επιμήκυνση του χρόνου ζωής του ανιχνευτή, πρέπει να αποφεύγονται οι πλεονάζουσες ποσότητες δείγματος, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται ανοιχτά pan ή pan με σπή. Προκειμένου, λοιπόν, να διασφαλιστεί ότι οι ανιχνευτές είναι καθαροί, χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις διαφορετικές μέθοδοι καθαρισμού: χρήση διαλύτη, εφαρμογή πολύ υψηλής θερμοκρασίας και χρήση υάλινου νήματος. Τέλος, είναι αναγκαίο εβδομαδιαίως, τριμηνιαίως και ετησίως να βαθμονομείται το όργανο, με standards που έχουν θερμοκρασία μετάβασης παρεμφερή με εκείνη των υπό μελέτη δειγμάτων (Clas et al., 1999).

A.1.4.7 Εφαρμογές Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης στις Φαρμακευτικές Επιστήμες

Τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα της μεθόδου DSC, καθώς και η ποικιλία πληροφοριών, που παρέχει μια τέτοια ανάλυση, καθιστούν τη μέθοδο αυτή προεξέχουσας σημασίας σε πολλά πεδία. Η μέθοδος DSC κερδίζει έδαφος έναντι των

υπολοίπων αναλυτικών τεχνικών στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων (δύναται να επεξηγήσει τη συμπεριφορά πολυσακχαριτών, να χαρακτηρίσει μίγματα λιπαρών ουσιών, να προσδιορίσει την κορεστότητα-ακορεστότητα των λιπαρών ουσιών, αλλά και να εξετάσει τη φυσική κατάσταση και τις ιδιότητες του περιεχομένου τους σε νερό), στο πεδίο έρευνας και ανάπτυξης μακρομοριακών συστημάτων, όπως τα πολυμερή, σε ηλεκτρονικά υλικά, σε οργανικές και ανόργανες ενώσεις, ακόμη και στο πεδίο της βιολογίας (μελέτη βιολογικών οργανισμών) (Χατζηγεωργίου, 2012).

Όσον αφορά στις φαρμακευτικές επιστήμες, εκτός από το πεδίο της ανάπτυξης φαρμάκων (χαρακτηρισμός ενός συστατικού ή πολύπλοκου μίγματος), η μέθοδος DSC εφαρμόζεται και στη μελέτη βιομορίων (πρωτεϊνών), ως συμπληρωματικό διαγνωστικό εργαλείο για τον έλεγχο βιολογικών δειγμάτων (νεώτερη εφαρμογή), για τον εντοπισμό παράνομων παρτίδων δισκίων (επικουρικά των ιατροδικαστικών προσδιορισμών της αστυνομίας και των Ρυθμιστικών Αρχών), αλλά και για τη μελέτη λιπιδικών διπλοστοιβάδων (βιομιμητικά μοντέλα κυτταρικών μεμβρανών, ως δομικό μέρος φορέων βιοδραστικών μορίων).

A.1.4.7.1 Εφαρμογές στην Ανάπτυξη και τον Έλεγχο Φαρμάκων

A.1.4.7.1.1 Χαρακτηρισμός ενός συστατικού

A.1.4.7.1.1.1 Προσδιορισμός Καθαρότητας Κρυσταλλικής Ουσίας

Η καθαρότητα μίας κρυσταλλικής ουσίας μπορεί να υπολογιστεί από την ενθαλπία τήξης και τη θερμοκρασία τήξης χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Van't Hoff:

$$T_s = T_e - (R \cdot T_e^2 \cdot X / \Delta H_o \cdot F_i)$$

Όπου, T_s η θερμοκρασία του δείγματος σε ισορροπία (K), T_e η θερμοκρασία τήξης του καθαρού υλικού (K), R η σταθερά των αερίων (8,314 J/mol/K), X το μοριακό κλάσμα της πρόσμιξης, ΔH_o η ενθαλπία της καθαρής ουσίας (J/mol) και F το κλάσμα του δείγματος που τήκεται σε θερμοκρασία T_s . Όταν η T_s απεικονίζεται ως συνάρτηση του $1/F_i$ αναμένεται να προκύψει μια ευθεία γραμμή. Ωστόσο, τα διαγράμματα Van't Hoff απέχουν από την “ιδανική ευθεία” και έχουν μορφή καμπύλης, λόγω φαινομένων θερμικής υστέρησης και σχηματισμού συμπαγών διαλυμάτων. Επιπλέον, είναι πιθανό ένα σημαντικό ποσοστό του υλικού να τακεί προτού να καταστεί δυνατόν η ροή ενέργειας να καταγραφεί από το DSC. Για την ελαχιστοποίηση των φαινομένων αυτών, συνήθως προστίθεται, στις περιοχές που μετρώνται, μία σταθερά

διόρθωσης για τη διόρθωση των διαγραμμάτων Van't Hoff (υπάρχει και η εναλλακτική μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται σταδιακές ισόθερμες καμπύλες τήξεως). Το τμήμα της καμπύλης τήξης που χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς μπορεί να έχει επίδραση στη λαμβανόμενη τιμή καθαρότητας. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα λαθών, που προέρχονται από φαινόμενα θερμικής υστέρησης, τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά την έναρξη της τήξεως, γίνεται χρήση διαφορετικών κλασμάτων, 3-30%, 3-40%, 3-50% (συνιστάται στον υπολογισμό της καθαρότητας). Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για το εάν λαμβάνει χώρα αργή αποσύνθεση και διάσπαση. Γενικά, η μέτρηση της καθαρότητας γίνεται για διάφορα κλάσματα στην περιοχή 10-50%.

Για τον καθορισμό της καθαρότητας είναι αναγκαίο να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις, όπως χαμηλές ταχύτητες σάρωσης (<5 °C/min, κατά προτίμηση 2 °C/min) που μειώνουν τα φαινόμενα θερμικής υστέρησης, καθώς και μικρά δείγματα (1-3 mg). Για να αποτραπούν οι μεταβάσεις στερεάς-στερεάς κατάστασης, όπως οι πολυμορφικές μεταβολές, συνιστάται η δοκιμή αρκετών ταχυτήτων σάρωσης. Εάν οι τιμές της καθαρότητας βρίσκονται μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος, τότε δεν λαμβάνει χώρα αποσύνθεση του υλικού ή μετατροπή του σε άλλες πολυμορφικές καταστάσεις κατά την τήξη. Γενικά, αξιόπιστα αποτελέσματα προκύπτουν σε δείγματα με ποσοστό καθαρότητας 98-99.5%.

Εκτός από την ταχύτητα, με την οποία πραγματοποιείται η μέτρηση, δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος και το είδος της πρόσμιξης δεν χρειάζεται να είναι γνωστό, στοιχεία που ενισχύουν την πλεονεκτική θέση της μεθόδου αυτής για τέτοιους προσδιορισμούς. Ο καθορισμός της καθαρότητας μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της ποιότητας φαρμακευτικών παρτίδων, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό άμορφου περιεχομένου και αποσύνθεσης οργανικών ουσιών (Demetzos, 2008; Dooren et al., 1984; Marti, 1972).

A.1.4.7.1.1.2 Ποσοτικοποίηση της κρυσταλλικότητας

Η κατανόηση της κρυσταλλικής και της άμορφης φύσης των δραστικών ουσιών και των εκδόχων είναι πολύ σημαντική στην ανάπτυξη των φαρμακοτεχνικών μορφών. Στην περίπτωση των κρυσταλλικών ενώσεων, ένα ποσοστό μπορεί να μετατραπεί σε άμορφο κατά τη διαδικασία της μορφοποίησης (π.χ. κατά την υγρή κοκκοποίηση και

το κοσκίνισμα). Αυτό μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στο τελικό σκεύασμα, κυρίως σε σχέση με τη φυσική και χημική σταθερότητά του. Με τη μέθοδο DSC, η κρυστάλλωση εκφράζεται ως μια εξώθερμη μετάβαση και τα δείγματα που κρυσταλλώνουν, κατά τη θέρμανση, περιέχουν απαραίτητα κάποιο άμορφο ποσοστό. Εντούτοις, υπάρχουν άμορφα συστατικά τα οποία δεν κρυσταλλώνουν. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την κρυστάλλωση σχετίζεται με την ενέργεια σχηματισμού του κρυσταλλικού πλέγματος του μορίου. Με τον τρόπο αυτό το DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της κρυσταλλικότητας λυοφιλοποιημένων ή κοσκινισμένων ουσιών.

A.1.4.7.1.1.3 Πολυμορφισμός

Πολυμορφισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ενώσεις με την ίδια μοριακή δομή κρυσταλλώνουν σε διαφορετικές μοριακές διευθετήσεις στο χώρο. Κατά συνέπεια, τα πολύμορφα έχουν πολύ διαφορετικά σημεία τήξης, διαφορετική πυκνότητα, διαλυτότητα, φυσική, χημική σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα. Η επιλογή πολυμόρφου γνωστής σταθερότητας είναι αποφασιστικής σημασίας για την ανάπτυξη σταθερών σκευασμάτων.

Τα πολύμορφα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: εναντιοτροπικά και μονοτροπικά. Τα πρώτα δημιουργούν ένα μόνο σταθερό κρύσταλλο υπό όλες τις πιέσεις και τις θερμοκρασίες. Η σταθερή μορφή έχει υψηλότερο σημείο τήξης και ενθαλπία συγκριτικά με τη λιγότερο σταθερή κρυσταλλική μορφή. Εάν η μορφή με το υψηλότερο σημείο τήξεως παρουσιάζει μικρότερη ενθαλπία, τότε το πολύμορφο χαρακτηρίζεται ως εναντιοτροπικό.

A.1.4.7.1.1.4 Διάσπαση, αποσύνθεση και καθορισμός σταθερότητας

Η μέθοδος DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία γρήγορη μέθοδος ελέγχου σταθερότητας, σε συνδυασμό με χρωματογραφικές τεχνικές. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζει είναι η ταχύτητα των μετρήσεων και η μικρή ποσότητα ουσίας που απαιτείται.

Η κινητική της διάσπασης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Arrhenius, καθώς και πειράματα DSC. Στα ισόθερμα πειράματα διάσπασης, η θερμοκρασία του p_{an} διατηρείται σταθερή σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διάφορα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια το δείγμα σαρώνεται με ταχύτητα αρκετά υψηλή ώστε να αποφευχθεί πιθανή πρόσθετη διάσπαση.

A.1.4.7.1.1.5 Υαλώδης μετάπτωση

Πολλά βιοδραστικά μόρια μπορούν να καταστούν άμορφα εξαιτίας διαφόρων παραγόντων, όπως η λυοφιλοποίηση και η απότομη ψύξη πάνω από το σημείο τήξης. Τα άμορφα υλικά χαρακτηρίζονται από τη θερμοκρασία της υαλώδους μετάπτωσης. Η θερμοκρασία αυτή είναι σημαντική για τον καθορισμό της τάσης των άμορφων ουσιών να κρυσταλλώνουν σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Εάν το υλικό αποθηκευτεί κάτω από τη θερμοκρασία της υαλώδους μετάπτωσης, ο ρυθμός με τον οποίο μπορεί να ανακρυσταλλωθεί είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με ένα υλικό που βρίσκεται πάνω από τη θερμοκρασία της υαλώδους μετάπτωσης. Ο καθορισμός της θερμοκρασίας αυτής (στο DSC θερμόγραμμα η υαλώδης μετάπτωση χαρακτηρίζεται από μια αλλαγή στη θερμοχωρητικότητα, που εμφανίζεται ως μια μεταβολή της γραμμής βάσης) είναι επίσης σημαντικός στην ανάπτυξη λυοφιλοποιημένων σκευασμάτων και στον καθορισμό της σχετικής φυσικής, χημικής και οπτικής σταθερότητας σκευασμάτων, που περιέχουν άμορφα δραστικά συστατικά (ώστε να δοθεί η δέουσα προσοχή κατά τη φύλαξή τους).

A.1.4.7.1.1.6 Μετρήσεις θερμοχωρητικότητας

Η μέθοδος DSC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ακριβείς μετρήσεις θερμοχωρητικότητας υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Τυπικά, αυτές περιλαμβάνουν χαμηλές ταχύτητες σάρωσης (0.5-2 °C/min) και τη χρήση ενός προτύπου μέτρησης, όπως ο συνθετικός σάπφειρος.

A.1.4.7.1.2 Χαρακτηρισμός πολύπλοκων μιγμάτων

Η DSC αποτελεί μια πολύ χρήσιμη μέθοδο, που μπορεί να εφαρμοστεί στα πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου, προκειμένου να γίνει έλεγχος της συμβατότητας εκδόχων-δραστικής ουσίας. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται σε περιπτώσεις διαλυτοποίησης της δραστικής ουσίας σε τηγμένα έκδοχα, καθώς διαφοροποιούνται οι ενθαλπίες τήξεως (Chauda et al., 2014), να προσδιοριστεί η αναμιξιμότητα των συστατικών ενός άμορφου μίγματος (εάν δεν υπάρχουν πολύ ειδικές συνδέσεις, τότε θα παρατηρηθεί μία υαλώδης μετάπτωση μεταξύ αυτών των δύο συστατικών στο θερμόγραμμα), αλλά και να προσδιοριστεί και το νερό που περιέχουν στο κρυσταλλικό τους πλέγμα, π.χ. τα έκδοχα (όταν διαφοροποιείται η πηγή προμήθειάς τους) (Clas et al., 1999).

A.1.4.7.2 Εφαρμογές στη μελέτη βιομορίων (πρωτεϊνών)

Η μέθοδος DSC είναι κατάλληλη και για την απευθείας μέτρηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων που χαρακτηρίζουν τα βιομόρια. Όταν ένα μακρομόριο μεταβάλλει τη θερμοδυναμική του κατάσταση (όπως κατά την αποπεριέλιξη μιας πρωτεΐνης ή της διπλής πακεταρισμένης έλικας του DNA), η θερμοχωρητικότητά του μεταβάλλεται, εξαιτίας της αναδιαμόρφωσης των μορίων του διαλύτη περίξ των μη πολικών πλευρικών αλυσίδων, που εκτίθενται στο διαλύτη κατά τη διαδικασία της αποπεριέλιξης. Μέσω του θερμογράμματος μπορεί να υπολογιστεί απευθείας, με ολοκλήρωση, η τιμή της ενθαλπίας μετάβασης ΔH°_m (αποτελεί άθροισμα ενδόθερμων συνεισφορών, όπως είναι η διάσπαση δεσμών υδρογόνου, και εξώθερμων, όπως είναι η σχάση υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων) και απευθείας να συσχετιστεί με το περιεχόμενο της οργανωμένης δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Μετά τη Van't Hoff διόρθωση, προκύπτει η Van't Hoff ενθαλπία ΔH^{vH} , που πιθανώς να διαφέρει από την ΔH°_m . Η σύγκριση αυτών των δύο ενθαλπιών οδηγεί στη διαπίστωση εάν η μετάβαση λαμβάνει χώρα συμβαίνει σε δύο στάδια (όταν οι ενέργειες ταυτίζονται) ή εάν πραγματοποιείται με ακόμη πιο πολλά στάδια (όταν πρόκειται για διμερές ή πολυμερές και ισχύει $\Delta H^{vH} > \Delta H^{\circ}_m$). Επιπρόσθετα, είναι δυνατό να προσδιοριστεί έμμεσα η σταθερά σύνδεσης K_B (έως $10^{20} M^{-1}$, τόσο ισχυρή σύνδεση που καθίσταται αδύνατο να προσδιοριστεί με άλλες τεχνικές) και έτσι να χαρακτηριστεί η σύνδεση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-βιοδραστικού μορίου, πρωτεΐνης-συμπλέγματος πρωτεΐνης/λιπιδίου, βιοδραστικού μορίου/πρωτεΐνης-DNA, με απώτερο τελικό στόχο την πλήρη κατανόηση της λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων και τη διευκόλυνση στο σχεδιασμό νέων φαρμακοτεχνικών μορφών (Bruylants et al., 2005).

A.1.4.7.3 Εφαρμογή ως συμπληρωματικού διαγνωστικού εργαλείου για τον έλεγχο βιολογικών δειγμάτων

Η DSC είναι η μοναδική τεχνική η οποία μπορεί απευθείας να μετρήσει δια- και ενδο- μοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες σταθεροποιούν τα βιολογικά συστήματα. Πρόσφατα προσανατολίστηκε σε μια νέα κατεύθυνση, που αφορά στην ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων, όπως το πλάσμα αίματος, αλλά και άλλα βιολογικά υγρά, με σκοπό τη μελέτη των διαφορών στις θερμοδυναμικές ιδιότητες του πρωτεώματος, που προκύπτουν από τις διαφοροποιήσεις της κατάστασης υγείας του ασθενούς. Αν αυξηθούν οι μελέτες, που εφαρμόζουν την τεχνική DSC, για το χαρακτηρισμό βιολογικών δειγμάτων διαφόρων ασθενειών (ώστε να γίνει μία

διασύνδεση των διαφορών στα θερμογράμματα με τις κλινικές ομάδες), τότε πιθανώς θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η DSC στο χαρακτηρισμό κλινικών δειγμάτων. Ωστόσο, για να έχει διαγνωστική αξία και κλινική εφαρμογή αυτή η κατηγοριοποίηση (που μελλοντικά δύναται να γίνει) είναι απαραίτητο τα διαγνωστικά αποτελέσματα να αποδίδονται με τρόπο ευκόλως ερμηνεύσιμο. Θα πρέπει, δηλαδή, τα θερμογράμματα να απλοποιούνται και ανάλογα με τη μελετούμενη ασθένεια, να επικεντρωνόμαστε στο τμήμα εκείνο που αποτελεί “υπογραφή” της ασθένειας. Κάτι τέτοιο θα ήταν πιο εύκολο να συμβεί, εάν είναι γνωστό το βιολογικό φαινόμενο που προκαλεί τις διαφοροποιήσεις στο θερμογράμμα (θα βελτιωνόταν και η πλήρης κατανόηση της αιτιολογίας της εκάστοτε ασθένειας) (Garbett et al., 2016).

A.1.4.7.4 Εφαρμογή στην ανίχνευση παράνομων παρτίδων δισκίων

Ο αριθμός των παράνομων ή μη αδειοδοτημένων φαρμάκων, που κυκλοφορούν στην αγορά, ολοένα και αυξάνεται. Η αστυνομία και οι ρυθμιστικές αρχές με οπτική παρατήρηση ή χρωματογραφικούς προσδιορισμούς κατορθώνουν να εντοπίσουν τις παράνομες παρτίδες. Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες είναι χρονοβόρες και παρακωλύουν τα ιατροδικαστικά εργαστήρια, αφού αναγκαστικά λαμβάνουν χώρα σε αυτά. Τελευταία, έχει προταθεί η χρήση της DSC για τη διερεύνηση του θερμικού προφίλ αγνώστων δισκίων (και έχει ήδη εφαρμοστεί από την αστυνομία της Σκωτίας). Συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα κονιοποιημένου δείγματος (<10μg) αναλύεται και με ταχύ και αποτελεσματικό τρόπο συλλέγονται τα θερμογράμματα, που αποκαλύπτουν ακόμη και ανεπαίσθητες διαφορές μεταξύ των παρτίδων των δισκίων (ακόμη και η διαφοροποίηση του προμηθευτή πρώτης ύλης-εκδόχου, μπορεί να αποδοθεί στο θερμογράμμα, αφού το ίδιο χημικά έκδοχο θα δώσει διαφορετικό θερμικό αποτύπωμα) (Bibi et al., 2015).

A.1.4.7.5 Εφαρμογή στη μελέτη λιπιδικών διπλοστοιβάδων

Η μέθοδος DSC θεωρείται ένα ευαίσθητο εργαλείο για τη διερεύνηση θερμοδυναμικών μεταβάσεων φάσης των λιπιδίων, κυρίως μετά την εισαγωγή ή ενσωμάτωση βιοδραστικών μορίων σε αυτά τα συστήματα. Ερευνώνται, δηλαδή, οι θερμοδυναμικές επιδράσεις στα δομικά, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και αιτιολογείται η επιλογή της σύστασης των λιποσωμάτων (Matsingou et al., 2007).

A.1.5 Εξελίξεις στη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης

Είναι αδιαμφισβήτητο γεγονός πως η DSC αποτελεί μέθοδο επιλογής σε πολλά πεδία. Ωστόσο, επειδή το εύρος των θερμοκρασιών αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο, καθώς θέτει περιορισμούς σε περιπτώσεις θερμικών φαινομένων που υπερκαλύπτονται, η επιστημονική κοινότητα προχώρησε στην εξέλιξη της μεθόδου DSC το 1994, με σκοπό τη δημιουργία μίας τεχνικής που θα ανιχνεύει την T_g φαρμακευτικών συστημάτων, όταν τα θερμικά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται Διαμορφωμένη DSC (Modulated Temperature DSC, MDSC) και είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις που αφορούν συνθήκες φύλαξης λυοπροστατευμένων freeze-dried λιποσωμιακών συστημάτων, βοηθώντας στην αρτιότερη κατανόηση της σταθερότητάς τους (και τον προσδιορισμό της T_g) (Demetzos, 2008), σε περιπτώσεις που αφορούν το σχεδιασμό στερεών διασπορών ως φαρμακοτεχνικών μορφών (προσδιορίζει τη στερεά διαλυτότητα των συστατικών στα πολυμερή), σε περιπτώσεις που απαιτείται ποσοτικοποίηση άμορφου περιεχομένου, σε διερεύνηση πολυμορφικών και ενυδατωμένων μορφών, αλλά και στη διερεύνηση της συμπεριφοράς μακρομορίων, όπως οι πρωτεϊνικές φαρμακοτεχνικές μορφές. Κατά την MDSC είναι σαν να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα δύο πειράματα (το πρώτο πείραμα περιλαμβάνει τη θέρμανση του δείγματος με ένα σταθερό ευθύγραμμο ρυθμό, με σκοπό την επίτευξη της ολικής ροής θερμότητας, όπως γίνεται στην κλασική DSC, ενώ στο δεύτερο πείραμα εφαρμόζεται ελεγχόμενη ταλάντωση θερμοκρασιακής ρύθμισης με μηδενική αλλαγή θερμοκρασίας κατά την περίοδο της διαμόρφωσης). Με άλλα λόγια, η διαμόρφωση της θερμοκρασίας υπερτίθεται πάνω σε ένα σταθερό ρυθμό θέρμανσης, επιτρέποντας την ανταπόκριση σε πολλαπλούς ρυθμούς θέρμανσης και την ταυτόχρονη καταγραφή της μέτρησης. Ως εκ τούτου, αυξάνεται η ευαισθησία κατά την ανάλυση, και έτσι δίδεται η δυνατότητα ανίχνευσης ασθενών μεταβάσεων, αλλά και διαχωρισμού θερμικών φαινομένων που υπερκαλύπτονται (Knopp et al., 2016).

Εναλλακτικά, μία άλλη τεχνική που παρέχει πληροφόρηση για τη θερμοχωρητικότητα, αλλά και το κινητικό περιεχόμενο (όπως και στην περίπτωση της MDSC, αλλά με διαφορετικό τρόπο), είναι η Δυναμική DSC (Dynamic DSC, DDSC). Σε αυτή την περίπτωση, το πρόγραμμα θερμοκρασίας αποτελείται από ένα “Iso-Scan”, κατά το οποίο συνδυάζονται παραδοσιακά προγράμματα ρυθμού θέρμανσης (με αρκετά ισόθερμα τμήματα) ή από ένα “Heat-Cool” πρόγραμμα, που

συνδυάζει προγράμματα θέρμανσης και ψύξης. Ανάλογα με τον τύπο του πειράματος, ο ερευνητής επιλέγει τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί. Με την τεχνική DDSC υπολογίζεται η σύνθετη θερμοχωρητικότητα C_p^* , οποία αποτελεί ένα διανυσματικό άθροισμα της θερμοχωρητικότητας φύλαξης (C_p' , η οποία σχετίζεται με τις μοριακές κινήσεις εντός του δείγματος) και της απώλειας θερμοχωρητικότητας (C_p'' , η οποία σχετίζεται με τις ποσοτικομηχανικές ιδιότητες του υλικού) (Clas et al., 1999).

Τα τελευταία χρόνια, η απαίτηση για άμορφες στερεές διασπορές δυσδιάλυτων φαρμακομορίων για την από του στόματος χορήγηση, οδήγησε στην ανάπτυξη δύο τεχνικών που επιτρέπουν την ελεγχόμενη θέρμανση/ψύξη με ρυθμούς εκατοντάδων βαθμών ανά λεπτό. Πιο συγκεκριμένα, η Υψηλής Απόδοσης DSC (High Performance DSC, HPer DSC ή HDSC) περιλαμβάνει σύντομες χρονικά πειραματικές διαδικασίες, σε πολύ μικρές μάζες δείγματος (sub-milligram), με υψηλούς ρυθμούς σάρωσης (400 °C/min), αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης υαλωδών μεταπτώσεων, κάτι που την καθιστά ιδανική για πρώιμες μελέτες προμορφοποίησης, με υψηλής απόδοσης screening νέων χημικών ουσιών, και με μικρές ποσότητες απαιτούμενου υλικού. Υπάρχει, βέβαια, και η RHC-Rapid Heat/Cool, που φτάνει τους ρυθμούς σάρωσης της τάξεως των 2000 °C/min, κάτι που επιλέγεται όταν επιθυμείται η αποφυγή κρυσταλλώσεως, π.χ. στην περίπτωση της άμορφης λακτόζης (Baird et al., 2012).

A.1.6 Προκλήσεις και Προοπτικές

Η χρήση τεχνικών θερμικής ανάλυσης ολοένα και αυξάνεται στο επιστημονικό πεδίο των «Βιοεμπνευσμένων» συστημάτων μεταφοράς βιοδραστικών μορίων, που αποτελούν το στοιχείο “κλειδί” στο νέο ρεύμα του «Κύκλου Καινοτομίας». Αυτά τα βιοεμπνευσμένα συστήματα (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα λιποσώματα) οφείλουν να αξιολογηθούν εκτός από τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, και ως προς τις θερμοδυναμικές και βιοφυσικές τους ιδιότητες, και να ακολουθούν την πορεία ασφάλειας και αποτελεσματικότητας, προασπιζόμενα την αξία της Υγείας. Προτάσσεται, λοιπόν, η ενσωμάτωση της DSC ως μία μεθόδου που θα πραγματοποιείται στα στάδια προμορφοποίησης (αλλά και ως μέθοδος ελέγχου διασφάλισης της ποιότητας, όταν το προϊόν θα βρίσκεται στην αγορά), ακολουθώντας τις Αρχές Καλών Εργαστηριακών Πρακτικών (Good Laboratory Practices, GLPs), με σκοπό τον προσδιορισμό της καθαρότητας, του πολυμορφισμού και των θερμοκρασιών μετάβασης των συστατικών του δείγματος, όπως περιγράφεται από την Αμερικανική Φαρμακοποιία (Demetzos, 2008).

Πρόσφατα (2014), υπεβλήθη στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicine Agency, EMA) και συγκεκριμένα στην επιτροπή Καινοτόμων Θεραπευτικών προϊόντων (Committee for Advanced Therapies, CAT) μια παρατήρηση επί της οδηγίας “Guideline on process validation for manufacture of biotechnology-derived active substances and data to be provided in the regulatory submission” (EMA/CHMP/BWP/187338/2014)”, το οποίο αφορά στην προώθηση του ελέγχου των βιοφυσικών και θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών, με σκοπό την ολοκληρωμένη αξιολόγηση νέων βιοτεχνολογικών και καινοτόμων προϊόντων. Πιθανώς, λοιπόν, η θερμική ανάλυση να κατορθώσει να γεφυρώσει, ως μία μέθοδος προσδιορισμού θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών, το κενό μεταξύ των μέχρι τώρα «παραδοσιακών» τεχνικών παρασκευής και των νεώτερων, συμβαδίζοντας πάντα με τα προαπαιτούμενα των ρυθμιστικών αρχών (Demetzos, 2015; Δεμέτζος, 2014).

A.2. Συνεργασιμότητα υλικών – Αλληλεπιδράσεις

A.2.1 Γενικά

Κατά την έρευνα και ανάπτυξη νέων φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα αποτελούν τις δύο βασικές απαιτήσεις των ερευνητών, καθότι επιδιώκεται ο κατάλληλος σχεδιασμός για επαρκή και επαναλήψιμη βιοδιαθεσιμότητα, αλλά και φυσικοχημική σταθερότητα, κατά τον χρόνο ζωής του σκευάσματος. Η αστάθεια του φαρμακοτεχνικού σκευάσματος αποτελεί ένα πεδίο συνεχούς έρευνας, γιατί υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία μοριακών δομών (σε πολυάριθμες δοσολογικές μορφές), όπου στην πλειονότητά τους, η κατανόηση των αιτιών αστάθειας, είναι περίπλοκη. Είναι αλήθεια, πως ιδίως στις στερεές φαρμακοτεχνικές μορφές (όπου υπάρχει μεγαλύτερη ετερογένεια και περισσότερες αλλαγές της φυσικής κατάστασης των συστατικών, συναρτήσει του χρόνου), οι διαδικασίες της αποσύνθεσης είναι πολυάριθμες, με ακόμη πιο πολλά περιοριστικά βήματα σε επίπεδο κινητικών.

A.2.2 Επίδραση της υγρασίας

Το περιεχόμενο νερό σε βιοδραστικά μόρια και έκδοχα είναι δύο μορφών: συνδεδεμένο (bound water) και μη συνδεδεμένο (unbound water). Το συνδεδεμένο αφορά μόρια νερού στενά ενσωματωμένα στη φυσική μορφή του υλικού (μέρος της ενυδάτωσης ή της κρυσταλλικότητάς του), σχεδόν ακίνητα και μη διαθέσιμα για αντιδράσεις, ενώ το μη συνδεδεμένο αφορά μόρια νερού, τα οποία απορροφώνται ή

προσροφώνται από την ατμόσφαιρα. Το μη συνδεδεμένο νερό παρουσιάζει υψηλή κινητικότητα και είναι εκείνο που αποτελεί ισοδύναμη ένδειξη της σχετικής υγρασίας του περιβάλλοντος, που βρίσκεται σε ισορροπία με το μίγμα στερεών εκδόχων ή βιοδραστικού μορίου-εκδόχων.

A.2.2.1 Επίδραση του νερού στη φυσική αστάθεια

Η παρουσία της υγρασίας κατά την παρασκευή ή την αποθήκευση των φαρμακοτεχνικών μορφών μπορεί να επιδράσει αρνητικά στη διάλυση, αλλά και την αποσύνθεση. Αυτό καθιστά απαραίτητο τον κατάλληλο σχεδιασμό της συσκευασίας του προϊόντος και ειδικότερα, είτε σε Alu-Alu blister packs, είτε με ξηραντικά στους περιέκτες. Στην περίπτωση που αυτές οι ρυθμιστικές ενέργειες δεν επιφέρουν σταθερότητα στο προϊόν, ίσως απαιτείται διαφορετική παρασκευή της φαρμακοτεχνικής μορφής (reformulation).

A.2.2.2 Επίδραση του νερού στη χημική αστάθεια

Η παρουσία της υγρασίας κατά την παρασκευή ή την αποθήκευση των φαρμακοτεχνικών μορφών μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση του βιοδραστικού μορίου, μπορεί να αυξήσει την πλαστικότητα, να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για αντίδραση, ή να οδηγήσει σε νέα πολυμορφική μορφή και συνεπώς τελικά σε διαφορετική δραστηριότητα της φαρμακοτεχνικής μορφής.

A.2.3 Φυσική αστάθεια

Με τον όρο φυσική αστάθεια χαρακτηρίζονται οι αλλαγές των χαρακτηριστικών της φαρμακοτεχνικής μορφής, που όμως δεν αφορούν στο σχηματισμό ή τη σχάση χημικού δεσμού (θα αναλυθούν εκτενέστερα στο A.2.3.3).

A.2.3.1 Αλλαγές οργανοληπτικών ιδιοτήτων

Οι αλλαγές οργανοληπτικών ιδιοτήτων αφορούν τροποποιήσεις της εμφάνισης, της οσμής και της γεύσης της φαρμακοτεχνικής μορφής. Εντοπίζονται κυρίως όταν υπάρχουν αμινομάδες και σουλφομάδες, ενώ για την αποτροπή τους είτε γίνεται αντικατάσταση των “δραστικών” εκδόχων που εμπλέκονται, είτε χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικά μέσα.

A.2.3.2 Μεταβολές της διάλυσης και/ή της αποδέσμευσης δραστικής ουσίας

Οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – εκδόχου ή εκδόχου – εκδόχου δύνανται να προκαλέσουν μεταβολές στη μορφή της δραστικής ουσίας

(πολυμορφισμός ή ενυδατωμένη μορφή ή άλας), αλλά και στην πυκνότητα/πορώδες της στερεάς φαρμακοτεχνικής μορφής. Ως εκ τούτου πιθανόν να επηρεάζονται η διάλυση, η αποδέσμευση και η βιοδιαθεσιμότητα της δραστικής ουσίας.

A.2.3.3 Αλλαγές μορφής της δραστικής ουσίας

Κατά την παρασκευή ή κατά την αποθήκευση των φαρμακοτεχνικών μορφών, εκτός από τις πιθανές επιθυμητές αλληλεπιδράσεις της δραστικής ουσίας με τα έκδοχα, που συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου επιδιώκεται η σταθεροποίηση ενός συγκεκριμένου πολύμορφου (πχ. χρήση PVP για την αποτροπή της μετάπτωσης θεοφυλλίνης), δημιουργούνται και μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις. Η πιθανή δημιουργία ή η αύξηση αναλογίας άλατος ασθενούς βάσης της δραστικής ουσίας μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στη διαλυτότητα, στο ρυθμό διάλυσης και τελικώς τη βιοδιαθεσιμότητα,

A.2.4 Χημική αστάθεια

Η θερμοκρασία, το pH, η περιεχόμενη υγρασία των υλικών, η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος, το φως, το οξυγόνο, η παρουσία καταλύτη, το μέγεθος και η φύση των σωματιδίων είναι οι παράγοντες που εντείνουν την πιθανότητα εμφάνισης χημικής αστάθειας. Με τον όρο χημική αστάθεια χαρακτηρίζονται οι μετατροπές της χημικής δομής της δραστικής ουσίας στη φαρμακοτεχνική μορφή, που μειώνουν τη δραστηριότητα της δραστικής ουσίας (και έτσι την αποτελεσματικότητα) ή που εγκυμονούν κινδύνους ασφάλειας και τοξικότητας (λόγω του σχηματισμού νέων μορίων).

A.2.4.1 Αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – εκδόχων

A.2.4.1.1 Χημικές αλληλεπιδράσεις

Με τον όρο χημικές αλληλεπιδράσεις περιγράφεται η απευθείας αντίδραση δραστικής ουσίας – εκδόχου, είτε σε κατάλυση από το έκδοχο της αποσύνθεσης της δραστικής ουσίας είτε σε τροποποίηση του pH από το έκδοχο.

A.2.4.1.1.1 Απευθείας αντίδραση δραστικής ουσίας – εκδόχων

Είναι πιθανόν κάποιες φορές να αντιδράσει μια λειτουργική ομάδα, που φέρει η δραστική ουσία με μια λειτουργική ομάδα ενός από τα έκδοχα. Πιθανές τέτοιες αντιδράσεις δημιουργούν δεσμούς μεταξύ των δύο μορίων, όπως η πυρηνόφιλη προσβολή αμινομάδας δραστικής ουσίας (αμινοξέα) σε καρβονυλομάδα ενός

σακχάρου (αντίδραση Maillard: μεταξύ αμινών με το έκδοχο λακτόζη, μεταξύ πρωτεϊνών με σάκχαρα), η δημιουργία εστέρων (αντίδραση καρβοξυλικών ομάδων με υδροξυλομάδες), κλπ.

A.2.4.1.1.2 Κατάλυση αποσύνθεσης δραστικής ουσίας από έκδοχο

Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου το έκδοχο δεν σχηματίζει δεσμό με τη δραστική ουσία, αλλά επιδρά καταλυτικά στο ρυθμό αποσύνθεσής του. Αυτή η κατάλυση αποτελεί συνάρτηση των αντιδράσεων διάχυσης, των ατελειών του κρυσταλλικού πλέγματος της δραστικής ουσίας, αλλά και της μοριακής κινητικότητας του προσροφημένου νερού.

A.2.4.1.1.3 Επίδραση εκδόχων στο pH του μικροπεριβάλλοντος

Τα έκδοχα επιδρούν στο pH του μικροπεριβάλλοντος στις περιπτώσεις που φέρουν λειτουργικές ομάδες, οι οποίες ιονίζονται και εν συνεχεία τροποποιούν το pH. Η τροποποίηση του pH δεν είναι απαραίτητα μη επιθυμητή, αρκεί, ο ρυθμός αποσύνθεσης της δραστικής ουσίας να είναι ασφαλής (π.χ. χρήση οργανικών μορίων σε δισκία άμεσης ή ελεγχόμενης αποδέσμευσης ασθενών βάσεων, με στόχο τη βελτίωση του ρυθμού διάλυσής τους).

A.2.4.1.2 Φυσικές αλληλεπιδράσεις

Οι φυσικές αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – εκδόχου δύνανται να οδηγήσουν σε χημική αστάθεια με μη χημικό μηχανισμό. Συγκεκριμένα, περιοχές της δραστικής ουσίας με αποδιοργανωμένα κρυσταλλικά χαρακτηριστικά είναι πιθανόν να συγκεντρώνουν μεγαλύτερο ποσοστό μορίων νερού, κάτι που συνεπάγεται αυξημένο ρυθμό αποσύνθεσης του μορίου. Παράλληλα, αυτές οι αποδιοργανωμένες περιοχές παρουσιάζουν αυξημένη μοριακή κινητικότητα, που συγκριτικά με επίπεδα κρυσταλλικά σημεία, παρουσιάζει αυξημένη ταχύτητα αποσύνθεσης. Τέλος, εάν η ασκούμενη μηχανική ενέργεια, κατά τη διαδικασία παρασκευής της φαρμακοτεχνικής μορφής, υπερβεί κάποια όρια, μπορεί να οδηγήσει σε ένα αποδιοργανωμένης κρυσταλλικότητας κλάσμα δραστικής ουσίας, διεσπαρμένο στα άμορφα έκδοχα.

A.2.4.2 Αλληλεπιδράσεις δραστικής ουσίας – impurities εκδόχων

A.2.4.2.1 Υπεροξειδία

Τα πολύ δραστικά υπεροξειδία υπάρχουν ως impurities σε μορφή αλκυλ-υπεροξειδίων (ROOR') ή υδρο-υπεροξειδίων (ROOH), που είναι πολύ ασταθή και

διασπώνται προς αλκοξυ-ρίζες, και ρίζες υδροξυλίου, αντίστοιχα. Η παρουσία οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε ομολυτική σχάση του δεσμού άνθρακα – υδρογόνου, όταν δίπλα υπάρχει ετεροάτομο. Η σχηματιζόμενη υπεροξυ-ρίζα με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο αντιδρόν, σχηματίζοντας ένα νέο δραστικό είδος οξυγόνου, συμμετέχοντας έτσι σε έναν κύκλο αυτοκατάλυσης, που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Είναι επιτακτικό πλέον, σύμφωνα με τις συστάσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, τα επίπεδα των υπεροξειδίων να ελέγχονται συχνά στα έκδοχα κατά την αποθήκευσή τους. Προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα υπεροξειδίων, γίνεται κατεργασία των εκδόχων με πυριτικά άλατα, συνδυαστικά με ενσωμάτωση υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών, είτε χρησιμοποιούνται πρόσθετα (όπως, ένζυμα, μέταλλα), είτε τροποποιούνται χημικά (π.χ. με αντιδραστήρια δημιουργίας σταυροειδών δεσμών), κλπ.

A.2.4.2.2 Αλδεΐδες και οξέα

Σε πολλά έκδοχα συνυπάρχουν φορμαλδεΐδη και/ή μυρμηγκικό οξύ, ως ίχνη impurities. Αυτές οι ουσίες αντιδρούν με αμινομάδες και υδροξυλομάδες, αντίστοιχα και σχηματίζουν υδροξυμεθυλαμίνες και εστέρες. Προληπτικά μέτρα για τη μείωση της επίδρασης αυτών των περιεχομένων impurities είναι η χρήση αντιοξειδωτικών (όπως το Butylated Hydroxy Toluene, BHT), ο τακτικός έλεγχος ποσοστού περιεχόμενης φορμαλδεΐδης και η τροποποίηση των μέσων συσκευασίας, ώστε να ελαχιστοποιείται η διέλευση οξυγόνου.

A.2.4.2.3 Μέταλλα

Η δράση των μετάλλων, που εντοπίζονται ως impurities, μπορεί να εμποδιστεί με τη χρήση αντιοξειδωτικών.

A.2.5 Περιορισμοί και προοπτικές εξέλιξης μελετών συμβατότητας

Οι μελέτες συμβατότητας αποτελούν βασικές screening μελέτες κατά την προμορφοποίηση των φαρμακοτεχνικών μορφών. Η αρχική αξιολόγηση της συμβατότητας των μιγμάτων της δραστικής ουσίας με ένα ή πιο πολλά έκδοχα, πραγματοποιείται με τη φυσική παρατήρηση χρώματος, οσμής, ρεολογικών ιδιοτήτων και φυσικής κατάστασης. Με χρωματογραφικές τεχνικές, ως μελέτες συμβατότητας προσδιορίζονται οι χημικές αλλαγές, ενώ με θερμικές τεχνικές προσδιορίζονται και αξιολογούνται, ταχέως, πιθανές ασυμβασίες των υλικών. Ωστόσο, ο χρόνος και οι χρηματικές πηγές περιορίζουν την έκταση και το βάθος των ελέγχων συμβατότητας.

Αυτός είναι και ο λόγος που τις περισσότερες φορές, με τη βοήθεια στατιστικών “εργαλείων” σχεδιασμού πειραμάτων (π.χ. Prackett – Burman) μειώνεται ο αριθμός των απαραίτητων πειραμάτων. Είναι δυνατόν, δηλαδή, να εξεταστούν n έκδοχα σε $(n+1)$ πειράματα. Εντούτοις, όταν χρησιμοποιούνται αυτά τα στατιστικά μοντέλα, δεν λαμβάνονται υπόψιν οι μεταβολές στη συγκέντρωση των συστατικών του μίγματος (κάτι που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη) (Crowley and Martini, 2001; Narang et al., 2012).

Είναι επιτακτικό, λοιπόν, να συγκεκριμενοποιηθούν επακριβώς τα φαινόμενα που επηρεάζουν τη σταθερότητα της φαρμακοτεχνικής μορφής και να εξελιχθεί η περιοχή των ελέγχων προμορφοποίησης, πάντα με άξονα το Quality by Design.

A.3. Έκδοχα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη

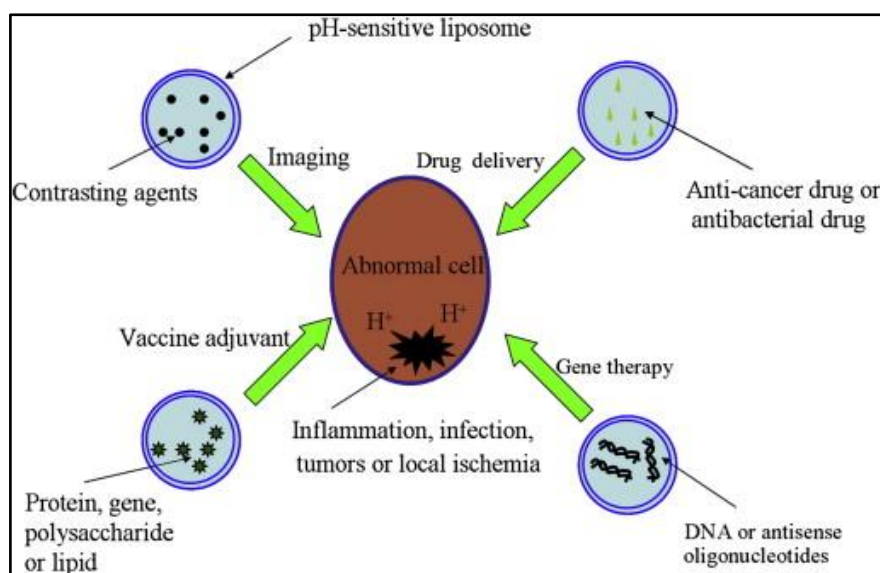
A.3.1 Καινοτόμα έκδοχα

Τα λιποσώματα θεωρούνται ως τα πιο εκτενώς διερευνούμενα συστήματα μεταφοράς κατάλληλης ποσότητας δραστικών ουσιών (Drug Delivery nanoSystems, DDnSs), για θεραπεία (ή διάγνωση), στο κατάλληλο σημείο. Η στόχευσή τους στο εκάστοτε σημείο καθιστά υψηλή τη θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα, χαμηλή την ανοσογονικότητα και μειωμένη την πιθανότητα εμφάνισης τοξικών παρενεργειών. Ωστόσο, τα συμβατικά λιποσώματα (αποτελούνται μόνο από φωσφολιπίδια), που χορηγούνται ως μέσα παθητικής στόχευσης (Passive Targeting), αναγνωρίζονται γρήγορα και προσλαμβάνονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Reticuloendothelial System, RES) στο σπλήνα και το συκώτι, με αποτέλεσμα την ταχεία απομάκρυνση από τον ορό αίματος. Επιπλέον, τα συμβατικά λιποσώματα αποδομούνται από τα ένζυμα του λιποσώματος, έπειτα από ενδοκύττωση στο κύτταρο, κάτι που συνεπάγεται μειωμένη ποσότητα να καταλήγει τελικά στο σημείο του στόχου και ακολούθως μειωμένη αποτελεσματικότητα¹ (Shashi et al., 2012). Για την αντιμετώπιση αυτών των μειονεκτημάτων, δημιουργήθηκαν τα προηγμένα συστήματα μεταφοράς δραστικών ουσιών (advanced Drug Delivery nanoSystems, aDDnSs), όπου, συνδυάζοντας δύο διαφορετικά βιοϋλικά, ο δημιουργούμενος φορέας

¹ Τα παραπάνω μειονεκτήματα μετατρέπονται σε πλεονεκτήματα στην περίπτωση που θεραπευτικός στόχος είναι τα μακροφάγα, μεταφέροντας σε αυτά αντιμικροβιακές ουσίες. Διαφορετικά, μπορεί να μεταφέρει αντιγόνα, ώστε να προκαλέσει ανοσολογική απάντηση από τα μακροφάγα (ως πρώτο βήμα ανοσολογικής απόκρισης).

αποκρίνεται σε ερεθίσματα (θερμοκρασία, ηλεκτρισμός, μαγνητικό πεδίο, υπέρηχοι, φως, ιόντα, pH, κλπ.) και μεταβάλλει τη δομή του (Lasic, 1990; Liu et al., 2013).

Πολύ ελκυστική πρόταση αποτελούν τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα (pH-sensitive liposomes), τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει των μηχανισμών πυροδότησης της pH-απόκρισης, σε λιποσώματα που συνδυάζουν πολυμορφικά λιπίδια (πρωτονίωση καρβοξυλομάδων σε όξινο pH, μείωση τρισδιάστατου όγκου και ενυδάτωσης υδρόφιλων (πολικών) κεφαλών, αποσταθεροποίηση διπλοστοιβάδας) (Simões et al., 2004), λιποσώματα αποτελούμενα από “cage” λιπιδικά παράγωγα (δημιουργία αναστρέψιμων ομοιοπολικών διαμορφώσεων στην πολική κεφαλή, έκθεση των μακρίων λιπιδικών αλυσίδων, αποσταθεροποίηση διπλοστοιβάδας) και τέλος λιποσώματα που εμπεριέχουν pH-sensitive πεπτίδια/πρωτεΐνες (Liu et al., 2011; Liu and Huang, 2013). Τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα βρίσκουν εφαρμογές στη μεταφορά φθορίζουσών ουσιών (για απεικόνιση), τη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων, μονοκλωνικών αντισωμάτων αντιφλεγμονωδών θεραπειών, γονιδιακών θεραπειών (DNA, ολιγονουκλεοτίδια), για εμβόλια και για μεταφορά οξοευαίσθητων φαρμάκων για την από του στόματος χορήγηση (Hrubý et al., 2015; Liu and Huang, 2013; Simões et al., 2004).

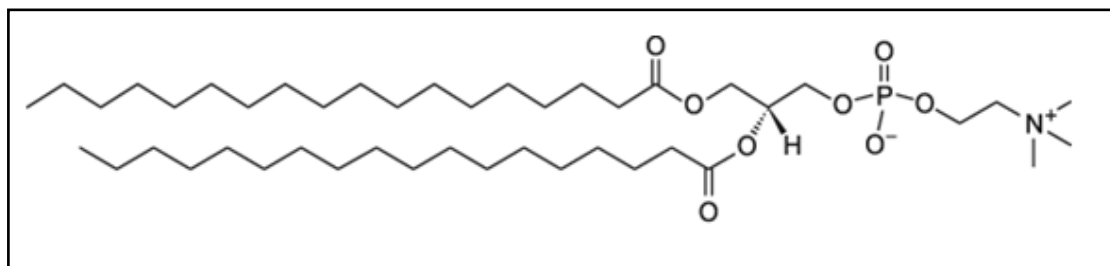


Εικόνα A5: Πιθανές κλινικές εφαρμογές pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων (Liu and Huang, 2013).

A.3.1.1 *L-α*-phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)

Για την παρασκευή των διπλοστοιβάδων (τμήμα καινοτόμου εκδόχου), αλλά και των λιποσωμάτων (καινοτόμο έκδοχο), χρησιμοποιήθηκε το φωσφολιπίδιο της

υδρογονωμένης φωσφατιδυλοχολίνης σόγιας ή αλλιώς *L*- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC).



Εικόνα Α6: Μία από τις πιθανές δομές του προϊόντος της Avanti Polar Lipids Inc.

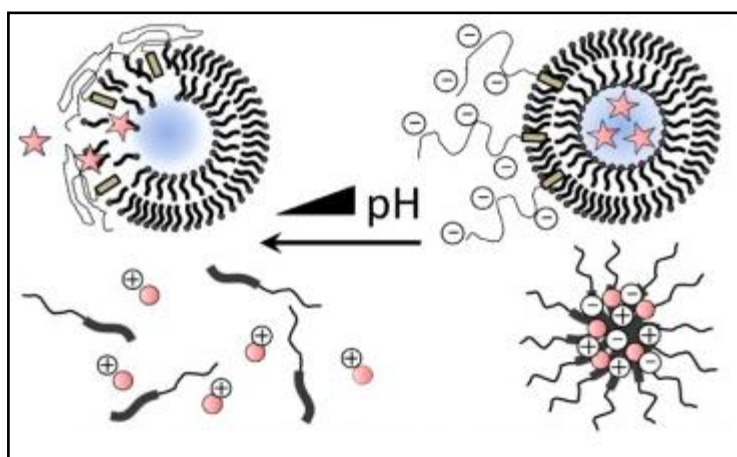
Πρόκειται για ένα αμφιτεριόν (zwitterion) γλυκεροφωσfolιπίδιο, που αποτελείται από δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες στεατικού (18:0) οξέος, οι οποίες ενώνονται μέσω των ομάδων -COOH με τη γλυκερόλη, η οποία στον sn-1 άνθρακά της έχει ενωθεί με μια φωσφορική ομάδα. Η φωσφορική ομάδα αποτελεί γέφυρα σύνδεσης της μικρής υδρόφιλης κεφαλής, δηλαδή της χολίνης, με τη γλυκερόλη και εν συνεχεία με τις μη πολικές αλυσίδες (Berg et al., 2011; Mashaghi et al., 2013). Ο μοριακός τύπος του HSPC είναι $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{NO}_8\text{P}$ (το είδος που κυριαρχεί στο μίγμα), η γραμμομοριακή του μάζα είναι 783.774 g/mol (μέσος όρος που στηρίζεται στην κατανομή των λιπαρών οξέων στο προϊόν, καθότι συνυπάρχει και το παλμιτικό οξύ) και η T_m του $52\text{-}53 \text{ }^\circ\text{C}$. Πρόκειται για ένα φωσfolιπίδιο αδιάλυτο στο νερό και την ακετόνη. Ωστόσο, είναι διαλυτό σε χλωροφόρμιο, σε θερμοκρασία δωματίου.

A.3.1.2 (*n*-butylacrylate)-*b*-poly(acrylic acid) 30/70

Για την παρασκευή των διπλοστοιβάδων (τμήμα καινοτόμου εκδόχου), αλλά και των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε ως pH-αποκρινόμενο πολυμερές το (*n*-butylacrylate)-*b*-poly(acrylic acid) 30/70 (PnBA-*b*-PAA 30/70), που προήλθε από συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και συγκεκριμένα, από το εργαστήριο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Ερευνητή Στέργιου Πίσπα. Πρόκειται για ένα συμπολυμερές κατά συστάδες, το οποίο συνετέθη με RAFT πολυμερισμό χρησιμοποιώντας 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid ως Chain Transfer Agent (CTA), παρουσία 1,4-διοξανίου και AIBN, στους $65 \text{ }^\circ\text{C}$, για 24 ώρες. Το PnBA-*b*-PAA 30/70 έχει μέσο μοριακό βάρος $10,000 \text{ g/mol}$ και το περιεχόμενο PAA block αποτελεί το 70% κατά βάρος. Το PAA είναι ένα συνθετικό block, που ανήκει στην οικογένεια των poly(carboxyl acid)s και προσδίδει pH-ευαισθησία

(Fujiwara et al.,1995). Το PnBA είναι ένα υδρόφοβο block, το οποίο λειτουργεί ως “άγκυρα” (anchor), η οποία ενσωματώνεται μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις, όπως η ισχαιμία, η μόλυνση, η φλεγμονή, ο όγκος, όπου το pH του μικροπεριβάλλοντος της πάσχουσας περιοχής διαφέρει συγκριτικά με το pH των φυσιολογικών ιστών. Στον όγκο, για παράδειγμα, το $\text{pH} \approx 5.7$, καθώς η αποδιοργανωμένη αγγείωση καθιστά αδύνατη την ικανοποίηση διατροφικών απαιτήσεων και απαιτήσεων σε οξυγόνο, κάτι που οδηγεί σε υποξία και επακόλουθη παραγωγή λακτικού οξέος, υδρόλυση του ATP, αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυσης, αυξημένη παραγωγή πρωτονίων, που λόγω της μειωμένης λυμφατικής παροχέτευσης, δημιουργούν όξινο μικροπεριβάλλον (Felder et al., 2014). Σε αυτές τις μικροδιαφορές βασίζεται η χρήση του pH-αποκρινόμενου πολυμερούς, το οποίο μεταβάλλοντας τη διαμόρφωσή του στο χώρο, επηρεάζει τη σταθερότητα του λιποσώματος, και έτσι το προφίλ της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στο PnBA-b-PAA 30/70, σε pH 7.4, τα πολυμερή ιονίζονται, δημιουργούνται $-\text{COO}^-$ ομάδες, δημιουργούνται ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των φορτισμένων λιποσωμάτων, που συνδυαστικά και με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, σταθεροποιούν τους φορείς και δεν πραγματοποιείται η σύντηξή τους. Αντίθετα, σε pH 4.0-4.5, οι $-\text{COO}^-$ ομάδες μετατρέπονται σε $-\text{COOH}$ (εξαφανίζονται οι ηλεκτροστατικές απώσεις), οι εκτεταμένες αλυσίδες PAA συρρικνώνονται και η τροποποιημένη διαμόρφωσή τους, προκαλεί επαναδιευθέτηση της “εμβολιασμένης” άγκυρας PnBA, η οποία με τη σειρά της διαταράσσει τη δομή της διπλοστοιβάδας.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της διαμορφωτικής αλλαγής του PAA ως απόκριση στις αλλαγές του περιβάλλοντος (Felber et al., 2014).

Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται κενά στην αποσταθεροποιημένη μεμβράνη και αποδεσμεύεται το περιεχόμενο βιοδραστικό μόριο (Felber et al., 2014; Wang et al., 2014). Είναι σημαντικό να τονιστεί πως η ποσότητα/αναλογία του block άγκυρας PnBA έχει εξέχουσα σημασία, γιατί αν είναι πολύ μικρή, υπάρχει πιθανότητα οι δημιουργούμενες δυνάμεις να είναι ανεπαρκείς για τη διατάραξη της διπλοστοιβάδας με αποτέλεσμα να μην διευκολύνεται η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας (Wang et al., 2014).

A.3.2 Κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης

Τα έκδοχα είναι γενικά αδρανείς φαρμακευτικές ουσίες και στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται η προσθήκη τους για την παρασκευή δισκίων ή καψουλών, επειδή προσδίδουν στα δραστικά τις επιθυμητές ιδιότητες ή χαρακτηριστικά. Αναλόγως των ιδιοτήτων που προσδίδουν στο τελικό προϊόν, τα υλικά αυτά διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες (**Πίνακας A2**) (Pifferi et al., 1999). Ο λόγος που ονομάζονται “κλασσικά” είναι πως χρησιμοποιούνται για την παρασκευή κλασσικών φαρμακοτεχνικών μορφών.

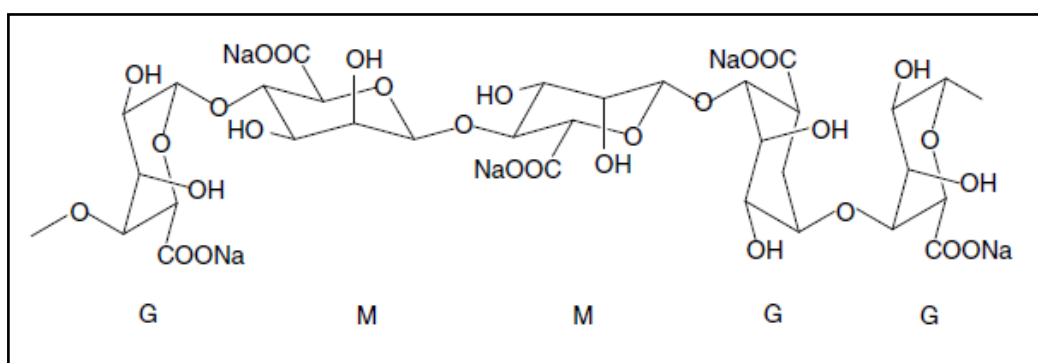
Πίνακας A2: Βασικές κατηγορίες και ιδιότητες εκδόχων

| Κατηγορίες | Ιδιότητες |
|---|---|
| Αραιωτικά | <ul style="list-style-type: none"> • ↑όγκο + βάρος στερεάς μορφής • Δίνουν επιθυμητές διαστάσεις |
| Αποσαθρωτικά (Μέσα καταθρυμματισμού) | Διευκολύνουν + προκαλούν διάσπαση δισκίου |
| Συνδετικά | <ul style="list-style-type: none"> • Συγκόλληση • Σχηματισμός κόκκων |
| Λιπαντικά-Βελτιωτικά ροής-Αντιπροσκολλητικά | <ul style="list-style-type: none"> • Ομαλοποίηση επιφάνειας σωματιδίων • Ελάττωση τριβών + ελκτικών δυνάμεων κατά τη δισκιοποίηση |

Πέρα από τις παραπάνω κατηγορίες, υπάρχουν επιπλέον τα συντηρητικά, τα αντιοξειδωτικά, οι χρωστικές ύλες, τα βελτιωτικά οσμής και γεύσης, τα προσροφητικά και οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες.

A.3.2.1 Αλγινικό νάτριο χαμηλού ιξώδους (2% viscosity)

Το Αλγινικό νάτριο (Sodium Alginate) αποτελεί το υδατοδιαλυτό μετά νατρίου άλας του αλγινικού οξέος, προέρχεται από φύκη και είναι ένας φυσικός, γραμμικός, βιοσυμβατός, μη τοξικός, μη ανοσογονικός πολυσακχαρίτης. Αυτό το υψηλού μοριακού βάρους γραμμικό τυχαίο συμπολυμερές αποτελείται από δομικές μονάδες D-μαννουρονικού (M) και L-υαλουρονικού οξέος (G), οι οποίες ενώνονται με συνδυασμούς MM, MG, GG. Το D-μαννουρονικό οξύ σχηματίζει β -(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, καταλήγοντας έτσι σε μια ευθύγραμμη και εύκαμπτη διαμόρφωση από M-blocks. Αντίθετα, το L-υαλουρονικό οξύ σχηματίζει α -(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι λειτουργούν ως στερικοί παρεμποδιστές γύρω από τις καρβοξυλομάδες, καταλήγοντας σε μια άκαμπτη διαμόρφωση.



Εικόνα A8: Μοριακή δομή του Αλγινικού Νατρίου (Yang et al., 2008).

Τα άλατα του αλγινικού οξέος είναι πολυανιόντα (υδρόφιλες και υδρόφοβες μονάδες κατά μήκος της αλυσίδας, που τροποποιούνται με πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση των καρβοξυλομάδων του σκελετού) και η διαλυτότητά τους εξαρτάται από την ιοντική ισχύ και το pH. Το μαννουρονικό οξύ και το υαλουρονικό οξύ έχουν τιμές pKa 3.38 και 3.65, αντίστοιχα. Έτσι, με σταδιακή μείωση του pH, μειώνεται ο αριθμός των ομάδων COO^- και σταδιακά χάνεται σε κάποιο ποσοστό ο υδρόφιλος χαρακτήρας, ενώ εμφανίζονται υδρόφοβα τμήματα (Efentakis et al., 2000; Yang et al., 2008). Το Αλγινικό Νάτριο είναι πρακτικά αδιάλυτο σε αιθανόλη, αιθέρα, χλωροφόρμιο, μείγματα αιθανόλης-νερού (όταν το ποσοστό της αιθανόλης είναι 30% ή μεγαλύτερο), σε οργανικούς διαλύτες και σε όξινα διαλύματα, με pH μικρότερο του 3. Διαλύεται αργά σε νερό και σχηματίζει κολλοειδή διαλύματα με μεγάλο ιξώδες. Σε pH

μικρότερο του 3 το αλγινικό νάτριο μετατρέπεται σε αλγινικό οξύ, το οποίο διογκώνεται κατά την ενυδάτωση, αλλά παραμένει αδιάλυτο, με αποτέλεσμα η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας να εξαρτάται από τη διάχυσή του διαμέσω του πολυμερούς (Efentakis et al., 2002).

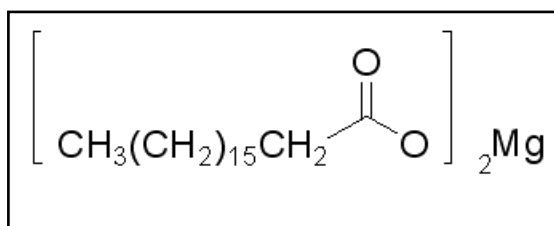
Εξαιτίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του, το Αλγινικό Νάτριο χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία φαρμάκων, με πολυάριθμους ρόλους:

1. Ως συνδετικό και αποσαθρωτικό, σε δισκία
2. Ως αραιωτικό, σε κάψουλες
3. Ως μέσο αύξησης ιξώδους και μέσο απαιώρησης, σε κρέμες και γέλες, για τοπική εφαρμογή
4. Ως σταθεροποιητικό μέσο σε oil-in-water γαλακτώματα
5. Για σχηματισμό νανοσωματιδίων
6. Ως σταθεροποιητής, είτε ως μέσο αύξησης ιξώδους με σκοπό τη διαλυτοποίηση και τη βελτίωση του ιξώδους, ώστε να μη σχηματιστούν κρύσταλλοι (κυρίως σε κατεψυγμένα προϊόντα) (Soares et al., 2004)
7. Για δημιουργία ανθεκτικής και σταθερής γέλης για τη μεταφορά δραστικών ουσιών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, DNA, κλπ (Rowe et al., 2009). Πιο αναλυτικά, ο σχηματισμός γέλης στηρίζεται στην ανταλλαγή ιόντων Na^+ με δισθενή, κυρίως ιόντα Ca^{2+} ή πολυσθενή μεταλλικά ιόντα. Η δημιουργία γέλης ή σταυροδεσμών εξαρτάται από το πλήθος των μονάδων υαλουρονικού οξέος στις αλυσίδες του πολυμερούς. Όταν το δισκίο τύπου μήτρας, το οποίο περιέχει αλγινικό νάτριο έρθει σε επαφή με το νερό ή κάποιο βιολογικό υγρό, ενυδατώνεται και διογκώνεται, σχηματίζοντας μία παχύρρευστη υδροκολλοειδή στοιβάδα, που διαλύεται σχετικά αργά. Η ιδιότητα αυτή είναι πολύ σημαντική για τη φαρμακευτική τεχνολογία, καθώς το αλγινικό νάτριο χρησιμοποιείται κατ'εξοχήν ως υλικό για την παρασκευή υδρόφιλων συστημάτων, τύπου μήτρας, ελεγχόμενης αποδέσμευσης δραστικής ουσίας. Μήτρες αποτελούμενες από αλγινικό άλας ή συνδυασμό αλάτων χρησιμοποιούνται σε συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης πολλών δραστικών ουσιών *in vitro* και *in vivo*, καθώς μπορούν να καθυστερούν τη διαλυτοποίηση της δραστικής ουσίας από τα δισκία και τα υδατικά εναιωρήματα. Αξίζει να αναφερθεί πως σε δισκία άμεσης αποδέσμευσης, προσθήκη 2,5% αλγινικού νατρίου οδήγησε σε ταχύτερη αποδέσμευση, λόγω της δράσης του ως αποσαθρωτικό μέσο, ενώ σε ποσοστά 20-50% προκαλούσε επιβράδυνση του ρυθμού αποδέσμευσης. Συγκεκριμένα,

μελέτες έδειξαν ότι το αλγινικό νάτριο μπορεί να συγκρατήσει την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας για τουλάχιστον 8 ώρες, ειδικά όταν αποτελεί το 50% της μάζας του δισκίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι όταν το μόριο του πολυμερούς είναι πλούσιο σε μονάδες β -D-μαννουρονικού οξέος, είναι πιο αποτελεσματικό σε ό,τι αφορά την ελεγχόμενη αποδέσμευση των δραστικών ουσιών από συστήματα τύπου μήτρας, σε όξινες συνθήκες, καθώς η μορφή αυτή ενυδατώνεται ταχύτατα σε χαμηλό pH (Liew et al.,2006; Ghahramanpoor et al., 2011).

A.3.2.2 Στεατικό Μαγνήσιο

Το Στεατικό Μαγνήσιο (Magnesium stearate) αποτελεί άλας μαγνησίου του οκταδεκανοϊκού οξέος και είναι μια λευκή σκόνη, σταθερή σε θερμοκρασία δωματίου. Έχει χημικό τύπο $C_{36}H_{70}MgO_4$, είναι αδιάλυτο στο νερό και το σημείο τήξης του είναι οι 88 °C.



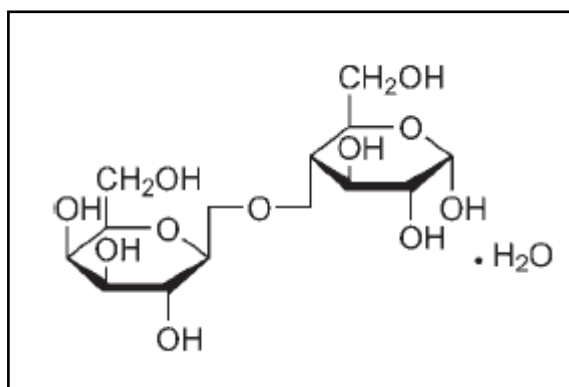
Εικόνα A9: Μοριακή δομή του Στεατικού Μαγνησίου.

Θεωρείται μη τοξικό και αποτελεί το πλέον συχνά χρησιμοποιούμενο λιπαντικό κατά την παρασκευή στερεών φαρμακοτεχνικών μορφών, ελαχιστοποιώντας τις δυνάμεις Van der Waals, διασπείροντας τα ηλεκτροστατικά φορτία στην επιφάνεια των κόκκων ή των κόνεων και ελαττώνοντας την τριβή μεταξύ των σωματιδίων. Δρα ως βελτιωτικό ροής και ως αντιπροσκολλητικό, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ροής και των χαρακτηριστικών των κόκκων και των υλικών άμεσης συμπίεσης κατά τη διαδικασία της δισκιοποίησης. Αν και οι λιπαντικές του ιδιότητες είναι εξαιρετικές, αποτελεί μόριο εξαιρετικά υδρόφοβο και επομένως είναι δυνατόν να μειώσει τη διαβρεκτικότητα των δισκίων, με αποτέλεσμα την παράταση της διαλυτοποίησης και συνεπώς της αποδέσμευσης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας. Υπάρχουν διάφορες μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι το στεατικό μαγνήσιο μπορεί να επηρεάσει το χρόνο αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας (Karehill and Nystram, 1990; Εφεντάκης, 2010; Διαμαντίδη, 2016). Επομένως, είναι αναγκαίο να προσέχεται η συγκέντρωση του

Στεατικού Μαγνησίου στην τελική συνταγή, καθώς και ο χρόνος ανάμιξης με τα υπόλοιπα συστατικά (Rowe et al., 2009).

A.3.2.3 Μονοϋδρική Λακτόζη

Η Λακτόζη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόλευκο-λευκό κρυσταλλικό αραιωτικό στη φαρμακευτική βιομηχανία. Είναι ένας φυσικός δισακχαρίτης και δημιουργείται από τη συνένωση του μονομερούς γαλακτόζης με αυτό της γλυκόζης με β-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό. Εμφανίζεται σε διάφορες μορφές, με διαφορετικές ιδιότητες, αλλά και με διαφορετικές εφαρμογές η καθεμία από αυτές. Για παράδειγμα, μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό (“spray-dried”) παράγεται η άμορφη λακτόζη, ενώ μέσω της άλεσης και του κοσκινίσματος παράγεται η κρυσταλλική μορφή της λακτόζης (άνυδρη ή ένυδρη).



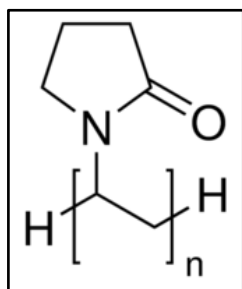
Εικόνα A10: Μοριακή δομή της Μονοϋδρικής Λακτόζης.

Η Μονοϋδρική Λακτόζη (Lactose monohydrate) χρησιμοποιείται κυρίως σε διαδικασίες, οι οποίες περιλαμβάνουν κοκκοποίηση και ξήρανση, αλλά και στη παρασκευή συσκευών εισπνοής. Η α-Μονοϋδρική Λακτόζη χρησιμοποιείται σε δισκία άμεσης συμπίεσης, όπου δεν απαιτείται κοκκοποίηση, ενώ η ευρεία εφαρμογή της οφείλεται κυρίως στο χαμηλό κόστος αυτής της μορφής. Αποτελεί μια άμορφη λακτόζη, η οποία διαθέτει καλές ρεολογικές, αλλά και συνδετικές ιδιότητες, κυρίως εξαιτίας της υψηλής σφαιρικότητας των συσσωματωμάτων της. Συνήθως συνδυάζεται με την μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, το άμυλο και διάφορα λιπαντικά (Patera et. al., 2012). Πέρα από τη χρήση της σε δισκία, η Μονοϋδρική Λακτόζη χρησιμοποιείται ως αραιωτικό-φορέας σε ξηρές κόνεις εισπνοής, σε λυόφιλα προϊόντα (πολλές φορές συνδυαστικά με σουκρόζη, σε αναλογία 1:3) αλλά δημιουργεί και προστατευτικό film γύρω από τα σωματίδια, σε διαλύματα ή εναιωρήματα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η Λακτόζη συμπυκνώνεται με πρωτοταγείς αμίνες, μέσω μιας αντίδρασης τύπου Maillard, σχηματίζοντας κίτρινο-

καφέ προϊόντα. Υπάρχει πιθανότητα να συμπυκνωθεί και με δευτεροταγείς αμίνες, αλλά η αντίδραση σταματά στο στάδιο της ιμίνης, χωρίς να σχηματίζεται κίτρινο-καφέ προϊόν (Rowe et al., 2009). Προσοχή χρειάζεται κατά την αποθήκευσή της, γιατί η ύπαρξη υγρασίας στο χώρο είναι δυνατόν να προκαλέσει αλλοιώσεις ή μεταβολές κατά τη συμπίεση ή ακόμα και ανάπτυξη μικροοργανισμών. Πλέον διατίθεται στο εμπόριο παράγωγο της λακτόζης, το οποίο περιέχει 25% κυτταρίνης και διαθέτει αυξημένη αποσθρωτική ικανότητα (Εφεντάκης, 2010).

A.3.2.4 Πολυβινυλοπυρρολιδόνες χαμηλού (MW:10,000 και MW:29,000) και υψηλού μοριακού βάρους (MW:55,000)

Η Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) χαρακτηρίζεται ως μια λευκή, υποκίτρινη, άμορφη, άγευστη, μη τοξική σκόνη, που κατηγοριοποιείται ως ισχυρή κατά Lewis βάση (υδατοδιαλυτό τριτοταγές αμίδιο). Προκύπτει από τον πολυμερισμό της Ν-βινυλοπυρρολιδόνης.



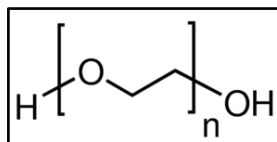
Εικόνα A11: Μοριακή δομή της Πολυβινυλοπυρρολιδόνης.

Το 1939 ο καθηγητής Reppe τη συνέθεσε και στο Β' Παγκόσμιο πόλεμο χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο πλάσματος του αίματος. Τη σήμερα ημέρα δε χρησιμοποιείται για παρεντερική χρήση, καθώς ο οργανισμός δεν μπορεί να μεταβολίσει όλο το πολυμερές, με αποτέλεσμα μικρές ποσότητες μεγαλομοριακού πολυμερούς να παραμένουν στο σώμα. Η Πολυβινυλοπυρρολιδόνη είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά έκδοχα (αποσθρωτικό, συνδιαλύτης, μέσο απαιώρησης, συνδετικό σε δισκία-προσθήκη συνήθως υπό μορφή διαλύματος 3-15%, πυκνωτικό σε υδατικά/αλκοολικά διαλύματα). Ως υδατοδιαλυτό πολυμερές επηρεάζει το ιζώδες, την απορρόφηση και τη διαλυτοποίηση. Όσον αφορά τη διαλυτότητά του, παρουσιάζει πολύ καλή διαλυτότητα στο νερό, σε πολλούς οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο, αιθανόλη, μεθανόλη) και στα γαστρεντερικά υγρά. Όταν είναι ξηρή σκόνη μπορεί να απορροφήσει την υγρασία της ατμόσφαιρας, σχεδόν μέχρι 40% του βάρους της. Εμφανίζει εξαιρετική ικανότητα διαβροχής σε διάλυμα και δημιουργεί film,

γεγονός που την καθιστά ιδανική για επικάλυψη. Ωστόσο, λόγω του κολλώδους χαρακτήρα της κατά την ξήρανση, απαιτείται η επίταση των δισκίων με ένα βελτιωτικό ροής, όπως ο Τάλκης. Το μονομερές της, *N*-βινυλοπυρρολιδόνη, έχει συμπολυμερισθεί με ακρυλικό οξύ, μεθακρυλικά και άλλα μονομερή βινυλίου για χρήση στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, για ακινητοποίηση του ενζύμου λιπάση, καθώς και σε φακούς επαφής. Μεγάλο ενδιαφέρον έχουν μελέτες σχετικά με τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και τη διόγκωση υδρογελών με Πολυβινυλοπυρρολιδόνη, καθώς και η χρήση της για αύξηση της φυσικής σταθερότητας άμορφων στερεών διασπορών δραστικών μορίων (Li et al., 2014; Mishra et al., 2008; Rus et al., 2012; Teleginski et al., 2015; Διαμαντίδη, 2016; Εφεντάκης, 2010).

A.3.2.5 Πολυαιθυλενοξειδία (MW:4,000,000 και MW:7,000,000)

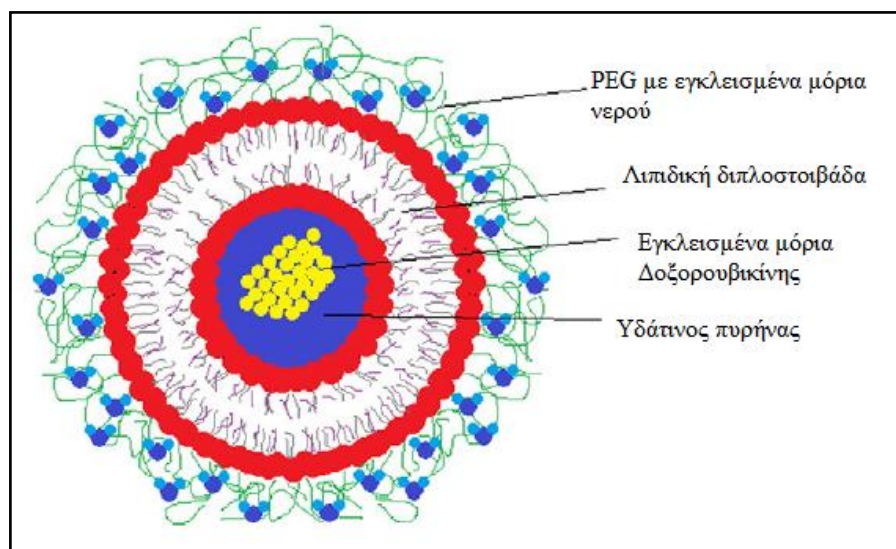
Τα Πολυαιθυλενοξειδία (PEOs), ή Πολυαιθυλενογλυκόλες (PEGs), είναι συνθετικά ομοπολυμερή, που σχηματίζονται από πολυμερισμό μονάδων πολυαιθυλενοξειδίου ($\text{H}-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_n-\text{OH}$, όπου n είναι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων), με τη βοήθεια κατάλληλου καταλύτη.



Εικόνα A12: Μοριακή δομή των Πολυαιθυλενοξειδίων (όπου n : αριθμός επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων).

Τα μη τοξικά και μη ερεθιστικά PEOs παρουσιάζουν μια ποικιλία μοριακών βαρών, που κυμαίνεται από 100,000 έως 8,000,000. Σε θερμοκρασία δωματίου, τα PEOs με MW:200-600 είναι υγρά, με MW έως 1500 είναι ημιστερεά, με MW:3,000-20,000 είναι ημικρυσταλλικά στερεά, ενώ για MW πάνω από 100,000 είναι στερεά. Η ύπαρξη 2,000 έως 100,000 ομάδων αιθυλενοξειδίου τα κάνει ευδιάλυτα σε κρύο και ζεστό νερό. Το ιξώδες που θα προκύψει από τη διόγκωσή τους, εξαρτάται από το μοριακό βάρος του PEO, τη συγκέντρωσή του αλλά και τη θερμοκρασία (Craig, 1995; Hong and Oh, 2008). Πέρα από το νερό, είναι διαλυτά σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες, όπως το ακετονιτρίλιο, το χλωροφόρμιο, το μεθυλενοχλωρίδιο, ενώ είναι αδιάλυτα σε αλειφατικούς υδρογονάνθρακες και στις περισσότερες αλκοόλες. Οι εφαρμογές των PEOs στο φαρμακευτικό πεδίο είναι πολυάριθμες. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιούνται ως συνδετικά σε συγκέντρωση 5-85% στη μορφοποίηση δισκίων,

αλλά και για έλεγχο της αποδέσμευσης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης. Όσο πιο αυξημένο είναι το μοριακό βάρος (μέχρι ενός σημείου), τόσο πιο ιξώδης γίνεται η γέλη που σχηματίζεται, μειώνεται η διάχυση του ευδιάλυτου ή αδιάλυτου φαρμακομορίου και ακολούθως ο ρυθμός αποδέσμευσης (Efentakis and Vlachou, 1999). Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί κατά την ελεγχόμενη αποδέσμευση από μήτρες που περιέχουν PEO (Vlachou et al., 2000; Vlachou et al., 2001), έχουν ως κοινό πρώτο βήμα τη διόγκωση (swelling), που πραγματοποιείται με είσοδο υγρού (Vlachou et al., 2010), ενώ διαφοροποιούνται ως προς το δεύτερο βήμα. Ο πρώτος μηχανισμός θεωρεί τη διάχυση (diffusion) ως καθοριστικό βήμα, ενώ ο δεύτερος, που αφορά κυρίως λιγότερο διαλυτές δραστικές ουσίες, τη διάβρωση (erosion) (Efentakis et al., 2007), που πραγματοποιείται απώλεια μάζας. Η Πολυαιθυλενογλυκόλη δύναται να συζευχτεί με λιποσώματα (PEGylated liposomes), λειτουργώντας ως «αποθητικό» των πρωτεϊνών του πλάσματος, εξαιτίας της ελαστικότητας των αλυσίδων της, του μεγάλου αριθμού πιθανών διαμορφώσεων και του υψηλού βαθμού ενυδατώσεως της. Ως συνέπεια, προστατεύει το σύστημα από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με το βιολογικό μέσο, αυξάνει την διαλυτότητα, αυξάνει την βιοσυμβατότητα, μειώνει την ανοσογονικότητα και μειώνει την συσσώρευση αιμοπεταλίων, αυξάνοντας έτσι το χρόνο κυκλοφορίας των λιποσωμάτων. Παράλληλα, μπορεί και συζεύγνυται με μικρά μόρια (όπως ένζυμα, κυτοκίνες, αντισώματα) και έτσι αυξάνει το μοριακό μέγεθος του συστήματος κατά την νεφρική διήθηση. Ωστόσο, έχει ως μειονέκτημα τη μειωμένη αποτελεσματικότητα εσωτερικοποίησης. Μέχρι σήμερα, η πολυαιθυλενογλυκόλη θεωρείται η σίγουρη επιλογή για την δημιουργία stealth λιποσωμάτων (Felice et al., 2014).

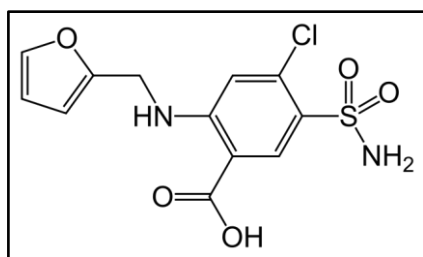


Εικόνα A13: Παράδειγμα δομής PEG–υλιωμένου λιποσώματος, με εγκλεισμό Δοξορουβικίνης στον υδάτινο πυρήνα του (Felice et al., 2014).

Τέλος, τα PEOs έχουν βλεννοπροσκολλητικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν, έπειτα από ακτινοβόληση, σε μορφή υδρογελών για επικάλυψη και ταχύτερη επούλωση πληγών (Rowe et al., 2009).

A.3.3 Δραστική ουσία

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως δραστική ουσία η Φουροσεμίδη (Furosemide, 5-αμινοσουλφονυλ-4-χλωρο-2-[(2-φουρανυλμεθυλ)αμινο]βενζοϊκό οξύ).



Εικόνα A14: Μοριακή δομή της Φουροσεμίδης.

Πρόκειται για ένα πολύ υδρόφοβο φαρμακομόριο, ευαίσθητο στη φωτόλυση, ασθενές οξύ (pK_a 3.48) (Devarakonda et al., 2007), ευκόλως υδρολυόμενο και καθιζάμενο σε όξινο pH (Silva et al., 2013), με πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (κάτι που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του). Είναι καλώς διαλυμένο σε οργανικούς διαλύτες, όπως τα αλκαλι-υπεροξειδία και το σιμεθυλφορμαμίδιο. Ωστόσο, δε γίνεται να χρησιμοποιηθούν αυτοί οι διαλύτες, καθώς είναι ερεθιστικοί και τοξικοί. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιούνται πολλές τεχνικές για βελτιστοποίηση της διαλυτοποίησης, όπως τα επιφανειοδραστικά, οι συνδιαλύτες, οι κρυσταλλικές τροποποιήσεις, ο έλεγχος του pH, οι στερεές διασπορές και τα συμπλεκτικά αντιδραστήρια, όπως οι κυκλοδεξτρίνες. Κοινός στόχος η βελτίωση της συγγένειας με το νερό, η αύξηση της σταθερότητας, η αύξηση της διαλυτότητας, η αύξηση του ρυθμού διάλυσης και συνεπώς η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της Φουροσεμίδης (Devarakonda et al., 2007; Vlachou and Papaïoannou, 2003). Εναλλακτικά, με τη βοήθεια πολυμερών, έχουν γίνει μελέτες για συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης τύπου μήτρας, δύο ή τριών στρωμάτων, τα οποία αποδεσμεύουν αρχικά αργά, και με ταχύ ρυθμό σε μια δεύτερη φάση (Efentakis et al., 2010), αλλά και συστήματα δενδριμερών διαφορετικών γενεών, τα οποία ανάλογα με το pH του μέσου διάλυσης, αποδεσμεύουν πιο γρήγορα ή πιο αργά τη Φουροσεμίδη

(Devarakonda et al., 2007). Η Φουροσεμίδη αποτελεί ένα διουρητικό της αγκύλης, το οποίο χρησιμοποιείται ως φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση του οξέος πνευμονικού οιδήματος από συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, σε επείγουσες καταστάσεις για γρήγορη και έντονη διούρηση (οξύ πνευμονικό οίδημα), αλλά και ως φάρμακο ελέγχου για την αξιολόγηση του θεραπευτικού αποτελέσματος φαρμακομορίων για νεφρική ανεπάρκεια. Δρα άμεσα, ακόμη και σε άτομα με κακή νεφρική λειτουργία, αναστέλλοντας την ταυτόχρονη μεταφορά $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ από την ενδοαυλική μεμβράνη του ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle. Ως εκ τούτου ελαττώνεται η επαναρρόφιση αυτών των ιόντων. Τέλος, η Φουροσεμίδη ελαττώνει τη νεφρική αγγειακή αντίσταση και αυξάνει τη νεφρική αιματική ροή. Χαρακτηριστικές ανεπιθύμητες ενέργειες της Φουροσεμίδης (και γενικότερα όλων των διουρητικών της αγκύλης) είναι η ωτοτοξικότητα, η υπερουριχαιμία, η υπόταση, η καταπληξία, οι καρδιακές αρρυθμίες και η υποκαλιαιμία (Harvey and Champe, 2003).

A.4. Στόχος της εργασίας

Η παρούσα εργασία στοχεύει στην να ανάδειξη της σημαντικότητας της μεθόδου της Θερμικής Ανάλυσης στο στάδιο της προμορφοποίησης, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας, του πολυμορφισμού, των θερμοκρασιών μετάβασης, και τελικώς της συνεργασιμότητας των συστατικών ενός μίγματος. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε θερμική ανάλυση σε:

1. Καινοτόμα έκδοχα

- Χιμαιρικές διπλοστοιβάδες (κομμάτι καινοτόμου εκδόχου λιπόσωμα), με σύσταση HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, σε 6 διαφορετικές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0 και 9:3.0
- Χιμαιρικά λιποσώματα (καινοτόμο έκδοχο – τελικό βιοεμπνευσμένο νανοσύστημα μεταφοράς), με σύσταση HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Furosemide, σε 3 διαφορετικές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0 και 9:0.1:1.0

με στόχο την παρατήρηση των θερμοτροπικών χαρακτηριστικών και την αξιολόγηση της συνεργασιμότητας των δύο βιοϋλικών (φωσφολιπίδιο και pH-αποκρινόμενο πολυμερές), που πιθανώς επηρεάζουν τη σταθερότητα της φαρμακοτεχνικής μορφής και συνεπώς τη δυνητική αποδέσμευση της δραστικής ουσίας.

2. Κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης

- Αλγινικό Νάτριο, Στεατικό Μαγνήσιο, Μονοϋδρική Λακτόζη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη διαφορετικών μοριακών βαρών (MW:10,000, MW:29,000, MW:55,000), Πολυαιθυλενοξείδιο διαφορετικών μοριακών βαρών (MW:4,000,000, MW:7,000,000) και δραστική Φουροσεμίδα
- Μίγματα (παρουσία και απουσία της δραστικής Φουροσεμίδης) Φουροσεμίδα:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, σε αναλογία 1.0:1.0, Φουροσεμίδα:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, σε αναλογία 1.0:1.0 και Φουροσεμίδα:Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, σε αναλογία 1.0:0.5:1.0:0.01

με στόχο την παρατήρηση των θερμοτροπικών χαρακτηριστικών των εκδόχων ξεχωριστά, για προσδιορισμό της καθαρότητας και των πιθανών αποσυνθέσεων – προσμίξεων, αλλά και τη συγκριτική αξιολόγηση των θερμικών αποτυπωμάτων των

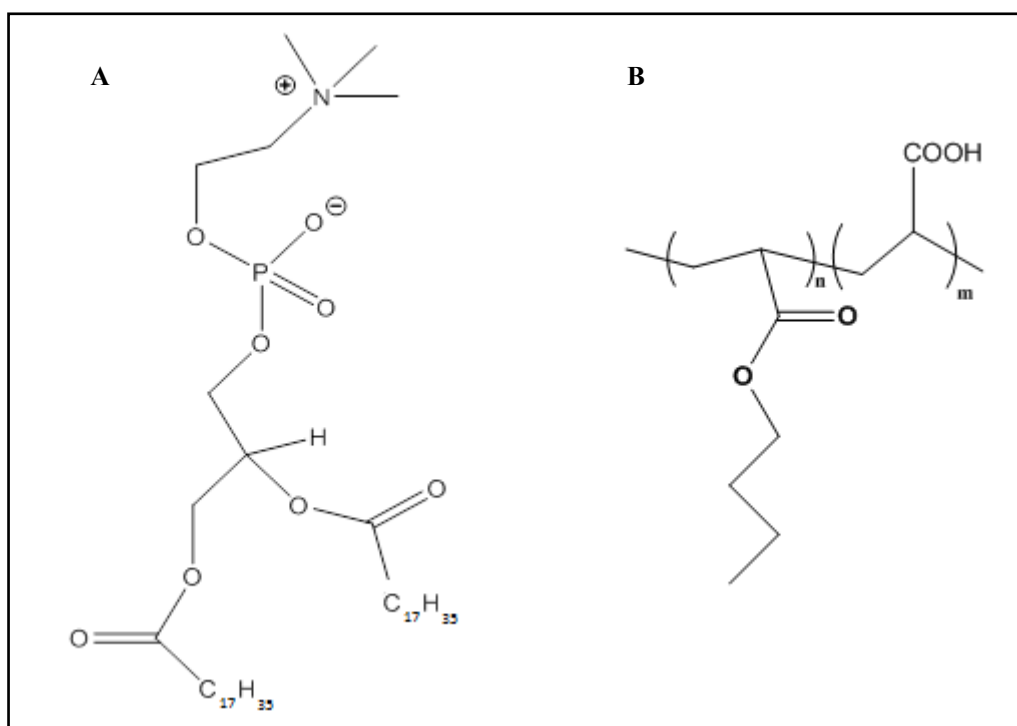
μιγμάτων τους, για αξιολόγηση της συμβατότητας – συνεργασιμότητας των υλικών,, που πιθανώς επηρεάζει τη σταθερότητα της τελικής φαρμακοτεχνικής μορφής.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Παρασκευή χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70

B.1.1 Υλικά

- Μεθανόλη (MeOH) (Carlo Erra)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃) (Fischer Chemical)
- L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) (**Εικόνα 1A**)
- Poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70 (PnBA-b-PAA 30/70, MW:10,000 g/mol) (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) (**Εικόνα 1B**), σε διάλυμα χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1, συγκέντρωσης c=5.00 mg/mL

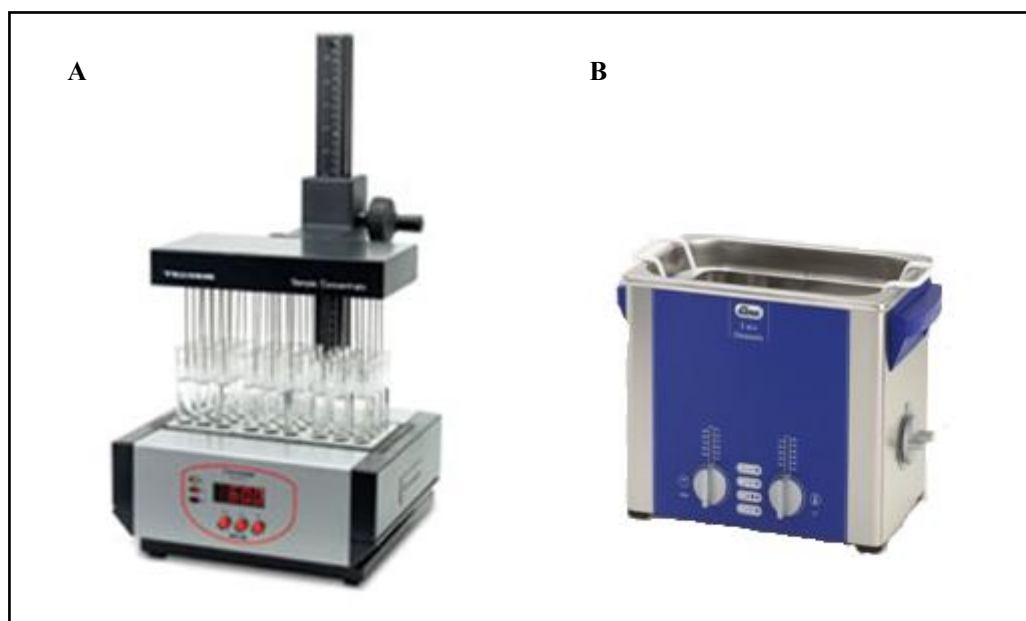


Εικόνα B15: Μοριακή δομή (A) Λιπιδίου L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) και (B) Συμπολυμερούς Poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70.

B.1.2 Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100 μ L και 1000 μ L Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή εξάτμισης (Techne Dri-Block DB-3 Thermostat with Techne Sample Concentrator) (**Εικόνα 2A**)

- Συσκευή λουτρού υπερήχων (Elmasonic S30, Elma Schmidbauer GmbH)
(Εικόνα 2B)



Εικόνα B16: (A) Συσκευή εξάτμισης και (B) Συσκευή λουτρού υπερήχων.

B.1.3 Μέθοδος

B.1.3.1 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 30/70, ζυγίζεται η ποσότητα του πολυμερούς (αφού έχουν γίνει οι κατάλληλοι υπολογισμοί για τη συνολική θεωρητική ποσότητα συμπολυμερούς, που θα χρειαστεί για την παρασκευή όλων των χημικών διπλοστοιβάδων) και διαλύεται σε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1, ώστε να αποκτήσουμε συγκέντρωση $c=5.00 \text{ mg/mL}$. Ακολουθεί υπερήχηση στη συσκευή λουτρού υπερήχων για 2 min, έως πλήρους διάλυσης του στερεού. Το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

B.1.3.2 Παρασκευή λεπτού λιπιδικού υμενίου σε χημικές διπλοστοιβάδες, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0

Αρχικά σε σκαφίδιο ζυγίζεται η ποσότητα του λιπιδίου L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) και μεταφέρεται ποσοτικά σε φιαλίδιο (έκπλυση φιαλιδίου με χλωροφόρμιο). Εν συνεχεία, προστίθεται με τη βοήθεια μικροσυριγγών (100 μL και 1000 μL Hamilton microliterTM syringes) το διάλυμα παρακαταθήκης, σε κατάλληλη ποσότητα, προκειμένου να επιτευχθούν οι μοριακές αναλογίες 9:0.0,

9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0 (HSPC:PnBA-b-PAA 30/70). Τα φιαλίδια προσαρμίζονται στις θέσεις της βάσης της συσκευής εξάτμισης (Techne Dri-Block DB-3 Thermostat with Techne Sample Concentrator) στους 60 °C, για περίπου 30min, μέχρι πλήρους εξάτμισης των διαλυτών. Οι διπλοστοιβάδες που παραλαμβάνονται, διατηρούνται στο ψυγείο (T=4°C).

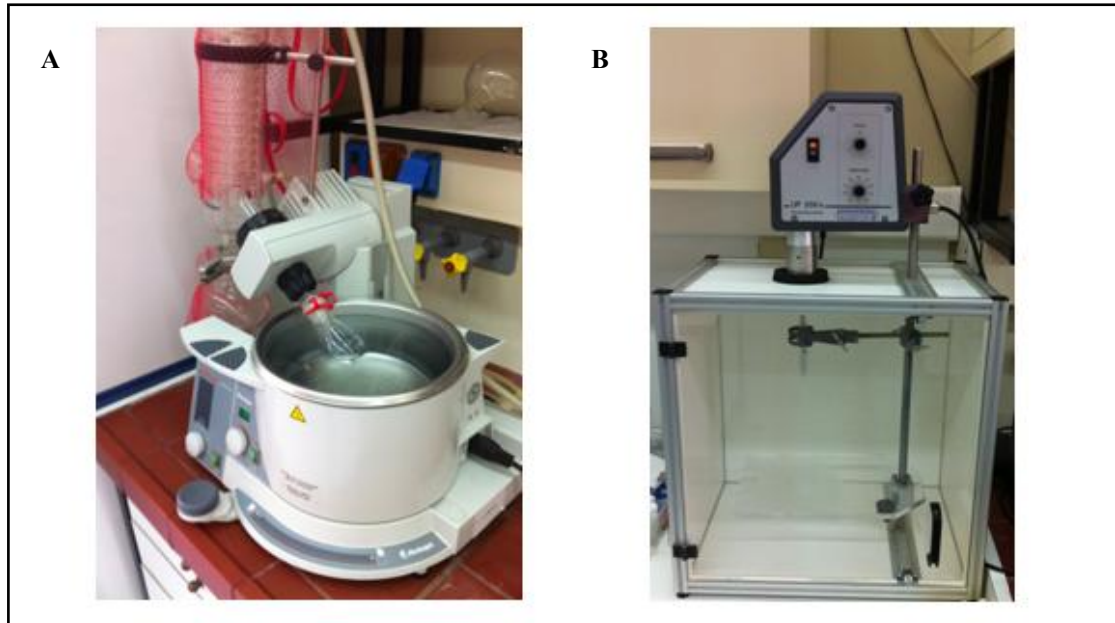
B.2. Παρασκευή χμαιοικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδα

B.2.1 Υλικά

- Μεθανόλη (MeOH) (Carlo Erra)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃) (Fischer Chemical)
- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4
- L-α-phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- Poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70 (PnBA-b-PAA 30/70, MW:10,000 g/mol) (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών), σε διάλυμα χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1, συγκέντρωσης c=5.00 mg/mL
- Φουροσεμίδα (Furosemide) (Sigma-Aldrich)

B.2.2 Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή λουτρού υπερήχων (Elmasonic S30, Elma Schmidbauer GmbH)
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (Laborota 40 A00, Heidolph Instruments) (**Εικόνα 3A**)
- Ξηραντήρας κενού
- Συσκευή Υπερήχησης με αισθητήρα (UP200s Ultrasonic processor for stationary operation, Dr Hielscher GmbH, Berlin, Germany) (**Εικόνες 3B, 4**)



Εικόνα B17: (A) Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό και (B) Συσκευή Υπερήχων με αισθητήρα.



Εικόνα B18: Αρχή λειτουργίας Αισθητήρα Υπερήχων.

B.2.3 Μέθοδοι

B.2.3.1 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 30/70, ζυγίζεται η ποσότητα του πολυμερούς (αφού έχουν γίνει οι κατάλληλοι υπολογισμοί για τη συνολική θεωρητική ποσότητα συμπολυμερούς, που θα χρειαστεί για την παρασκευή όλων των χημικών διπλοστοιβάδων) και διαλύεται σε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1, ώστε να αποκτήσουμε συγκέντρωση $c=5.00 \text{ mg/mL}$. Ακολουθεί υπερήχηση στη συσκευή λουτρού υπερήχων για 2 min, έως πλήρους διάλυσης του στερεού. Το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

B.2.3.2 Παρασκευή χμαιοικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου. Το λεπτό λιπιδικό υμένιο, το οποίο προορίζεται για την παραγωγή λιποσωμάτων L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC), παρασκευάζεται με L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) διαλυμένη σε διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης αναλογίας 9:1 v/v. Το διάλυμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 100mL και τοποθετείται σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό, με speed rpm 230-250, σε θερμοκρασία 42 °C, ώστε οι διαλύτες να εξάτμιστούν σταδιακά και να προσανατολιστούν τα λιπίδια. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται λεπτό ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Στο στόμιο της σφαιρικής τοποθετείται parafilm και αφήνεται στο ψυγείο (4 °C) για 24 ώρες τουλάχιστον. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με PBS. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 42–43 °C, ώστε να βρίσκεται πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Ακολουθεί ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου της σφαιρικής σε δοκιμαστικό σωλήνα (συμπλήρωση με τη βοήθεια μικροσυριγγών ποσότητας PBS, αφού λόγω εξάτμισης υπάρχουν απώλειες, προκειμένου η συνολική τελική συγκέντρωση της κολλοειδούς διασποράς να είναι 10 mg/mL). Στη συνέχεια τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο (5min–5min break–5min Probe Sonication), χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUVs) που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Το λιποσωματικό εναιώρημα διατηρείται στο ψυγείο (T=4°C), σε καλά κλεισμένο φιαλίδιο.

B.2.3.3 Παρασκευή χμαιοικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στη μοριακή αναλογία 9:0.1:0.0

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου. Το λεπτό λιπιδικό υμένιο, το οποίο προορίζεται για την παραγωγή λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη 9:0.1:0.0 v/v, παρασκευάζεται με L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) και Poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70 (PnBA-b-PAA 30/70) διαλυμένα σε διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης αναλογίας 9:1 v/v. Το διάλυμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 100mL και τοποθετείται σε

περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό, με speed rpm 230-250, σε θερμοκρασία 42 °C, ώστε οι διαλύτες να εξατμιστούν σταδιακά και να προσανατολιστούν τα λιπίδια. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται λεπτό ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Στο στόμιο της σφαιρικής τοποθετείται parafilm και αφήνεται στο ψυγείο (4 °C) για 24 ώρες τουλάχιστον. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με PBS. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 42–43 °C, ώστε να βρίσκεται πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Ανά διαστήματα, αφαιρείται η φιάλη, υποβοηθείται η απομάκρυνση του υμενίου από τα τοιχώματα, με τη βοήθεια λεπτής σπάτουλας, και πραγματοποιείται Vortex. Η φιάλη επανατοποθετείται για ενυδάτωση. Ακολουθεί ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου της σφαιρικής σε δοκιμαστικό σωλήνα (συμπλήρωση με τη βοήθεια μικροσυριγγών ποσότητας PBS, αφού λόγω εξάτμισης υπάρχουν απώλειες, προκειμένου η συνολική τελική συγκέντρωση της κολλοειδούς διασποράς να είναι 10 mg/mL). Στη συνέχεια τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο (5min–5min break–5min Probe Sonication), χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUVs) που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Το λιποσωματικό εναιώρημα διατηρείται στο ψυγείο (T=4°C), σε καλά κλεισμένο φιαλίδιο.

B.2.3.4 Παρασκευή χημικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδα, στη μοριακή αναλογία 9:0.1:1.0

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου. Το λεπτό λιπιδικό υμένιο, το οποίο προορίζεται για την παραγωγή λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδα 9:0.1:1.0 v/v, παρασκευάζεται με L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC), Poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) 30/70 (PnBA-b-PAA 30/70) και Φουροσεμίδα (Furosemide) διαλυμένα σε διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης αναλογίας 9:1 v/v. Το διάλυμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 100ml και τοποθετείται σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό, με speed rpm 230-250, σε θερμοκρασία 42 °C, ώστε οι διαλύτες να εξατμιστούν σταδιακά και να προσανατολιστούν τα λιπίδια. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται λεπτό ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Στο στόμιο της σφαιρικής τοποθετείται parafilm και αφήνεται στο ψυγείο (4 °C) για 24 ώρες τουλάχιστον. Το λιπιδικό υμένιο

ενυδατώνεται με PBS. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 42–43 °C, ώστε να βρίσκεται πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Ανά διαστήματα, αφαιρείται η φιάλη, υποβοηθείται η απομάκρυνση του υμενίου από τα τοιχώματα, με τη βοήθεια λεπτής σπάτουλας, και πραγματοποιείται Vortex. Η φιάλη επανατοποθετείται για ενυδάτωση. Ακολουθεί ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου της σφαιρικής σε δοκιμαστικό σωλήνα (συμπλήρωση με τη βοήθεια μικροσυριγγών ποσότητας PBS, αφού λόγω εξάτμισης υπάρχουν απώλειες, προκειμένου η συνολική τελική συγκέντρωση της κολλοειδούς διασποράς να είναι 10 mg/mL). Στη συνέχεια τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο (5 min–5 min break–5 min Probe Sonication), χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUVs) που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Το λιποσωμακό εναιώρημα διατηρείται στο ψυγείο (T=4°C), σε καλά κλεισμένο φιαλίδιο.

B.3. Παρασκευή μιγμάτων εκδόχων – δραστικής ουσίας

B.3.1 Υλικά

- Αλγινικό Νάτριο χαμηλού ιξώδους (Sodium alginate 2% viscosity) (Sigma-Aldrich)
- Στεατικό Μαγνήσιο (Magnesium stearate) (Riedel-De Haen)
- Πολυβινυλοπυρρολιδόνη υψηλού μοριακού βάρους (PVP MW:55,000) (Sigma-Aldrich)
- Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000 (Poly(ethylene oxide) MW:4,000,000/ PEO MW:4,000,000/ Polyox 4*10⁶) (Sigma-Aldrich)
- Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000 (Poly(ethylene oxide) MW:7,000,000/ PEO MW:7,000,000/ Polyox 7*10⁶) (Sigma-Aldrich)
- Φουροσεμίδη (Furosemide) (Sigma-Aldrich)

B.3.2 Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)

- Αναμκτήρας (Turbula T2F, Willy A. Bachofen ag Maschinenfabrik) (Εικόνα B5)



Εικόνα B19: Αναμκτήρας.

B.3.3 Μέθοδοι

B.3.3.1 Παρασκευή ομοιογενών μιγμάτων Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, στην αναλογία 1.0:1.0, και Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, στην αναλογία 1.0:1.0

Ζυγίζονται σε ένα φιαλίδιο επακριβώς ίδιες ποσότητες Φουροσεμίδη και Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000 και σε άλλο ένα επακριβώς ίδιες ποσότητες Φουροσεμίδη και Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000. Τα φιαλίδια πωματίζονται σφιχτά και τοποθετούνται στον κάδο του αναμκτήρα Turbula T2F. Η ανάμιξη των εκδόχων-δραστικής ουσίας πραγματοποιείται στις 32 στροφές, για 10min.

B.3.3.2 Παρασκευή ομοιογενούς μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW 55,000): Αλγινικό Νάτριο: Στεατικό Μαγνήσιο στην αναλογία 1.0:0.5:1.0:0.01

Ζυγίζονται σε φιαλίδιο Φουροσεμίδη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000) και Αλγινικό Νάτριο, ώστε να προκύψει αναλογία 1.0:0.5:1.0. Το φιαλίδιο πωματίζεται σφιχτά και τοποθετείται στον κάδο του αναμκτήρα Turbula T2F. Η ανάμιξη των εκδόχων Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000), Αλγινικό Νάτριο και της δραστικής πραγματοποιείται στις 32 στροφές, για 10min. Μετά τα 10min, το φιαλίδιο αφαιρείται από τον κάδο του αναμκτήρα, προστίθεται η ήδη ζυγισμένη μικροποσότητα Στεατικό Μαγνήσιο και επανατοποθετείται για ανάμιξη για άλλα 3min. Αξίζει να διευκρινιστεί πως η προσθήκη του Στεατικού Μαγνησίου έγινε λίγο πριν το τέλος της διαδικασίας ανάμιξης, καθότι σε αυξημένο χρόνο ανάμιξης, προξενεί μείωση της σκληρότητας των δισκίων. Επιπρόσθετα, ως υδρόφοβη ουσία, δύναται να επηρεάσει αρνητικά το ρυθμό διάλυσης της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή. Έτσι

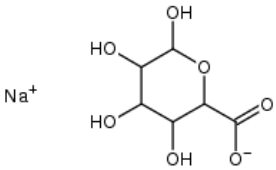
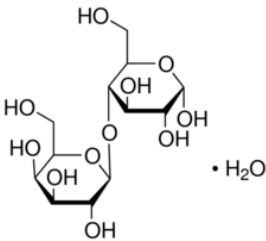
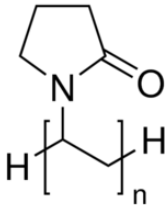
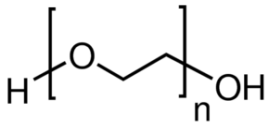
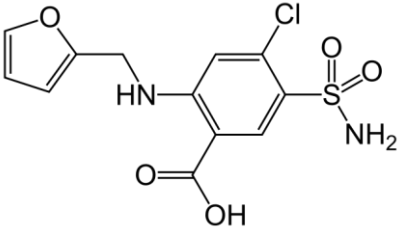
καταλήξαμε σε προσθήκη του στο τέλος της διαδικασίας, αφού θέλαμε να ακολουθηθεί ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαδικασία παρασκευής δισκίων.

B.4. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry – DSC)

B.4.1. Υλικά

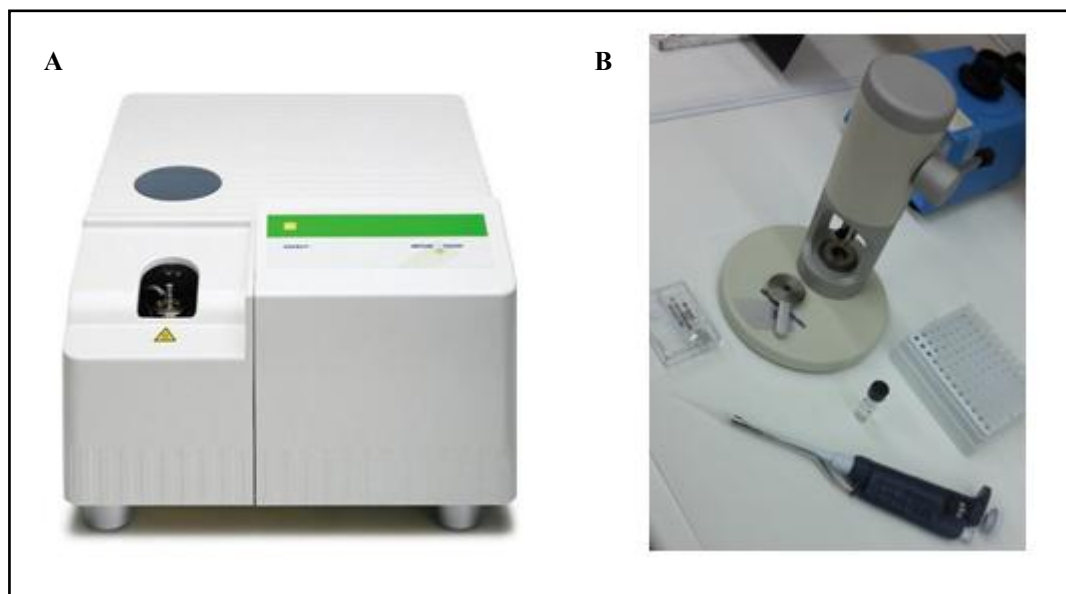
- Χιμαιρικές διπλοστοιβάδες, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0
- Λιποσωμακές κολλοειδείς διασπορές, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0
- Αλγινικό Νάτριο χαμηλού ιξώδους (Sodium alginate 2% viscosity) (Sigma-Aldrich)
- Στεατικό Μαγνήσιο (Magnesium stearate) (Riedel-De Haen)
- Μονοϋδρική Λακτόζη (Lactose monohydrate) (Merck)
- Πολυβινυλοπυρρολιδόνη χαμηλού μοριακού βάρους (PVP MW:10,000 και MW:29,000) (Sigma-Aldrich)
- Πολυβινυλοπυρρολιδόνη υψηλού μοριακού βάρους (PVP MW:55,000) (Sigma-Aldrich)
- Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000 (Poly(ethylene oxide) MW:4,000,000/ PEO MW:4,000,000/ Polyox 4*10⁶) (Sigma-Aldrich)
- Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000 (Poly(ethylene oxide) MW:7,000,000/ PEO MW:7,000,000/ Polyox 7*10⁶) (Sigma-Aldrich)
- Φουροσεμίδη (Furosemide) (Sigma-Aldrich)
- Μίγμα κόνεων Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο 4*10⁶, αναλογίας 1.0:1.0
- Μίγμα κόνεων Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο 7*10⁶, αναλογίας 1.0:1.0
- Μίγμα κόνεων Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW 55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01
- Αλουμινένιες κάψουλες (pans)
- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4
- Citrate Buffer, pH=4.0
- Μικροσύριγγες 20 και 100μL Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)

Πίνακας Β3: Μοριακές δομές χρησιμοποιούμενων κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης και δραστικής ουσίας

| | |
|------------------------------------|--|
| <p>Sodium alginate</p> |  |
| <p>Magnesium stearate</p> | $\left[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O} \right]_2 \text{Mg}$ |
| <p>Lactose monohydrate</p> |  |
| <p>PVP</p> |  |
| <p>Poly(ethylene oxide)</p> |  |
| <p>Furosemide</p> |  |

B.4.2 Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης Ροής Θερμότητας (Heat-flux DSC 822^e Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) (**Εικόνα 6A**)



Εικόνα B20: (A) Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης Ροής Θερμότητας και (B) Μηχανισμός σφράγισης αλουμινένιων κάψουλών.

B.4.3 Μέθοδοι

B.4.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Ο τρόπος προετοιμασίας των δειγμάτων είναι κοινός για καινοτόμα και κλασσικά έκδοχα. Τα δείγματα ζυγίζονται και τοποθετούνται σε ερμητικά σφραγισμένες αλουμινένιες κάψουλες (pans). Οι αλουμινένιες κάψουλες (pans) είναι κατάλληλα σχεδιασμένες, ώστε να προσφέρουν ιδανική θερμική αγωγιμότητα και ελάχιστη πιθανότητα αντίδρασης με το δείγμα, και σφραγίζονται, ώστε να αποφευχθεί η απελευθέρωση του δείγματος ή κάποιου προϊόντος του λόγω της θέρμανσης. Η κάψουλα αναφοράς που χρησιμοποιείται είναι άδεια, ερμητικά σφραγισμένη (**Εικόνα B6 (B)**).

Το μέγεθος του δείγματος που χρησιμοποιείται είναι 3 – 8 mg για τα δείγματα που ζυγίζονται σε ξηρή μορφή (λιπιδικές διπλοστοιβάδες, κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης και μίγματά τους), ενώ για τις λιποσωμιακές κolloειδείς διασπορές

ζυγίζεται μάζα όγκου 30 μL . Όσον αφορά τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες, επειδή θέλουμε να είναι ενυδατωμένες κατά τη μέτρηση, προστίθεται στην πρώτη σειρά πειραμάτων μικροποσότητα (μL) Phosphate Buffered Saline (PBS), $\text{pH}=7.4$ (τέτοια ώστε να προκύψει συγκέντρωση περίπου $1\text{mg}/\mu\text{L}$), ενώ στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, προστίθεται μικροποσότητα (μL) Citrate Buffer, $\text{pH}=4.0$ (τέτοια ώστε να προκύψει συγκέντρωση περίπου $1\text{mg}/\mu\text{L}$).

B.4.3.2 Βαθμονόμηση (Calibration)

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του DSC εξαρτάται από την προσεκτική βαθμονόμηση του οργάνου, όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θερμοκρασία μετάπτωσης του προς μελέτη υλικού. Για τις μετρήσεις όλων των υλικών χρησιμοποιείται, βάσει βιβλιογραφίας, το ίνδιο ($T_m=156.6\text{ }^\circ\text{C}$). Κατά την αλλαγή πρωτοκόλλου πραγματοποιείται νέα βαθμονόμηση.

Αναλυτικές πληροφορίες για τις διαδικασίες βαθμονόμησης μπορούν να ληφθούν από τεχνικά άρθρα της IUPAC (Gatta et al, 2006).

B.4.3.3 Επιλογή πειραματικών συνθηκών

B.4.3.3.1 Μέτρηση καινοτόμων εκδόχων και τμημάτων τους

Για τη μέτρηση των χημικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0 (ενυδατωμένα στην πρώτη σειρά πειραμάτων με Phosphate Buffered Saline (PBS), $\text{pH}=7.4$ και στη δεύτερη σειρά πειραμάτων με Citrate Buffer, $\text{pH}=4.0$), αλλά και των χημικών λιποσωματικών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0, ακολουθείται πρόγραμμα 2.5 κύκλων θέρμανσης – ψύξης, προκειμένου να διασφαλιστεί η καλή επαναληψιμότητα των δεδομένων. Το θερμοκρασιακό εύρος είναι μεταξύ 20°C και 60°C , ενώ ο ρυθμός σάρωσης είναι 5°C min^{-1} .

B.4.3.3.2 Μέτρηση κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης, δραστικής ουσίας, μιγμάτων κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης – δραστικής ουσίας

Για τη μέτρηση των κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης Αλγινικό Νάτριο, Στεατικό Μαγνήσιο, Μονοϋδρική Λακτόζη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη χαμηλού μοριακού βάρους (PVP MW:10,000 και MW:29,000), Πολυβινυλοπυρρολιδόνη υψηλού μοριακού βάρους (PVP MW:55,000), Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000,

Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης και των μιγμάτων κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης – δραστικής ουσίας Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη:PVP(MW 55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01, ακολουθήθηκε κοινό πρόγραμμα θέρμανσης από τους 25°C στους 270°C, με ρυθμό σάρωσης 5°C min⁻¹. Η επιλογή του συγκεκριμένου προγράμματος έγινε βάσει βιβλιογραφικών πληροφοριών για τις θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης, κρυστάλλωσης, τήξης, κλπ. με στόχο το κοινό πρόγραμμα να περιλαμβάνει όλες αυτές τις θερμοκρασίες, όλων των χρησιμοποιούμενων εκδόχων – δραστικής ουσίας.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

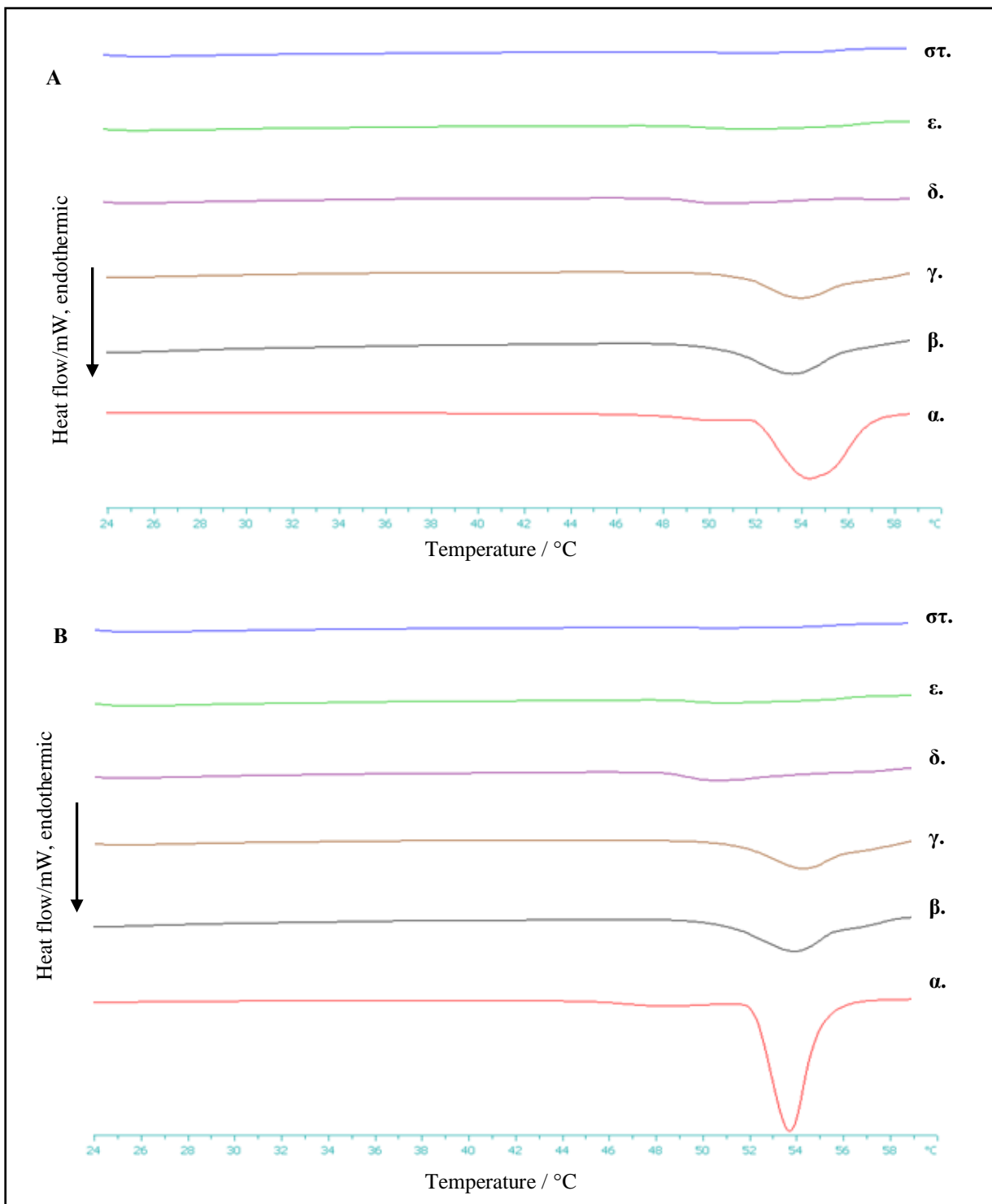
Γ.1. Θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0

Γ.1.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0, σε Phosphate buffered saline (pH 7.4) και σε Citrate buffer (pH 4.0) κατά τη θέρμανση (Heating)

Πίνακας Γ1: Θερμοτροπικές παράμετροι προμετάπτωσης και κύριας μετάπτωσης των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων με Phosphate buffered saline (pH 7.4) και με Citrate buffer (pH 4.0) (Heating)²

| Sample | Buffer | molar ratio | T _{onset,m} /°C | T _m /°C | ΔT _{1/2,m} /°C | ΔH _m / J mol ⁻¹ | T _{onset,s} /°C | T _s /°C | ΔT _{1/2,s} /°C | ΔH _s / J mol ⁻¹ |
|---------------------|---------|-------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| HSPC | PBS | - | 52.1 | 54.3 | 3.08 | 42.1 | 48.5 | 50.0 | 1.67 | 0.47 |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:0.1 | 50.4 | 53.6 | 3.40 | 25.4 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:0.5 | 51.4 | 53.9 | 3.06 | 17.8 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:1.0 | 48.8 | 50.8 | 3.90 | 2.7 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:2.0 | 48.8 | 52.3 | 6.23 | 5.6 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:3.0 | 49.3 | 54.2 | 5.36 | 3.0 | - | - | - | - |
| HSPC | Citrate | - | 52.2 | 53.8 | 1.63 | 50.1 | 45.5 | 48.2 | 3.17 | 2.3 |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:0.1 | 50.7 | 53.9 | 3.31 | 29.7 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:0.5 | 51.2 | 54.3 | 3.47 | 26.2 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:1.0 | 48.2 | 50.8 | 5.29 | 12.6 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:2.0 | 48.5 | 51.5 | 6.39 | 6.0 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:3.0 | 48.0 | 52.3 | 6.19 | 2.8 | - | - | - | - |

² T_{onset}: θερμοκρασία στην οποία ξεκινά το θερμικό φαινόμενο; T: θερμοκρασία στην οποία η θερμοχωρητικότητα (ΔC_p heat capacity at constant pressure) είναι μέγιστη; ΔT_{1/2}: το εύρος της θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της κορυφής του θερμικού φαινομένου; ΔH: ενθαλπία μετάβασης κανονικοποιημένη ως προς mol λιποσωμιακού συστήματος. m: κύρια μετάβαση; s: δευτερεύουσα μετάβαση



Εικόνα Γ1: Θερμογράμματα ενδόθερμων φαινομένων διαφορικής θερμιδομετρίας σύρωσης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων με (A) Phosphate buffered saline (pH 7.4) και με (B) Citrate buffer (pH 4.0) στις μοριακές αναλογίες α. 9:0.0, β. 9:0.1, γ. 9:0.5 δ. 9:1.0, ε. 9:2.0 και στ. 9:3.0 molar ratios. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 25 °C έως 60 °C.

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) HSPC διπλοστοιβάδες υφίστανται δύο ενδόθερμες μεταβάσεις φάσεως, στο θερμοκρασιακό εύρος 25 °C έως 60 °C, που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μια ευρεία, πολύ χαμηλής ενθαλπίας, προμετάπτωση από τη φάση της γέλης ($L_{\beta'}$) στη

ρυτιδωμένη φάση ($P_{\beta'}$), στους 50.0 °C και μια οξεία κύρια μετάπτωση από τη ρυτιδωμένη ($P_{\beta'}$) στην υγρή κρυσταλλική (L_a), που επικεντρώνεται στους 54.3 °C. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως στη lamellar κρυσταλλική φάση υπογέλης, οι all-trans διαμορφώσεις των αλυσίδων του στεαρικού οξέος διευθετώνται με περίπου 30° κλίση, ως προς το επίπεδο της διπλοστοιβάδας (Hiroki Kitayama et al., 2014) και ο μακρύς άξονας των κεφαλών φωσφατιδυλοχολίνης διευθετείται παράλληλα με το επίπεδο της μεμβράνης (Koyanova et al., 1998).

Όσον αφορά τις πλήρως ενυδατωμένες σε Citrate buffer (pH 4.0) HSPC διπλοστοιβάδες, υφίστανται δύο ενδόθερμες μεταβάσεις φάσεως σε χαμηλότερες, όμως, θερμοκρασίες (είναι τόσο ανεπαίσθητες, που δε χαρακτηρίζονται ως υστέρηση), αλλά με έναν πολύ πιο ταχύ τρόπο (πιο οξείες κορυφές συγκριτικά με εκείνες σε PBS περιβάλλον). Η μείωση της θερμοκρασίας κύριας μετάπτωσης σημαίνει μείωση της σταθερότητας των μεμβρανών, και συνεπώς μπορεί να σημαίνει διαρροή του πιθανώς ενσωματωμένου (ή εγκλεισμένου) βιοδραστικού μορίου, πριν φτάσει στο στόχο (Chen et al., 2013). Η προμετάπτωση επικεντρώνεται στους 48.2 °C, ενώ η οξεία κορυφή της κύριας μετάπτωσης στους 53.8 °C. Οι θερμοτροπικές παράμετροι της κύριας μετάπτωσης (**Πίνακας Γ1**) είναι πολύ κοντά με τις βιβλιογραφικές τιμές (Li et al., 2015), στις οποίες η θερμοκρασία της κύριας μετάπτωσης των HSPC λιπιδίων σε νερό HPLC καθαρότητας είναι 52 °C.

Η παρουσία PnBA-b-PAA 30/70 επηρεάζει αξιοσημείωτα την ελαφριά κορυφή προμετάπτωσης που αφορά στη μετάβαση των HSPC λιπιδίων από τη φάση γέλης ($L_{\beta'}$) στη ρυτιδωμένη φάση ($P_{\beta'}$). Συγκεκριμένα, η παρουσία πολυμερούς προκαλεί εξαφάνιση της κορυφής προμετάπτωσης, και στα δύο μέσα (**Εικόνα Γ1, Πίνακας Γ1**). Αυτή η εξαφάνιση μπορεί να αποδοθεί στη νέα διεύθετηση που αποκτούν τα HSPC λιπίδια, παρουσία του συμπολυμερούς, η οποία μοιάζει με φάση γέλης, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση ενσωμάτωσης χοληστερόλης σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες. πιθανώς τα HSPC μόρια οργανώνονται σε μια σχεδόν παράλληλη διεύθετηση ως προς το επίπεδο της διπλοστοιβάδας (Chen et al., 2013).

Η ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA 30/70 προκαλεί αλλαγές της θερμοτροπικής συμπεριφοράς των HSPC λιπιδικών διπλοστοιβάδων, επηρεάζοντας εκτενώς την ενθαλπία κύριας μετάπτωσης (ΔH_m) τόσο στο PBS (**Εικόνα Γ1(A)**), όσο και στο Citrate buffer (**Εικόνα Γ1(B)**). Όσο αυξάνεται η μοριακή αναλογία του

συμπολυμερούς, και στα δύο μέσα, η ΔH_m μειώνεται σημαντικά. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει διότι αυξανόμενης της μοριακής αναλογίας του συμπολυμερούς, αυξάνεται η περιστροφική κινητικότητα γύρω από το δεσμό άνθρακα-άνθρακα. Ως εκ τούτου, πιθανώς οι διαμορφώσεις γίνονται πιο αποδιοργανωμένες και ρευστές (fluidlike), το οποίο συνεπάγεται λιγότερη προαπαιτούμενη ενέργεια ως θερμότητα (που μεταφράζεται σε ενθαλπία) για την υπερνίκηση των van der Waals δυνάμεων μεταξύ των HSPC μορίων (ή ενδομοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται μέσα στα ίδια τα HSPC μόρια) (Ceckler et al., 1997). Η θερμοκρασία στην οποία ξεκινά το θερμικό φαινόμενο ($T_{onset,m}$) αλλάζει σημαντικά, κατά $\pm 2-3$ °C σε όλες τις μοριακές αναλογίες των χμαιρικών διπλοστοιβάδων. Αυτή η αλλαγή (αύξηση ή μείωση) είναι περίπου ίδια και στα δύο μέσα. Μόνη εξαίρεση σε αυτό αποτελεί το σύστημα μοριακής αναλογίας 9:3.0, στο οποίο η μείωση της $T_{onset,m}$ είναι μεγαλύτερη στο Citrate buffer, συγκριτικά με τη μείωση που παρατηρείται στο PBS.

Η θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης (T_m) παραμένει λιγότερο ή περισσότερο ανεπηρέαστη και στα δύο μέσα (πιο άκαμπτες-συμπαγείς οι πλήρως ενυδατωμένες σε PBS διπλοστοιβάδες) (**Εικόνα Γ1, Πίνακας Γ1**). Παρόλα αυτά στη μοριακή αναλογία 9:1.0, η μείωση ήταν πιο έντονη (περίπου 3 °C στο Citrate buffer και 3.5 °C στο PBS). Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις του PAA πολυμερικού τμήματος με τα HSPC λιπίδια επηρεάζουν την κινητικότητα των ομάδων των πολικών κεφαλών των λιπιδίων. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό πως το PnBA κομμάτι συμπεριφέρεται ως spacer ανάμεσα στις λιποσωμακές διπλοστοιβάδες, διαχωρίζοντας τις πολικές κεφαλές φωσφατιδυλοχολίνης και μειώνοντας τις van der Waals δυνάμεις μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων (Pirra et al., 2015).

Μεταβαίνοντας σε αυξημένες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς PnBA-b-PAA 30/70, οι τιμές $\Delta T_{1/2}$ αυξάνονται σημαντικά (**Πίνακας 2**), κάτι που υποδεικνύει σημαντική μείωση της συνεργασιμότητας μεταξύ HSPC λιπιδίων και PnBA-b-PAA 30/70. Αυτό μπορεί να είναι συγκρίσιμο με τη μείωση της συνεργασιμότητας που παρατηρείται όταν ενσωματώνονται μόρια χοληστερόλης μέσα σε DPPC διπλοστοιβάδες (Ceckler et al., 1997). Η μόνη μοριακή αναλογία που ελαφρώς παρεκκλίνει αυτής της τάσης είναι η 9:3.0, η οποία παρουσιάζει καλύτερη συνεργασιμότητα (χαμηλότερη τιμή $\Delta T_{1/2}$) συγκριτικά με την αμέσως προηγούμενη μοριακή αναλογία 9:2.0. ανάμεσα στα δύο μέσα που προστέθηκαν για την πλήρη

ενυδάτωση των διπλοστοιβάδων, η αύξηση των τιμών $\Delta T_{1/2}$ είναι μεγαλύτερη στο Citrate buffer. Αυτό συνεπάγεται χειρότερη συνεργασιμότητα των HSPC λιπιδίων και του συμπολυμερούς στο Citrate buffer.

Ένα πρόσθετο στοιχείο που υποδεικνύει άσχημη συνεργασιμότητα είναι η απουσία οξείων κορυφών μετάπτωσης, ιδίως στα τρία συστήματα χημικών διπλοστοιβάδων με τη μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία συμπολυμερούς (Chen et al., 2014).

Είναι προφανές (**Εικόνα Γ1**) πως αυξάνοντας το περιεχόμενο συμπολυμερούς, προκαλείται εμφάνιση shoulders, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως το PnBA-b-PAA 30/70 δεν κατανέμεται ομοιόμορφα μέσα στις HSPC διπλοστοιβάδες, προκαλώντας έτσι διαχωρισμό τους σε τμήματα πλούσια (polymer-rich domains) και φτωγά (polymer-poor domains) ως προς την παρουσία συμπολυμερούς.

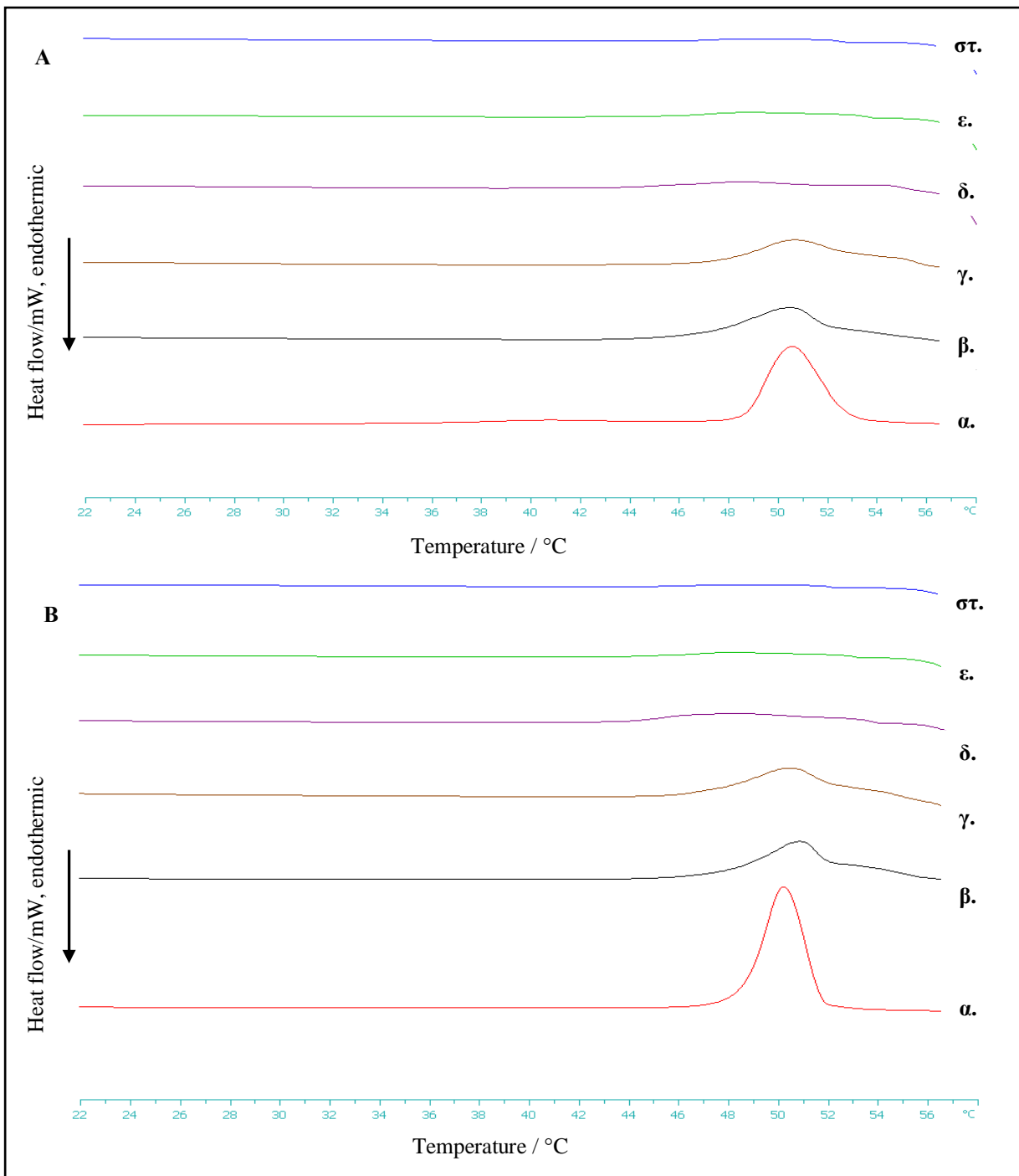
Γενικά, ευρείες κορυφές μετάπτωσης υποδηλώνουν πως πιθανώς η κατανομή των συστατικών των μιγμάτων είναι ετερογενής· περιοχές με μειωμένη παρουσία πολυμερούς χαρακτηρίζονται από υψηλή T_m και οξεία κορυφή, ενώ περιοχές με αυξημένη παρουσία πολυμερούς χαρακτηρίζονται από ευρείες κορυφές (Ohtake et al., 2005).

Οι κορυφές των κύριων μεταπτώσεων στις διπλοστοιβάδες μοριακών αναλογιών 9:1.0, 9:2.0 και 9:3.0 είναι διευρυμένες, κάτι που πιθανώς σχετίζεται με φαινόμενα ρευστοποίησης των διπλοστοιβάδων (solution-like model) (Pippa et al., 2014; Kyrili et al., 2017).

Γ.1.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χημικών διπλοστοιβάδων, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0, σε Phosphate buffered saline (pH 7.4) και σε Citrate buffer (pH 4.0) κατά την ψύξη (Cooling)

Πίνακας Γ2: Θερμοτροπικές παράμετροι φαινομένου ψύξης των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων με Phosphate buffered saline (pH 7.4) και με Citrate buffer (pH 4.0) (Cooling).

| Sample | Buffer | molar ratio | $T_{\text{onset,m}} / ^\circ\text{C}$ | $T_m / ^\circ\text{C}$ | $\Delta T_{1/2,m} / ^\circ\text{C}$ | $\Delta H_m / \text{J mol}^{-1}$ | $T_{\text{onset,s}} / ^\circ\text{C}$ | $T_s / ^\circ\text{C}$ | $\Delta T_{1/2,s} / ^\circ\text{C}$ | $\Delta H_s / \text{J mol}^{-1}$ |
|---------------------|---------|-------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| HSPC | PBS | - | 52.8 | 50.5 | 2.43 | 47.5 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:0.1 | 52.7 | 50.5 | 3.33 | 32.8 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:0.5 | 54.2 | 50.7 | 4.27 | 29.6 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:1.0 | 56.2 | 54.1 | 8.88 | 14.3 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:2.0 | 56.5 | 49.6 | 6.90 | 10.8 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | PBS | 9:3.0 | 56.5 | 51.2 | 8.54 | 7.8 | - | - | - | - |
| HSPC | Citrate | - | 51.7 | 50.2 | 1.84 | 54.8 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:0.1 | 52.6 | 50.8 | 2.72 | 31.5 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:0.5 | 53.3 | 50.4 | 4.17 | 34.5 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:1.0 | 56.5 | 48.5 | 8.14 | 17.3 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:2.0 | 56.5 | 52.1 | 9.45 | 14.0 | - | - | - | - |
| HSPC:PnBA-PAA 30/70 | Citrate | 9:3.0 | 56.5 | 51.5 | 9.24 | 10.0 | - | - | - | - |



Εικόνα Γ2: Θερμογράμματα εξώθερμων φαινομένων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων με (A) Phosphate buffered saline (pH 7.4) και με (B) Citrate buffer (pH 4.0) στις μοριακές αναλογίες α. 9:0.0, β. 9:0.1, γ. 9:0.5 δ. 9:1.0, ε. 9:2.0 και στ. 9:3.0 molar ratios. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 25 °C έως 60 °C.

Όσον αφορά τα θερμογράμματα των εξώθερμων φαινομένων (Εικόνα Γ2) διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 διπλοστοιβάδων, είναι σημαντικό να τονιστούν κάποιες διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών μοριακών αναλογιών. Σε όλες τις μοριακές αναλογίες, καθώς μειώνεται η θερμοκρασία (ψύξη), οι διπλοστοιβάδες υφίσταται μία εξώθερμη

μετάβαση φάσης (τα θερμογράμματα των πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων σε Citrate buffer (pH 4.0) παρουσιάζουν πιο οξείες κορυφές, συγκριτικά με εκείνες που παρουσιάζουν όταν ενυδατώνονται σε PBS (pH 7.4)). Στις μοριακές αναλογίες 9:0.1 και 9:0.5, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης (crystallization) παρέμεινε σχεδόν ίδια με εκείνη των καθαρών HSPC διπλοστοιβάδων, και στα δύο μέσα (**Πίνακας Γ2**). Ωστόσο, στο σύστημα μοριακής αναλογίας 9:1.0 παρατηρείται μια σημαντική αύξηση 3.6 °C στο PBS, ενώ μια μείωση 2.0 °C στο Citrate buffer, συγκριτικά με τις καθарές HSPC διπλοστοιβάδες. Στο σύστημα μοριακής αναλογίας 9:2.0 η θερμοκρασία κρυστάλλωσης παρουσιάζει μια μείωση της τάξης του ενός βαθμού Κελσίου στο PBS, αλλά μια αύξηση 1.9 °C στο Citrate buffer. Τέλος, αναφορικά με το σύστημα μοριακής αναλογίας 9:3.0, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης παραμένει σχεδόν η ίδια (ανεπαίσθητη αύξηση ~1 °C) και στα δύο μέσα.

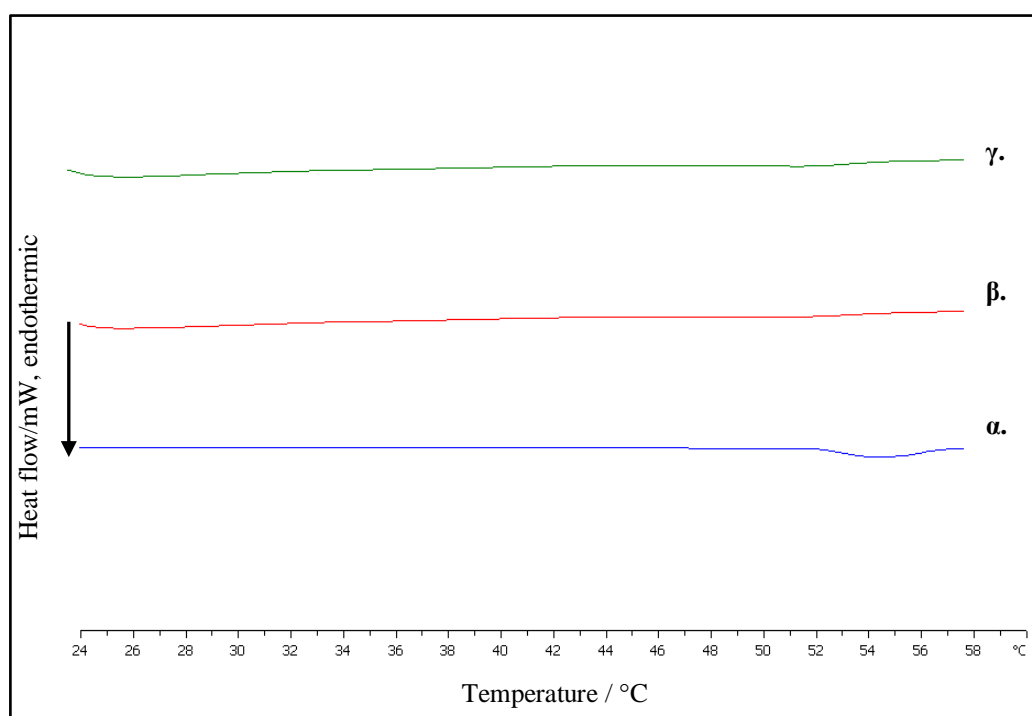
Τόσο στα θερμογράμματα ενδόθερμων φαινομένων (**Εικόνα Γ2(B)**), όσο και στα θερμογράμματα εξώθερμων φαινομένων (**Εικόνα Γ2(A)**), των πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων σε Citrate buffer, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5 και 9:1.0, παρουσιάζονται στην πραγματικότητα δύο κορυφές στα θερμοκρασιακά εύρη τήξεως και κρυστάλλωσης. Αυτές οι δικόρυφες κατανομές ίσως οφείλονται στη δημιουργία μιας νέας φάσης, που πιθανώς συνυπάρχει με την υγρή κρυσταλλική, και μεταφράζονται ως ασυμμετρίες του προφίλ θερμοχωρητικότητας των συστημάτων. Η νέα αυτή φάση πιθανώς αλληλεπιδρά διαφορετικά με το όξινο περιβάλλον (Citrate buffer, pH 4.0), προκαλώντας διαφοροποιήσεις στις θερμοκρασίες τήξεως και κρυστάλλωσης. Σε αυτό το φαινόμενο, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει το pH διότι, σε αντίθεση με το Citrate buffer, τα θερμογράμματα των πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων σε PBS των 9:0.1, 9:0.5 και 9:1.0 μοριακών αναλογιών, δεν παρουσιάζουν δικόρυφη κατανομή, όσον αφορά τα ενδόθερμα φαινόμενα, ενώ για τα εξώθερμα φαινόμενα παρουσιάζεται μια πολύ ελαφριά δικόρυφη κατανομή.

Γ.2. Θερμοτροπική συμπεριφορά των χημικών λιποσωμακών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0

Γ.2.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χημικών λιποσωμακών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0 κατά τη θέρμανση (Heating)

Πίνακας Γ3: Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης των χημικών λιποσωμακών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0

| Μοριακές Αναλογίες HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη | 9:0.0:0.0 | 9:0.1:0.0 | 9:0.1:1.0 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| $T_{\text{onset,m}} (^{\circ}\text{C})$ | 52.1 | 49.0 | 49.0 |
| $T_m (^{\circ}\text{C})$ | 54.3 | 51.9 | 51.8 |
| $\Delta T_{1/2 m} (^{\circ}\text{C})$ | 3.09 | 3.15 | 3.15 |
| $\Delta H_m (\text{J mol}^{-1})$ | 42.7 | 9.0 | 14.5 |



Εικόνα Γ3: Θερμογράμματα ενδόθερμων φαινομένων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης των χημικών λιποσωμακών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες α. 9:0.0:0.0, β. 9:0.1:0.0, γ. 9:0.1:1.0 κατά τη θέρμανση (Heating).

Οι διπλοστοιβάδες αποτελούν τμήμα του λιποσώματος, για αυτό και η διερεύνηση των θερμοτροπικών χαρακτηριστικών των λιποσωμάτων είναι επιβεβλημένη. Λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές των θερμοτροπικών χαρακτηριστικών των διπλοστοιβάδων, καταλήξαμε στη διερεύνηση του χημεικού λιποσωματικού συστήματος HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 μοριακής αναλογίας 9:0.1, καθότι στην περίπτωση των διπλοστοιβάδων παρατηρήθηκε πιο ευδιάκριτη μετάπτωση (~54.0 °C), κατά τη θέρμανση, συγκριτικά με τις υπόλοιπες μοριακές αναλογίες. Παράλληλα, ενσωματώθηκε και η δραστική ουσία Φουροσεμίδη, προκειμένου να διερευνηθεί αν το σύστημα επηρεάζεται αρνητικά ή θετικά, ως προς τη συνεργασιμότητα καινοτόμου εκδόχου-δραστικής ουσίας (διερεύνηση συστήματος HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη 9:0.1:1.0).

Πριν προχωρήσουμε στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων, πρέπει να αιτιολογηθεί η επιλογή του μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την ενυδάτωση των λεπτών λιπιδικών υμενίων και την παρασκευή των κολλοειδών διασπορών. Επιλέχθηκε να γίνει DSC μόνο σε PBS, καθότι η ωσμωτικότητα και η συγκέντρωση των ιόντων του προσομοιάζουν εκείνες στο ανθρώπινο σώμα (ισότονες). Εξάλλου, η χρήση Citrate buffer για την πλήρη ενυδάτωση των διπλοστοιβάδων (πέρα από το PBS) έγινε για να εξεταστεί η πιθανής τροποποίηση στη διαμόρφωση του τμήματος του λιποσώματος, με σκοπό την πρόβλεψη μεταβολής του συστήματος όταν δυνητικά θα προσεγγίσει το όξινο μικροπεριβάλλον του όγκου, της φλεγμονής, κλπ.

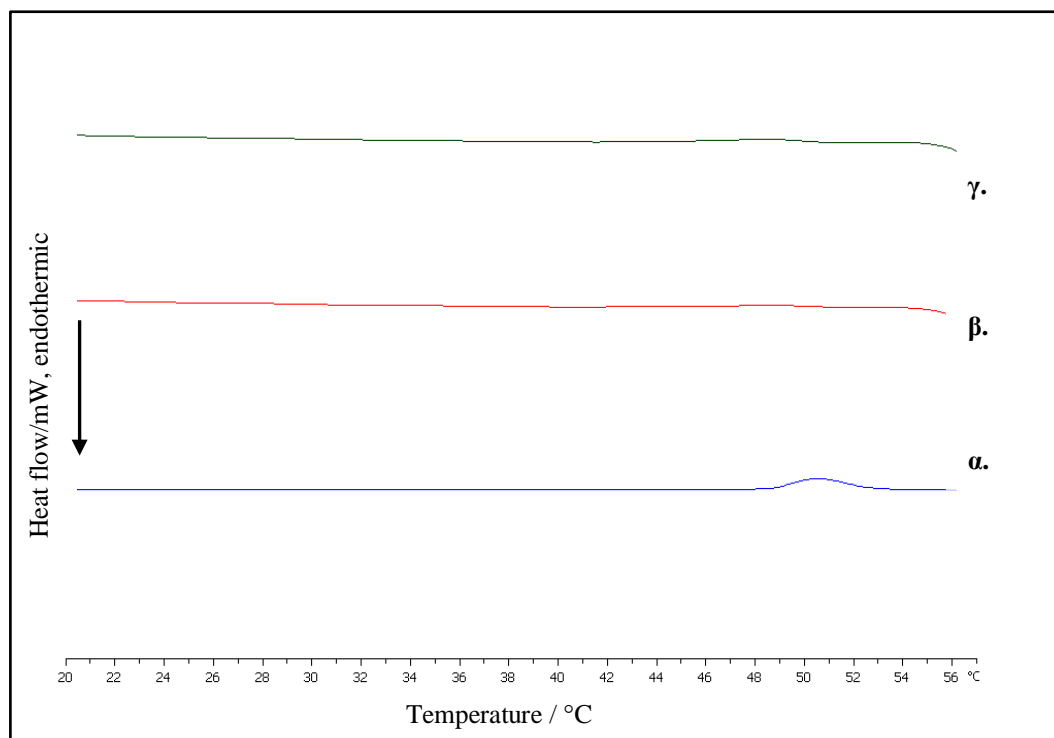
Όσον αφορά τα θερμογράμματα των ενδόθερμων φαινομένων διαφορετικής θερμιδομετρίας σάρωσης των χημεικών λιποσωμακών κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0, είναι προφανές πως η ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA 30/70 προκαλεί σημαντική αλλαγή στη θερμοτροπική συμπεριφορά των HSPC λιποσωμάτων. Πρώτα από όλα, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα Γ3**, οι θερμοκρασίες $T_{onset,m}$ και T_m μειώνονται ελαφρώς στα συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη 9:0.1:0.0 και 9:0.1:1.0, συγκριτικά με εκείνες του HSPC λιποσώματος. Πιθανής εξήγηση, για αυτή τη μικρή μείωση, είναι η παρεμβολή του PnBA block μεταξύ των λιπιδικών αλυσίδων, που ακολούθως αυξάνει τις αποστάσεις των αλυσίδων και οδηγεί σε τήξη σε μικρότερες θερμοκρασίες.

Οι τιμές $\Delta T_{1/2}$ παραμένουν σχεδόν ίδιες, κάτι που υποδεικνύει αντίστοιχη συνεργασιμότητα των υλικών σε όλα τα συστήματα (Chen et al., 2014). Αντίθετα οι τιμές ΔH_m μειώνονται πάρα πολύ. Αυτό μεταφράζεται ως πολύ μικρότερο προαπαιτούμενο ποσό ενέργειας για την υπερνίκηση των των van der Waals δυνάμεων μεταξύ των HSPC μορίων (Ceckler et al., 1997). Είναι εμφανής η ρευστοποίηση της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων, αφού η κορυφή της κύριας μετάπτωσης είναι τόσο διευρυμένη, που παύει να διακρίνεται (**Εικόνα Γ3**). Αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη δημιουργία (solution-like model), καθώς η παρουσία του συμπολυμερούς μάλλον διαδραματίζει ρόλο “πρόσμιξης” (Di Foggia et al., 2016; Tirrell, 1984; Ceckler and Cunningham, 1997; Huang and Li, 1999; Pippa et al., 2014). Το συμπολυμερές τροποποιεί το σχήμα και το μέγεθος της κατανομής των nanoclusters-nanodomains (περιοχές με υψηλή συγκέντρωση PnBA) (Fujiwara et al., 1997; Munaviron et al., 2014), αφού πιθανώς διεισδύει στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας κάνοντάς τη πιο ρευστή.

Γ.2.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών λιποσωμακίων κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0 κατά την ψύξη (Cooling)

Πίνακας Γ4: Θερμοτροπικές παράμετροι ψύξης των χιμαιρικών λιποσωμακίων κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0, 9:0.1:1.0

| Μοριακές Αναλογίες HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη | 9:0.0:0.0 | 9:0.1:0.0 | 9:0.1:1.0 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| $T_{\text{onset,m}} (^{\circ}\text{C})$ | 52.8 | 51.1 | 50.4 |
| $T_{\text{m}} (^{\circ}\text{C})$ | 50.5 | 48.8 | 48.5 |
| $\Delta T_{1/2\text{m}} (^{\circ}\text{C})$ | 2.42 | 2.78 | 3.23 |
| $\Delta H_{\text{m}} (\text{J mol}^{-1})$ | 46.0 | 8.9 | 12.6 |



Εικόνα Γ4: Θερμογράμματα εξώθερμων φαινομένων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης των χιμαιρικών λιποσωμακίων κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, στις μοριακές αναλογίες α. 9:0.0:0.0, β. 9:0.1:0.0, γ. 9:0.1:1.0 κατά την ψύξη (Cooling).

Σχετικά με τα θερμογράμματα των εξώθερμων φαινομένων (Εικόνα Γ4) διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης των χιμαιρικών λιποσωμακίων κολλοειδών διασπορών, σύστασης HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Φουροσεμίδη, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης (crystallization) παρέμεινε σχεδόν ίδια με εκείνη των καθαρών HSPC λιποσωμάτων

(Πίνακας Γ4). Σε όλες τις μοριακές αναλογίες, καθώς μειώνεται η θερμοκρασία (ψύξη), οι διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων υφίσταται μία εξώθερμη μετάβαση φάσης, που στις μοριακές αναλογίες 9:0.1:0.0 και 9:0.1:1.0 εκλείπει πολύ μικρότερο ποσό θερμότητας (μικρότερη τιμή ενθαλπίας, συγκριτικά με τα HSPC λιποσώματα). Επιπλέον, σε αντίθεση με τις τιμές του $\Delta T_{1/2}$ κατά τη θέρμανση, εδώ οι τιμές αυξάνονται, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει μείωση της συνεργασιμότητας των υλικών.

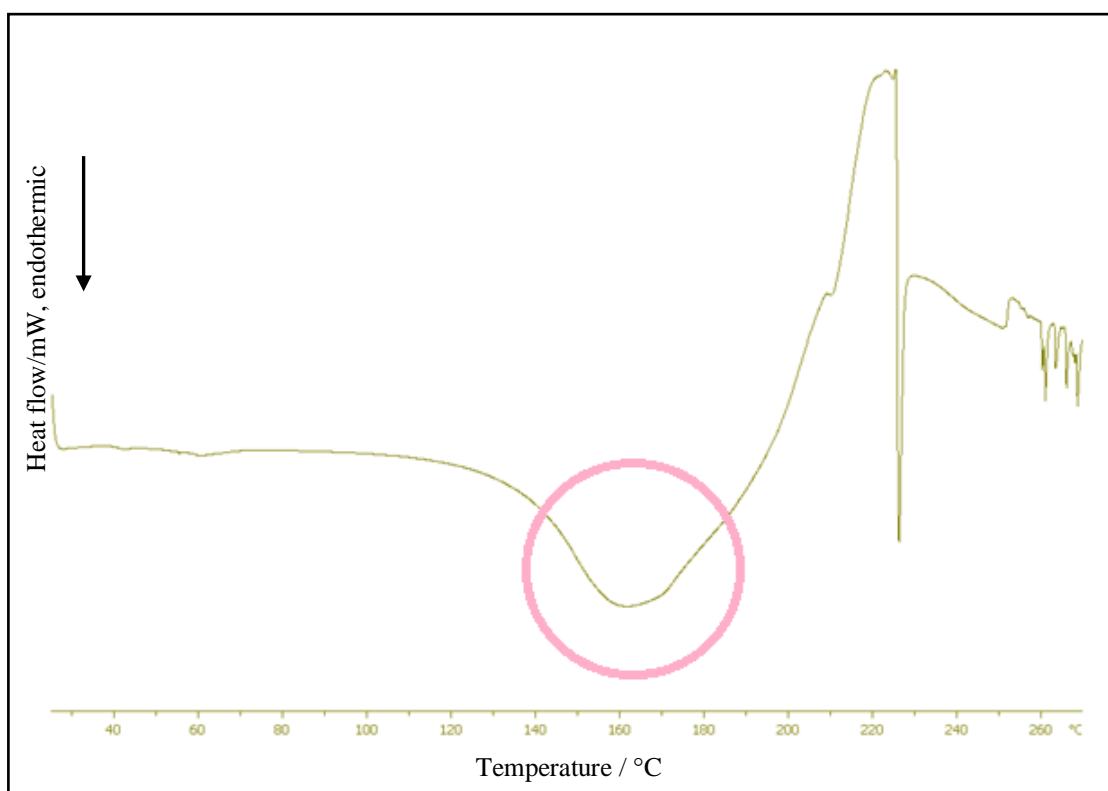
Από τα άνωθεν θερμογράμματα (Εικόνες Γ3, Γ4), αλλά και τα θερμοτροπικά χαρακτηριστικά τους (Πίνακες Γ3, Γ4), παρέχονται χρήσιμες λεπτομέρειες σχετικά με τη συνεργασιμότητα των υλικών, τη θερμική τους σταθερότητα (που μπορεί να επεκταθεί σε επίπεδο επίδρασης κινητικής αποδέσμευσης του δραστικού μορίου) που μπορούν να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν στα πρώτα στάδια προμορφοποίησης και ανάπτυξης των φαρμάκων (Demetzos, 2015; Pippa et al., 2016).

Γ.3. Θερμοτροπική συμπεριφορά των κλαστικών εκδόχων στερεάς κατάστασης Αλγινικό Νάτριο, Στεατικό Μαγνήσιο, Μονοϋδρική Λακτόζη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη χαμηλού μοριακού βάρους (PVP MW:10,000 και MW:29,000), Πολυβινυλοπυρρολιδόνη υψηλού μοριακού βάρους (PVP MW:55,000), Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000 και της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης

Γ.3.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Αλγινικού Νατρίου

Πίνακας Γ5: Θερμοτροπικές παράμετροι αφυδάτωσης Αλγινικού Νατρίου

| | |
|---|-------|
| $T_{\text{onset,Dehydration}} (^{\circ}\text{C})$ | 129.5 |
| $T_{\text{Dehydration}} (^{\circ}\text{C})$ | 166.3 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Dehydration}} (^{\circ}\text{C})$ | 54.92 |
| $\Delta H_{\text{Dehydration}} (\text{J mol}^{-1})$ | 383.6 |



Εικόνα Γ5: Θερμόγραμμα Αλγινικού Νατρίου.

Όπως φαίνεται από την **Εικόνα Γ5** και τον **Πίνακα Γ5**, το Αλγινικό Νάτριο παρουσιάζει ένα ενδόθερμο φαινόμενο στο θερμοκρασιακό εύρος ~120-190 °C, με κέντρο τους 166.3 °C. Αυτή η ευρεία κορυφή είναι χαρακτηριστική εικόνα του

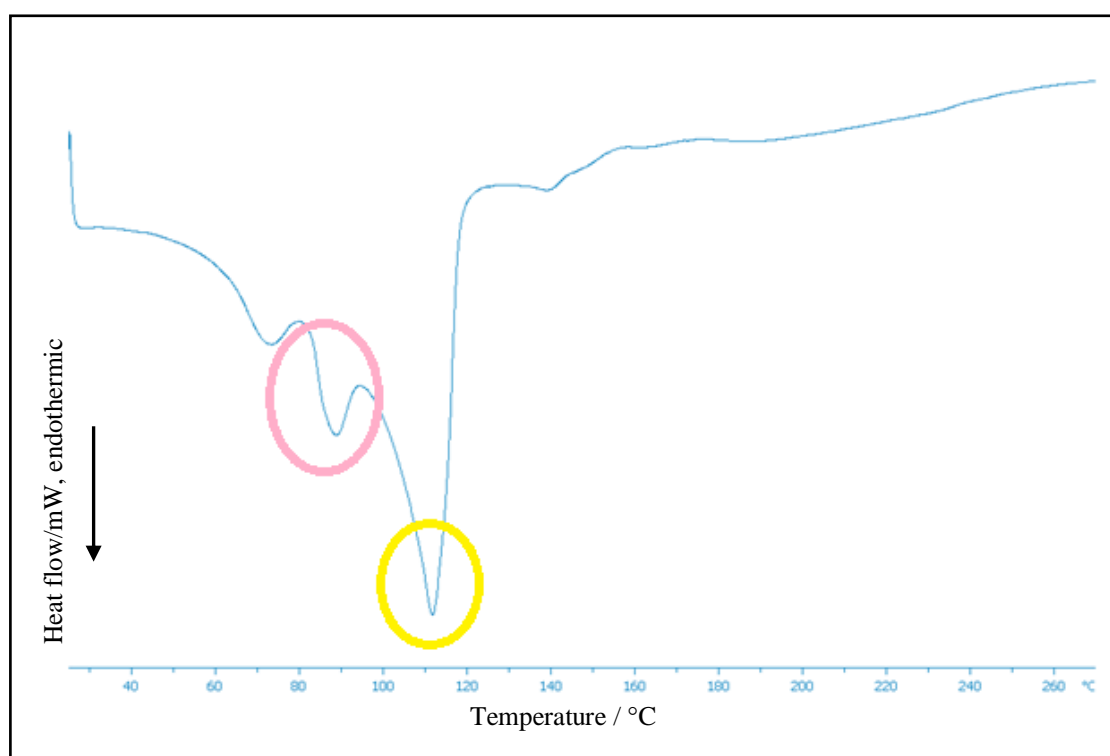
φαινομένου αφυδατώσεως που πραγματοποιείται αρχικά, κατά τη θέρμανση του Αλγινικού Νατρίου, σε N_2 ατμόσφαιρα, και αποδίδεται στις πολλές υδρόφιλες ομάδες που περιέχονται στο μόριο αυτού του βιοπολυμερούς. Παρά το γεγονός πως η ουσία τοποθετήθηκε προς εξέταση σε ξηρή μορφή, ωστόσο έχει κάποιο ποσοστό υγρασίας, ως φαίνεται. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, παρατηρείται η εικόνα αρκετών κορυφών εξώθερμων (ξεκινά περίπου στους $200\text{ }^\circ\text{C}$), που υποδεικνύουν τη σταδιακή αποσύνθεση του μορίου.

Αυτές οι θερμοτροπικές παράμετροι συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται, πως όταν το Αλγινικό Νάτριο θερμαίνεται σε N_2 ατμόσφαιρα, παρουσιάζει μια ενδόθερμη κορυφή (αφυδάτωση) κοντά στους $100\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ ακολουθείται από εξώθερμη κορυφή (αποσύνθεση) που αναλόγως του ρυθμού θέρμανσης, εντοπίζεται περίπου στους $240\text{-}260\text{ }^\circ\text{C}$. Τέλος, λόγω περιορισμού θερμοκρασιακού εύρους που μπορούσε να αντέξει το Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης Ροής Θερμότητας που χρησιμοποιήθηκε, δεν μπορέσαμε να δούμε πως μετά τους $300\text{ }^\circ\text{C}$, ξεκινά και η αποσύνθεση της ανθρακικής αλυσίδας (Soares et al., 2004).

Γ.3.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Στεατικού Μαγνησίου

Πίνακας Γ6: Θερμοτροπικές παράμετροι αφυδάτωσης Στεατικού Μαγνησίου

| | |
|---|-------|
| $T_{\text{onset, Dehydration1}}$ (°C) | 83.4 |
| $T_{\text{Dehydration1}}$ (°C) | 88.4 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Dehydration1}}$ (°C) | 6.68 |
| $\Delta H_{\text{Dehydration1}}$ (J mol ⁻¹) | 7.6 |
| $T_{\text{onset, Dehydration2}}$ (°C) | 96.1 |
| $T_{\text{Dehydration2}}$ (°C) | 111.8 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Dehydration2}}$ (°C) | 16.99 |
| $\Delta H_{\text{Dehydration2}}$ (J mol ⁻¹) | 181.4 |



Εικόνα Γ6: Θερμόγραμμα Στεατικού Μαγνησίου.

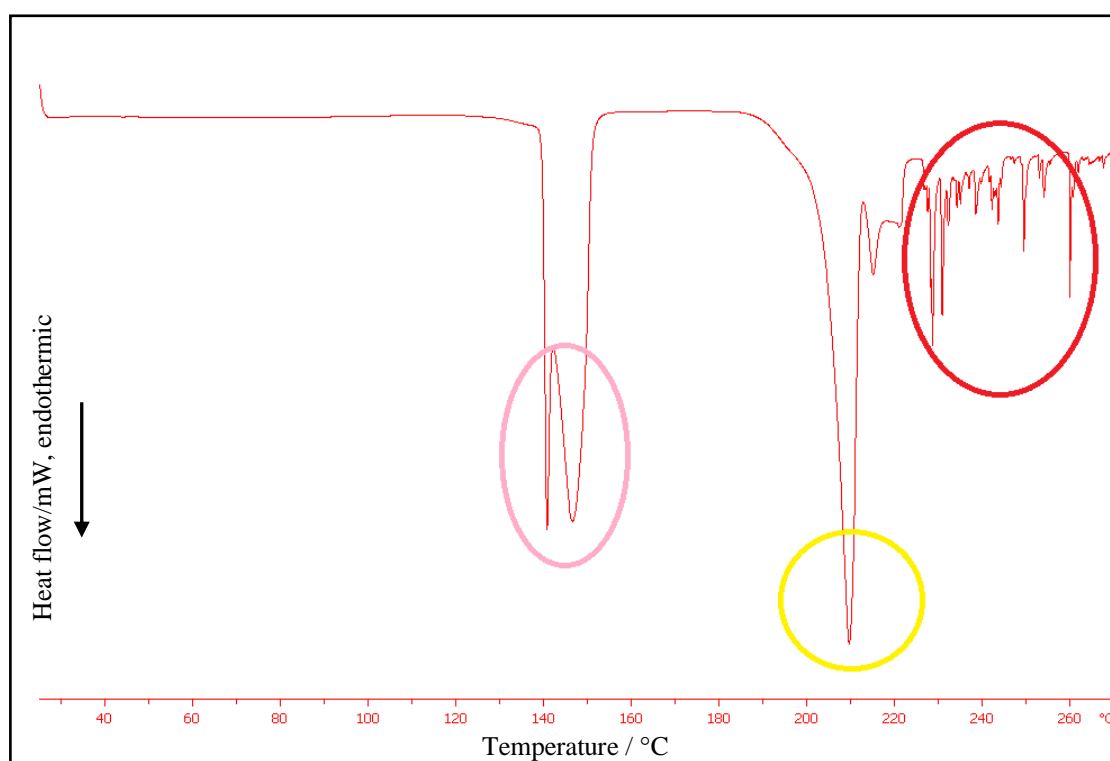
Όπως φαίνεται από την **Εικόνα Γ6** και τον **Πίνακα Γ6**, το Στεατικό Μαγνήσιο παρουσιάζει δύο ενδόθερμα φαινόμενα στο θερμοκρασιακό εύρος ~90-120 °C, με κέντρα τους 88.4 °C και τους 111.8 °C. Αυτές οι κορυφές αποδίδονται σε διαδοχικά συμβάντα απώλειας προσροφημένων μορίων δομικού νερού (η κίτρινη κορυφή πιθανώς αφορά τήξη του στεατικού μαγνησίου), και έρχονται σύμφωνες με τη βιβλιογραφία (Rus et al., 2002; Lima et al., 2014; Wang et al., 2014; Teleginski et al., 2015; Marian et al., 2015). Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, παρατηρείται και ένα

πολύ μικρό ενδόθερμο peak, το οποίο πιθανώς οφείλεται στη μικρή ποσότητα magnesium palmitate, που ίσως συνυπάρχει (Chaves et al., 2013). Η αποσύνθεση του μορίου, βάσει βιβλιογραφίας, ξεκινά μετά τους 200 °C, αλλά όπως προαναφέρθηκε, λόγω περιορισμού θερμοκρασιακού εύρους που μπορούσε να αντέξει το Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης Ροής Θερμότητας που χρησιμοποιήθηκε, δεν μπορέσαμε να δούμε τις κορυφές αυτές.

Γ.3.3 Θερμοτροπική συμπεριφορά της Μονοϋδρικής Λακτόζης

Πίνακας Γ7: Θερμοτροπικές παράμετροι αφυδάτωσης και τήξης Μονοϋδρικής Λακτόζης

| | |
|--|-------|
| $T_{\text{onset,Dehydration}}$ (°C) | 142.9 |
| $T_{\text{Dehydration}}$ (°C) | 147.0 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Dehydration}}$ (°C) | 5.10 |
| $\Delta H_{\text{Dehydration}}$ (J mol ⁻¹) | 18.6 |
| $T_{\text{onset,Melting}}$ (°C) | 204.5 |
| T_{Melting} (°C) | 209.8 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Melting}}$ (°C) | 4.78 |
| $\Delta H_{\text{Melting}}$ (J mol ⁻¹) | 143.1 |



Εικόνα Γ7: Θερμόγραμμα Μονοϋδρικής Λακτόζης.

Η Μονοϋδρική Λακτόζη παρουσιάζει τις δύο χαρακτηριστικές κορυφές των ενδόθερμων φαινομένων που συμβαίνουν στο μόριό της, όταν αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, με κέντρο τους 147.0 °C (Πίνακας Γ7) πραγματοποιείται η αφυδάτωση του δισακχαρίτη, κατά την οποία αποβάλλονται τα μόρια ύδατος κρυσταλλοποίησης (Lavor et al., 2014). Στους 209.8 °C παρατηρείται μια οξεία ενδόθερμη κορυφή, η οποία συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Rus et al., 2002; Júlio et al., 2013; Chaves et al., 2013; Marinescu et al., 2013; Lima et al., 2014;

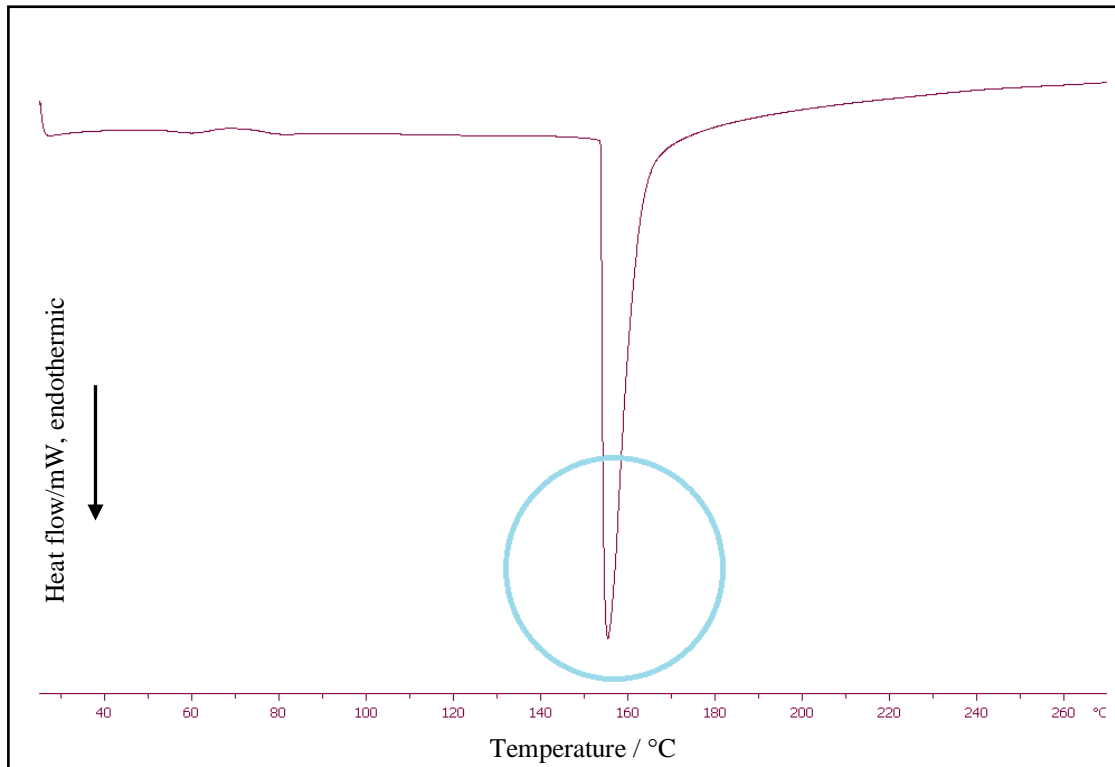
Teleginski et al., 2015; Pires et al., 2014) που αναφέρει πως περίπου στο διάστημα 200-225 °C πραγματοποιείται η τήξη της β-λακτόζης (fusion) του μορίου. Τέλος, κατευθείαν μετά από αυτό το ενδόθερμο φαινόμενο, ακολουθεί η θερμική αποσύνθεση της β-λακτόζης, που χαρακτηρίζεται ως καραμελοποίηση (caramelization).

Γ.3.4 Θερμοτροπική συμπεριφορά Πολυβινυλοπυρρολιδονών (PVP) διαφορετικών μοριακών βαρών

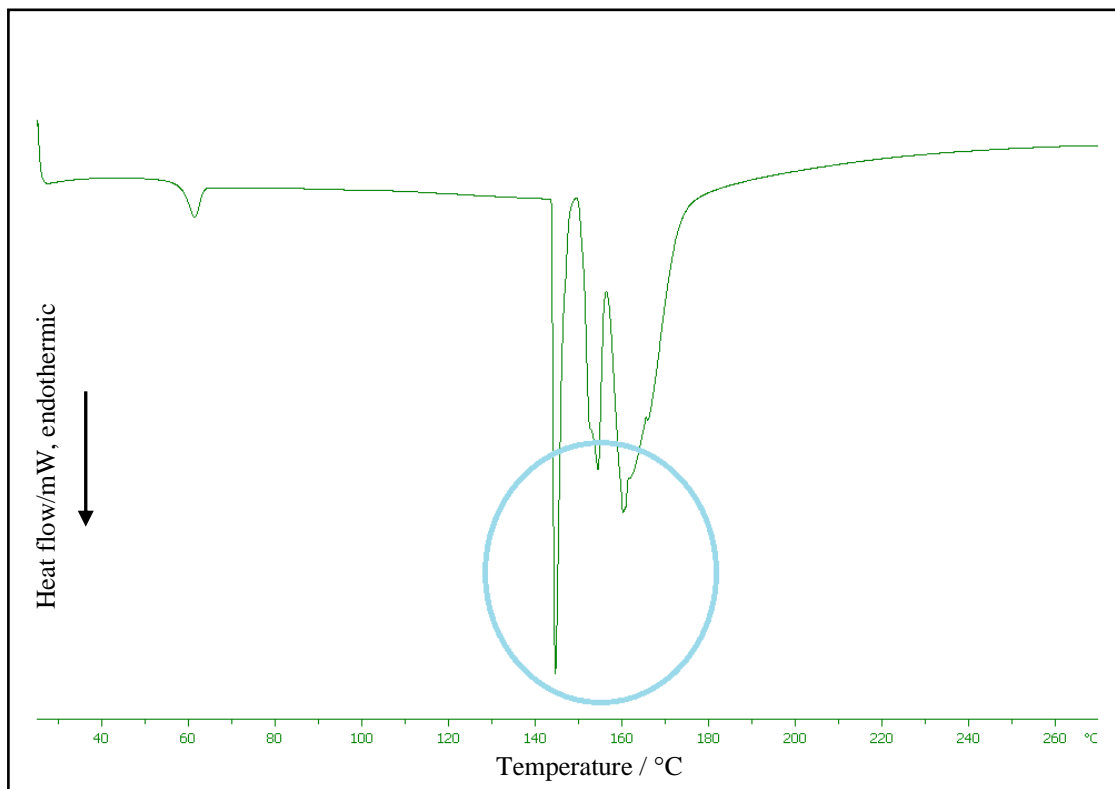
Τα θερμογράμματα του συνδετικού κολλοειδούς Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), μοριακών βαρών MW:10,000, MW:29,000 και MW:55,000 έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Rus et al., 2012; Chaves et al., 2013; Li et al., 2015; Teleginski et al., 2015), στην οποία διατυπώνεται πως η υαλώδης μετάπτωση των PVP εντοπίζεται σε θερμοκρασιακό εύρος 150-180 °C, ανάλογα και με το μοριακό βάρος. Έτσι, η PVP MW:10,000 παρουσιάζει υαλώδη μετάπτωση με κέντρο τους 155.5 °C (Πίνακας Γ8, Εικόνα Γ8), η PVP MW:29,000 τους 144.8 °C (ίσως οι αρκετές κορυφές στο εύρος 145-160 °C υποδηλώνουν πως συνυπάρχουν PVP και άλλων μοριακών βαρών) (Πίνακας Γ8, Εικόνα Γ9) και η PVP MW:55,000 με μια διευρυμένη κορυφή περίπου στους 120 °C (Πίνακας Γ8, Εικόνα Γ10).

Πίνακας Γ8: Θερμοτροπικές παράμετροι υαλώδων μεταπτώσεων Πολυβινυλοπυρρολιδόνης χαμηλού μοριακού βάρους MW:10,000, χαμηλού μοριακού βάρους MW:29,000 και υψηλού μοριακού βάρους MW:55,000

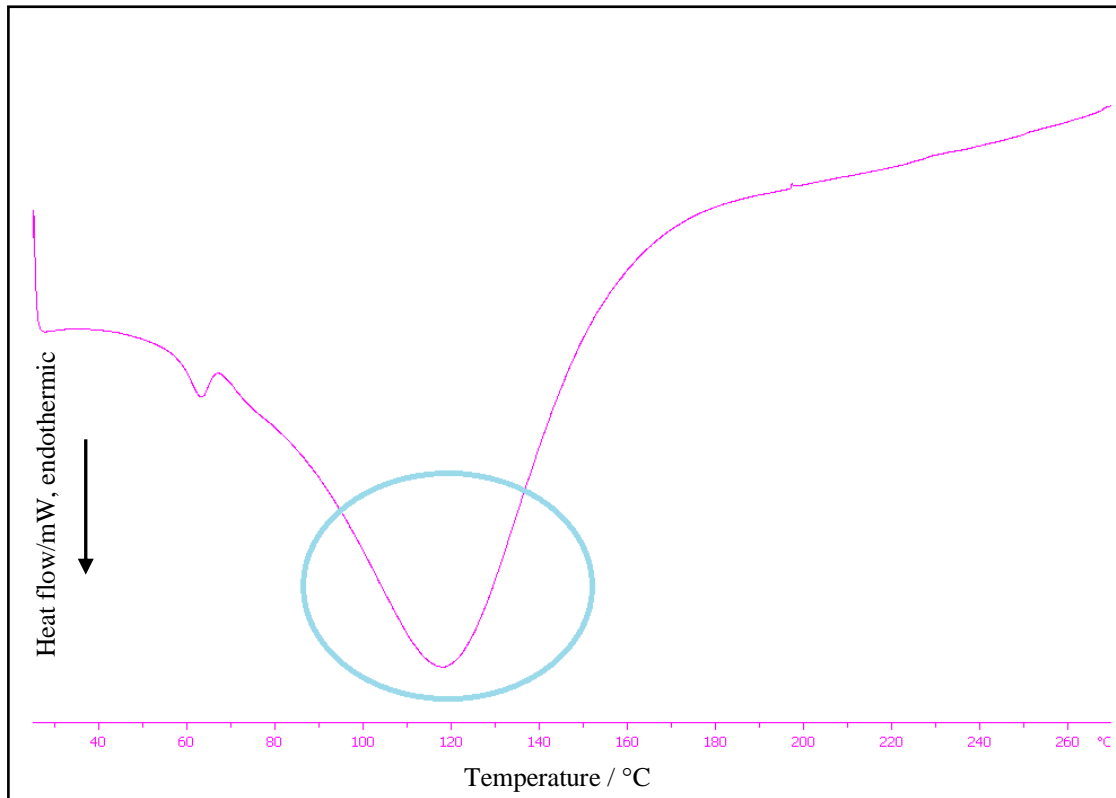
| | | |
|--------------------------|--|-------|
| PVP MW:10,000 | $T_{\text{onset,Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 153.8 |
| | $T_{\text{Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 155.5 |
| | $\Delta T_{1/2 \text{ Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 5.47 |
| | $\Delta H_{\text{Glass transition}} (\text{J mol}^{-1})$ | 141.4 |
| PVP MW:29,000 | $T_{\text{onset,Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 143.8 |
| | $T_{\text{Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 144.8 |
| | $\Delta T_{1/2 \text{ Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 1.71 |
| | $\Delta H_{\text{Glass transition}} (\text{J mol}^{-1})$ | 171.7 |
| PVP MW:55,000 | $T_{\text{onset,Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 71.5 |
| | $T_{\text{Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 118.7 |
| | $\Delta T_{1/2 \text{ Glass transition}} (^{\circ}\text{C})$ | 49.14 |
| | $\Delta H_{\text{Glass transition}} (\text{J mol}^{-1})$ | 237.0 |



Εικόνα Γ8: Θερμόγραμμα Πολυβινυλοπυρρολιδόνης χαμηλού μοριακού βάρους MW:10,000.



Εικόνα Γ9: Θερμόγραμμα Πολυβινυλοπυρρολιδόνης χαμηλού μοριακού βάρους MW:29,000.



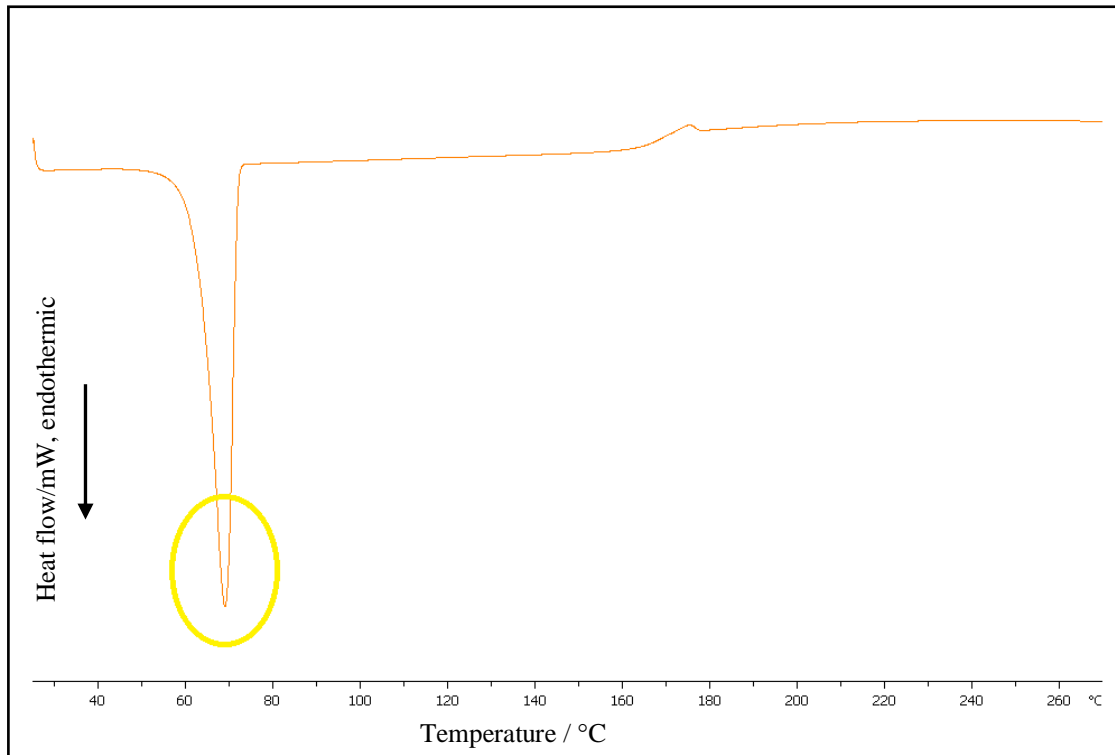
Εικόνα Γ10: Θερμόγραμμα Πολυβινυλοπυρρολιδόνης υψηλού μοριακού βάρους MW:55,000.

Γ.3.5 Θερμοτροπική συμπεριφορά του Πολυαιθυλενοξειδίου διαφορετικών μοριακών βαρών

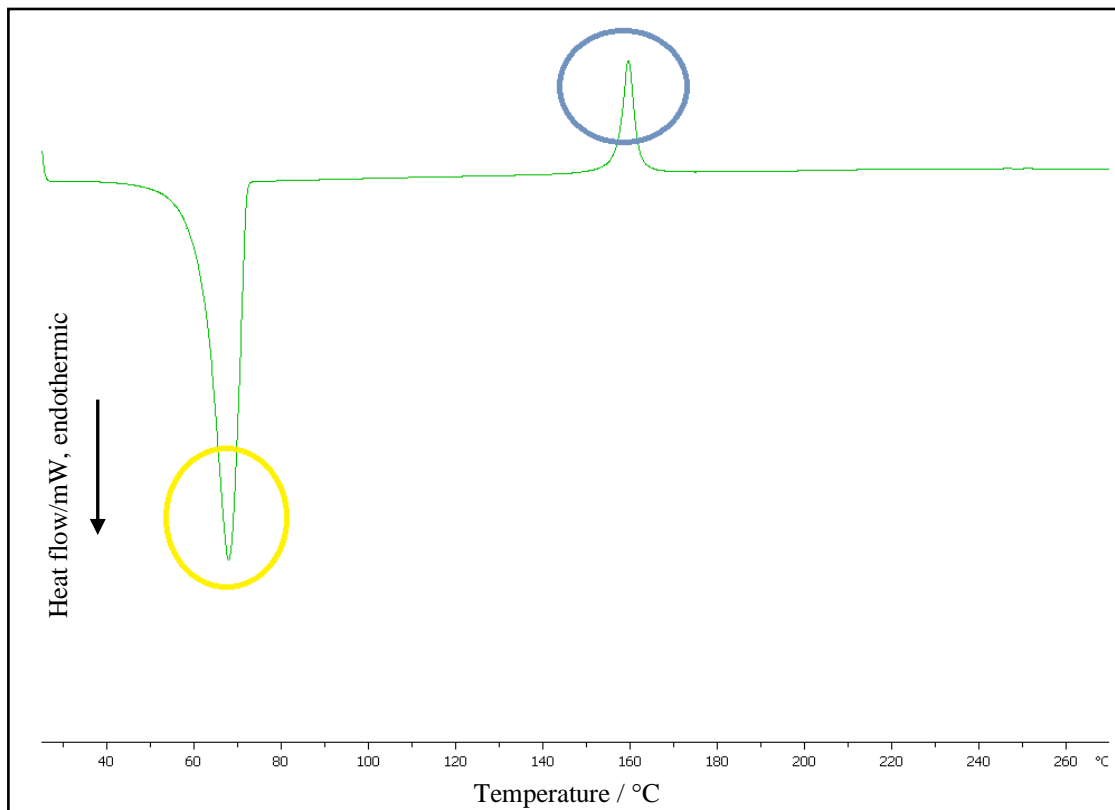
Τα Πολυαιθυλενοξείδια MW:4,000,000 και MW:7,000,000 καθώς θερμαίνονται, εμφανίζουν ένα ενδόθερμο φαινόμενο, που επικεντρώνεται στους 69.1 °C και 68.0 °C, αντίστοιχα (Πίνακας Γ9). Πρόκειται για την οξεία κορυφή που περιγράφει την τήξη των πολυμερών αυτών. Είναι γενική αρχή πως για τα Πολυαιθυλενοξείδια ο ρυθμός θέρμανσης που επιλέγεται κατά την DSC, να καθορίζει το σημείο τήξης τους· αν αυξηθεί ο ρυθμός θέρμανσης, τότε αυξάνεται η θερμοκρασία που τήκεται το πολυμερές (Craig, 1995; Pielichowski, 2002). Πιθανόν, λοιπόν, αν είχαμε χρησιμοποιήσει ρυθμό θέρμανσης μεγαλύτερο από 5 °C min⁻¹, οι κορυφές να εντοπίζονταν σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Έχει αναφερθεί πως όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος των Πολυαιθυλενοξειδίων, αυξάνεται και η ποσότητα θερμότητας που απαιτείται για να τακούν (ενθαλπία), καθώς παρουσιάζουν τα Πολυαιθυλενοξείδια μεγαλύτερη τάση για κρυστάλλωση και υψηλότερο βαθμό κρυστάλλωσης (Pielichowski and Flejtuch, 2002). Ωστόσο, αυτός ο κανόνας πάυει να ισχύει από το PEO MW:20,000. Αυτός είναι και ο λόγος που τα στερεά Πολυαιθυλενοξείδια MW:4,000,000 και MW:7,000,000, που εξετάστηκαν, τήκονται σε παρόμοια θερμοκρασία. Τέλος, παρατηρείται και στα δύο Πολυαιθυλενοξείδια, MW:4,000,000 και MW:7,000,000, ένα εξώθερμο συμβάν, σε θερμοκρασία 180 °C και 160 °C, αντίστοιχα. Πιθανώς σε εκείνο το σημείο να συμβαίνει αποσύνθεση των μορίων και σχηματισμός φορμικού εστέρα (Seongok et al., 1994).

Πίνακας Γ9: Θερμοτροπικές παράμετροι τήξης Πολυαιθυλενοξειδίου MW:4,000,000 και MW:7,000,000

| | | |
|-----------------------------|--|-------|
| PEO MW:4,000,000 | T_{onset,Melting} (°C) | 62.8 |
| | T_{Melting} (°C) | 69.1 |
| | ΔT_{1/2 Melting} (°C) | 5.35 |
| | ΔH_{Melting} (J mol⁻¹) | 144.2 |
| PEO MW:7,000,000 | T_{onset,Melting} (°C) | 61.3 |
| | T_{Melting} (°C) | 68.0 |
| | ΔT_{1/2 Melting} (°C) | 6.34 |
| | ΔH_{Melting} (J mol⁻¹) | 152.0 |

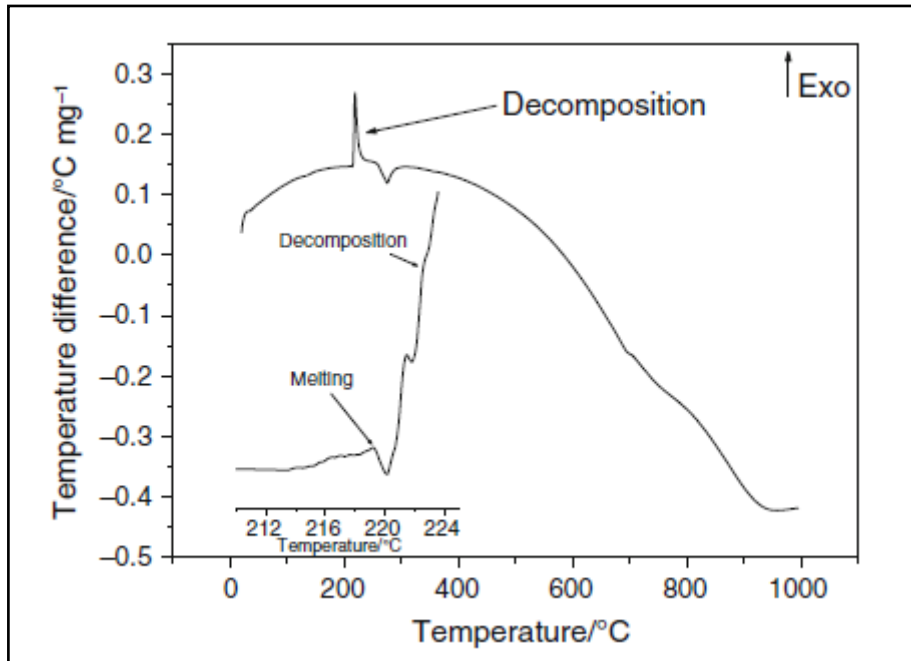


Εικόνα Γ11: Θερμόγραμμα Πολυαιθυλενοξειδίου MW:4,000,000.

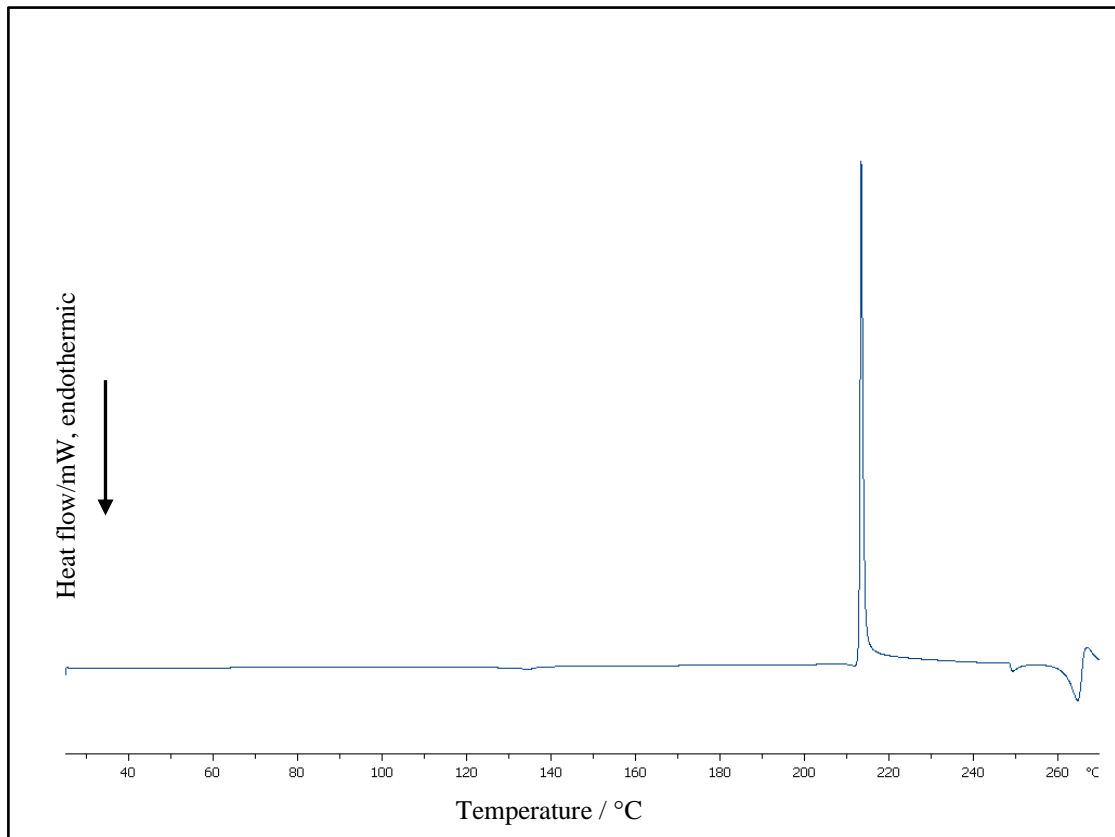


Εικόνα Γ12: Θερμόγραμμα Πολυαιθυλενοξειδίου MW:7,000,000.

Γ.3.6 Θερμοτροπική συμπεριφορά της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης

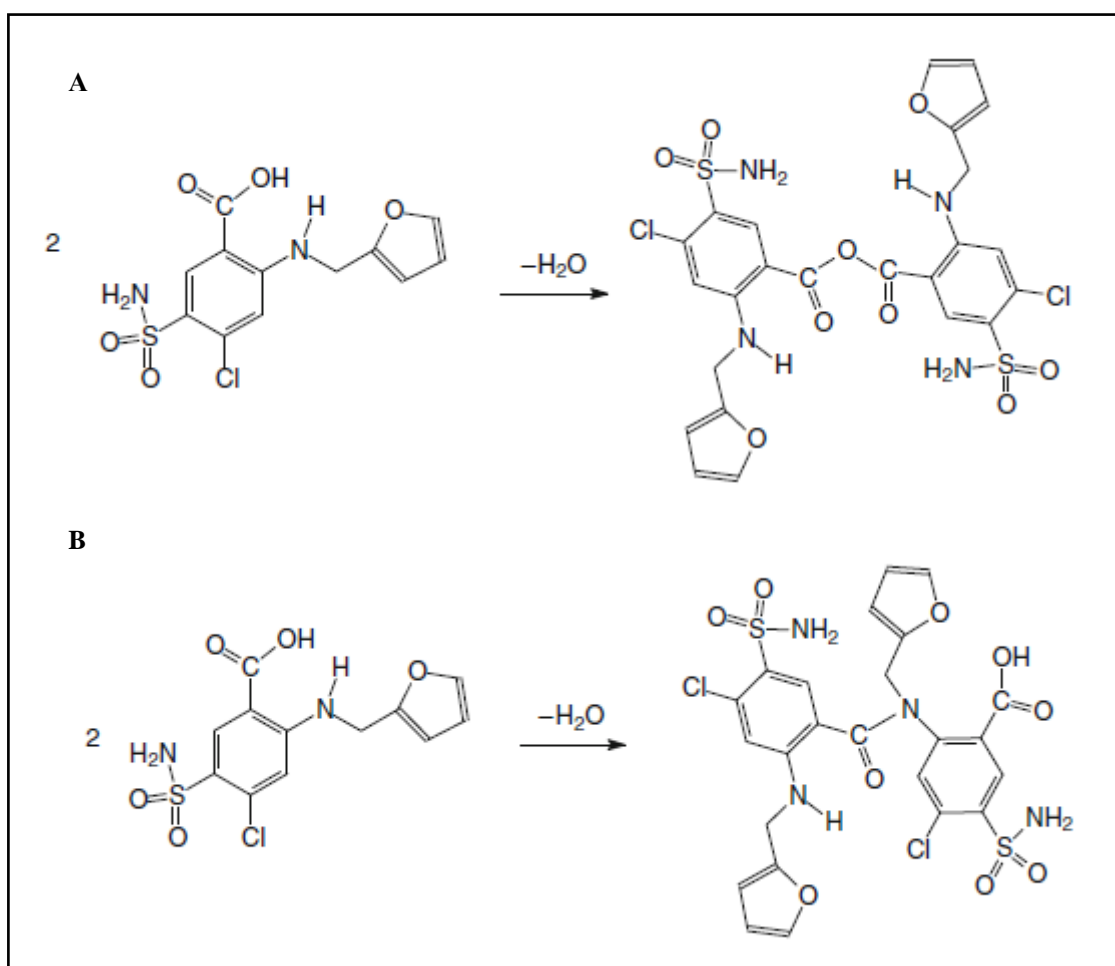


Εικόνα Γ13: Λεπτομέρως θερμόγραμμα DTA και DSC Φουροσεμίδης (Cássia and Semaan, 2013).



Εικόνα Γ14: Θερμόγραμμα Φουροσεμίδης.

Η Φουροσεμίδα που εξετάστηκε συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Cássia and Semaan, 2013), όσον αφορά τις θερμοτροπικές της παραμέτρους. Πιο αναλυτικά, τήκεται κοντά στους 219 °C, χωρίς όμως να είναι τόσο εύκολα εμφανές αυτό το ενδόθερμο φαινόμενο, αφού αμέσως μετά λαμβάνει χώρα μία πρώτη οξεία εξώθερμη διαδικασία (**Εικόνα Γ14**). Η εξώθερμη αυτή διαδικασία είναι η αποσύνθεση της Φουροσεμίδης και ακολούθως ο σχηματισμός είτε ανυδρίτη, με διμερισμό ($\Delta H_{\text{dimerization}}=98.8 \text{ J mol}^{-1}$) (**Εικόνα Γ15(A)**), είτε αμιδίου (**Εικόνα Γ15(B)**), με εξάτμιση ($\Delta H_{\text{evaporation}}=98.8 \text{ J mol}^{-1}$). Στην **Εικόνα Γ13**, όπου μεγεθύνεται το κομμάτι των δύο αυτών φαινομένων, μπορούμε και οπτικά να δούμε την κορυφή που αντιπροσωπεύει την τήξη της Φουροσεμίδης.



Εικόνα Γ15: Αφυδάτωση δύο μορίων Φουροσεμίδης και σχηματισμός (A) ανυδρίτη ή (B) αμιδίου (Cássia and Semaan, 2013).

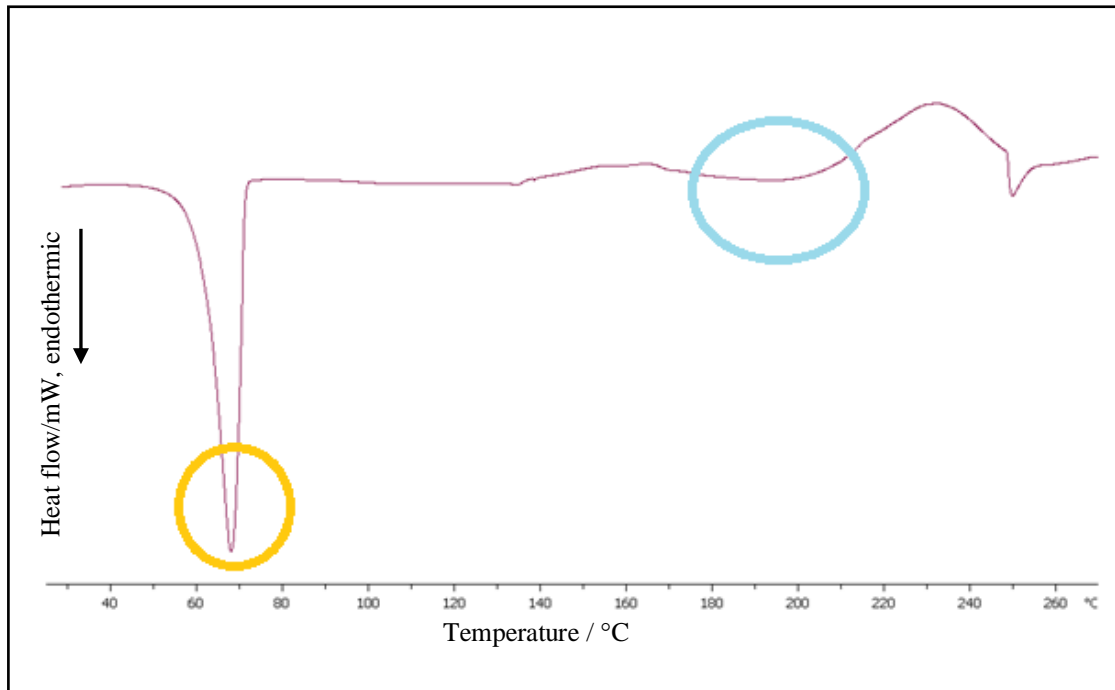
Γ.4. Θερμοτροπική συμπεριφορά των μιγμάτων κλασσικών εκδόχων στερεάς κατάστασης – δραστικής ουσίας Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξειδίο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξειδίο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000): Αλγινικό Νάτριο: Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01

Οι θερμοτροπικές ιδιότητες μιγμάτων αποτελούν ένα “άθροισμα” των ξεχωριστών συστατικών τους, μόνο αν τα συστατικά αυτά είναι συμβατά μεταξύ τους. Στην περίπτωση που υπάρχει ασυμβατότητα μεταξύ των συστατικών ενός μίγματος, είτε θα απουσιάζει/εξαφανίζεται μια κορυφή (που στο “καθαρό” συστατικό προϋπήρχε), είτε θα αλλάζει σημαντικά το μέγεθος της κορυφής, είτε θα εμφανίζεται ένα καινούργιο ενδόθερμο ή εξώθερμο συμβάν (νέα κορυφή). Εν τούτοις, ακόμη και στην περίπτωση συμβατότητας των συστατικών, είναι πιθανό να παρατηρηθούν μικρές αλλαγές στο σχήμα, το ύψος και το εύρος των κορυφών, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν αναμενόμενες, εξαιτίας πιθανών αλλαγών στη γεωμετρία των στοιχείων του μίγματος. Όταν παρατηρηθούν από DSC αποτελέσματα στοιχεία πιθανής ασυμβατότητας, καλό θα είναι να εφαρμόζονται κι άλλες μέθοδοι, προκειμένου να καταλήγουμε σε βέβαιο συμπέρασμα αποδοχής ή απόρριψης της ασυμβατότητας (Lavor et al., 2014).

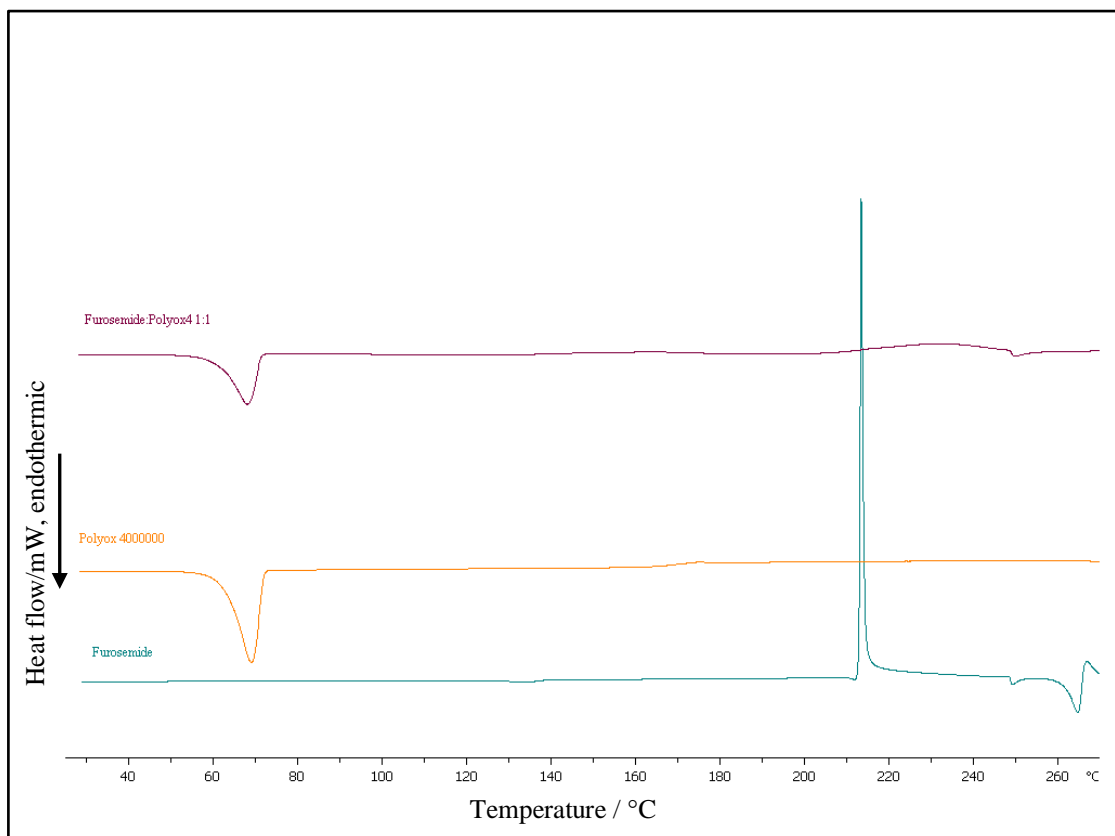
Γ.4.1 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξειδίο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0

Πίνακας Γ10: Θερμοτροπικές παράμετροι μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξειδίο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0

| | |
|---|-------|
| $T_{\text{onset, Polyox4}}$ (°C) | 61.5 |
| T_{Polyox4} (°C) | 68.2 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Polyox4}}$ (°C) | 5.91 |
| $\Delta H_{\text{Polyox4}}$ (J mol ⁻¹) | 85.7 |
| $T_{\text{onset, Furosemide}}$ (°C) | 166.3 |
| $T_{\text{Furosemide}}$ (°C) | 196.3 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Furosemide}}$ (°C) | 33.92 |
| $\Delta H_{\text{Furosemide}}$ (J mol ⁻¹) | 29.3 |



Εικόνα Γ16: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0.



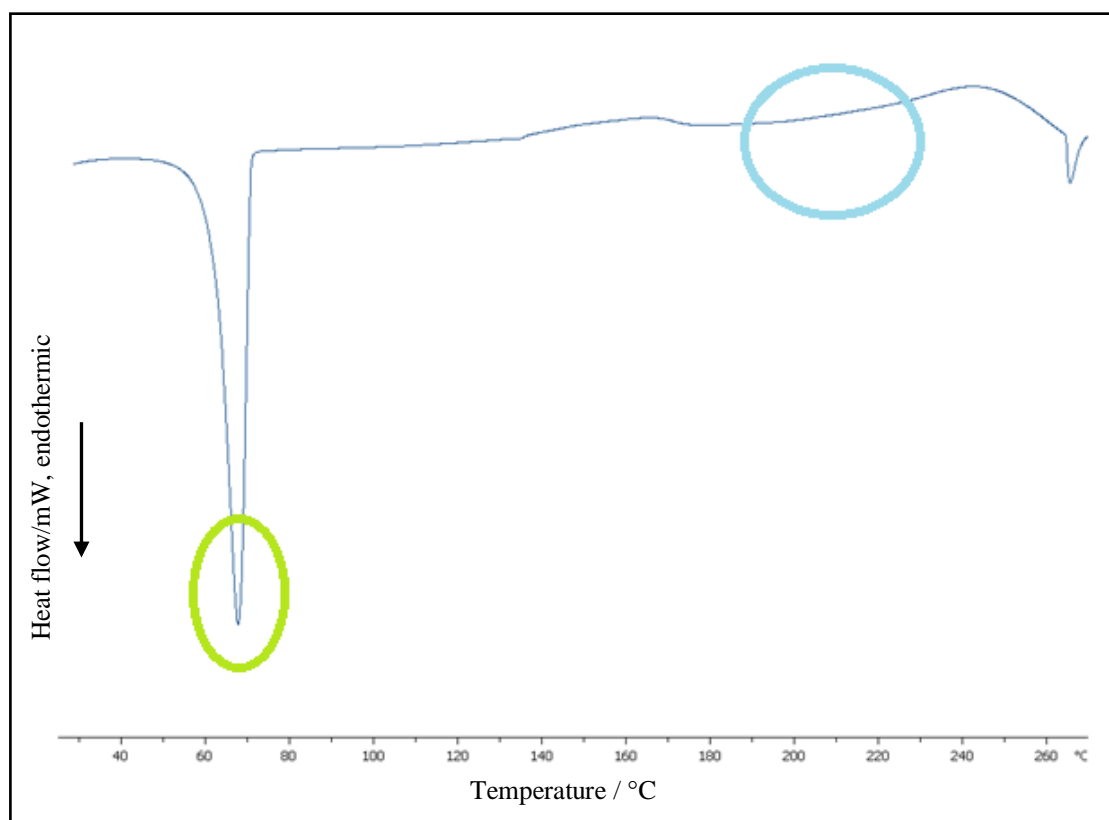
Εικόνα Γ17: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, εν συγκρίσει με τα θερμογράμματα των επιμέρους συστατικών του.

Το θερμόγραμμα του μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, δείχνει πως τα δύο αυτά υλικά, δραστική ουσία και έκδοχο, παρουσιάζουν συμβατότητα και δεν υπάρχει θερμικώς προκαλούμενη αλληλεπίδρασή τους. Οι θερμοτροπικές παράμετροι του μίγματος (**Πίνακας Γ10**) ταυτίζονται με τις τιμές που παρουσίασαν τα επιμέρους συστατικά, όταν αναλύθηκαν μόνα τους (ανεπαίσθητες διαφορές, που αποδίδονται στα νέα χαρακτηριστικά γεωμετρίας του μίγματος).

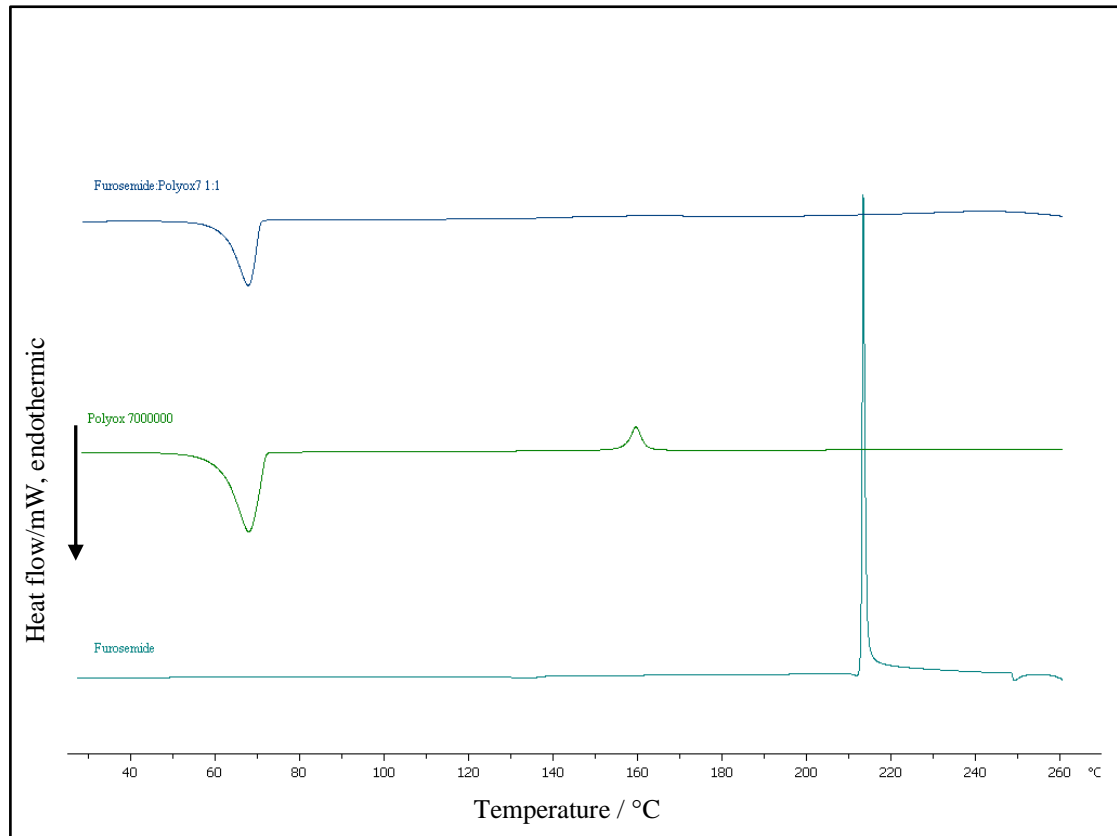
Γ.4.2 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο
MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0

Πίνακας Γ11: Θερμοτροπικές παράμετροι μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο
MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0

| | |
|--|-------|
| $T_{\text{onset, Polyox7}} (^{\circ}\text{C})$ | 62.1 |
| $T_{\text{Polyox7}} (^{\circ}\text{C})$ | 67.9 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Polyox7}} (^{\circ}\text{C})$ | 5.08 |
| $\Delta H_{\text{Polyox7}} (\text{J mol}^{-1})$ | 98.8 |
| $T_{\text{onset, Furosemide}} (^{\circ}\text{C})$ | 168.4 |
| $T_{\text{Furosemide}} (^{\circ}\text{C})$ | 179.1 |
| $\Delta T_{1/2 \text{ Furosemide}} (^{\circ}\text{C})$ | 30.33 |
| $\Delta H_{\text{Furosemide}} (\text{J mol}^{-1})$ | 8.4 |



Εικόνα Γ18: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0.



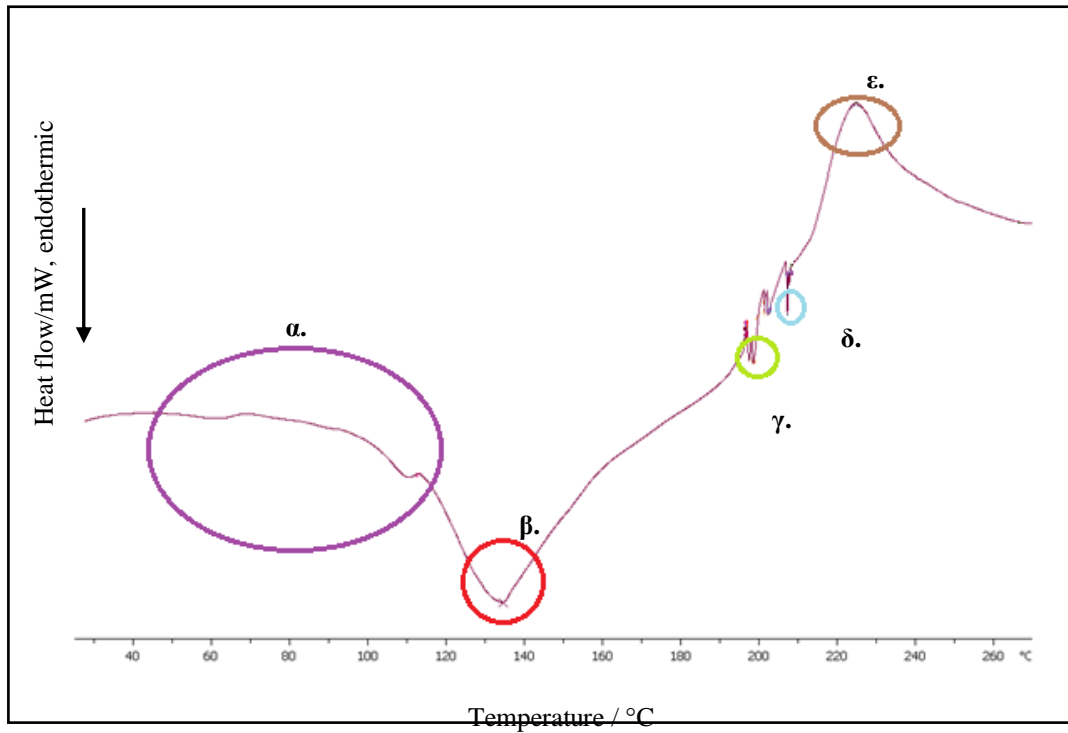
Εικόνα Γ19: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, εν συγκρίσει με τα θερμογράμματα των επιμέρους συστατικών του.

Το θερμογράμμα του μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, δείχνει πως τα δύο αυτά υλικά, δραστική ουσία και έκδοχο, παρουσιάζουν συμβατότητα και δεν υπάρχει θερμικώς προκαλούμενη αλληλεπίδρασή τους. Οι θερμοτροπικές παράμετροι του μίγματος (**Πίνακας Γ11**) ταυτίζονται με τις τιμές που παρουσίασαν τα επιμέρους συστατικά, όταν αναλύθηκαν μόνα τους.

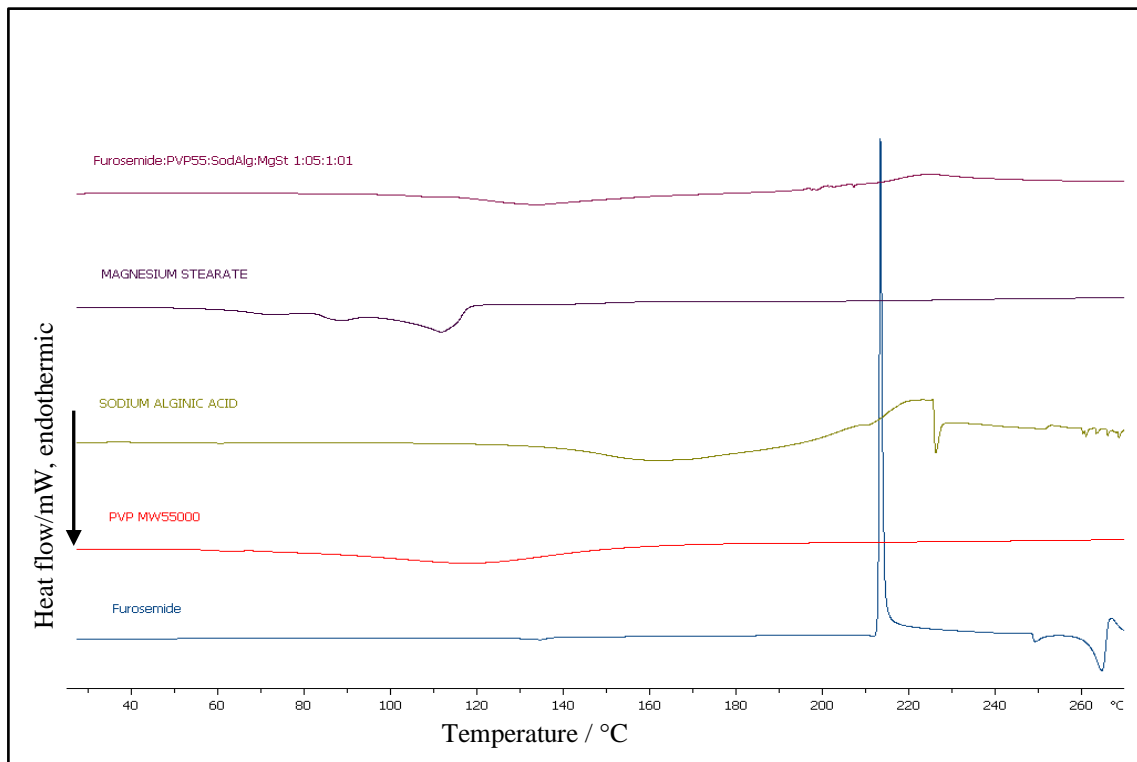
Γ.4.3 Θερμοτροπική συμπεριφορά του μίγματος Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01

Πίνακας Γ12: Θερμοτροπικές παράμετροι μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW 55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01

| | |
|--|-------|
| $T_{\text{onset},\alpha}$ (°C) | 104.6 |
| T_{α} (°C) | 109.3 |
| $\Delta T_{1/2\alpha}$ (°C) | 4.94 |
| ΔH_{α} (J mol ⁻¹) | 0.5 |
| $T_{\text{onset},\beta}$ (°C) | 115.9 |
| T_{β} (°C) | 134.6 |
| $\Delta T_{1/2\beta}$ (°C) | 22.29 |
| ΔH_{β} (J mol ⁻¹) | 42.1 |
| $T_{\text{onset},\gamma}$ (°C) | 197.1 |
| T_{γ} (°C) | 197.5 |
| $\Delta T_{1/2\gamma}$ (°C) | 0.52 |
| ΔH_{γ} (J mol ⁻¹) | 0.3 |
| $T_{\text{onset},\delta}$ (°C) | 207.0 |
| T_{δ} (°C) | 207.3 |
| $\Delta T_{1/2\delta}$ (°C) | 0.33 |
| ΔH_{δ} (J mol ⁻¹) | 0.4 |
| $T_{\text{onset},\epsilon}$ (°C) | 212.9 |
| T_{ϵ} (°C) | 224.9 |
| $\Delta T_{1/2\epsilon}$ (°C) | 19.94 |
| ΔH_{ϵ} (J mol ⁻¹) | 50.9 |



Εικόνα Γ20: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000): Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01.



Εικόνα Γ21: Θερμόγραμμα μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000): Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01, εν συγκρίσει με τα θερμογράμματα των επιμέρους συστατικών του.

Το θερμογράμμα του μίγματος Φουροσεμίδη:Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01, δείχνει πως τα τέσσερα αυτά υλικά, δραστική ουσία και έκδοχα, παρουσιάζουν συμβατότητα και δεν υπάρχει θερμικώς προκαλούμενη αλληλεπίδρασή τους. Οι θερμοτροπικές παράμετροι του μίγματος (**Πίνακας Γ12**) ταυτίζονται με τις τιμές που παρουσίασαν τα επιμέρους συστατικά, όταν αναλύθηκαν μόνα τους, με κάποιες μικρές διαφορές, που αποδίδονται στα νέα χαρακτηριστικά γεωμετρίας του μίγματος.

Γ.5. Συμπεράσματα

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται τα συμπεράσματα από τις μελέτες Θερμικής Ανάλυσης των χημικών διπλοστοιβάδων, των χημικών λιποσωμιακών συστημάτων, των κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης και των μιγμάτων αυτών, παρουσία και απουσία της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης

Γ.5.1 Συμπεράσματα για χημικές διπλοστοιβάδες και χημικά λιποσωμιακά συστήματα παρουσία και απουσία της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης

- Χημικές διπλοστοιβάδες
 - ✓ Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς PnBA-b-PAA 30/70 εξαφανίζει την κορυφή προμετάπτωσης των HSPC λιπιδίων, και στα δύο μέσα, Citrate buffer (pH 4.0) και PBS (pH 7.4), ίσως λόγω της παράλληλης διευθέτησης των HSPC λιπιδίων, που προκαλεί.
 - ✓ Ο ρόλος του pH-αποκρινόμενου PAA block είναι η επίδραση στην κινητικότητα των πολικών κεφαλών. Το υδρόφοβο PnBA block λειτουργεί ως spacer, διαχωρίζοντας τις πολικές κεφαλές και μειώνοντας τις δυνάμεις μεταξύ των λιπόφιλων ουρών.
 - ✓ Οι ενδόθερμες μεταβάσεις των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 διπλοστοιβάδων πραγματοποιούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία στο Citrate buffer (αστάθεια διπλοστοιβάδων, λόγω όξινου pH), συγκριτικά εκείνες που παρατηρούνται στο PBS.
 - ✓ Αυξανόμενη της μοριακής αναλογίας PnBA-b-PAA 30/70, και στα δύο μέσα, μειώνεται η απαιτούμενη ποσότητα ενέργειας για τήξη (μείωση ΔH_m) αφού γίνονται fluidlike οι διπλοστοιβάδες.
 - ✓ Αυξανόμενη της μοριακής αναλογίας PnBA-b-PAA 30/70, και στα δύο μέσα(καλύτερη συνεργασιμότητα υλικών στο PBS), παρατηρείται αισθητή αύξηση $\Delta T_{1/2}$, κάτι που υποδηλώνει μειωμένη συνεργασιμότητα (εξαιρέση

παρουσιάζει το σύστημα 9:3.0, στο οποίο παρουσιάζεται καλύτερη συνεργασιμότητα των υλικών, συγκριτικά με το αμέσως προηγούμενο 9:2.0).

- ✓ Αυξανόμενη της μοριακής αναλογίας PnBA-b-PAA 30/70, και στα δύο μέσα, παρατηρείται απουσία οξείων κορυφών και εμφάνιση shoulders. Αυτά τα “οπτικά συμπεράσματα” από τα θερμογράμματα υποδηλώνουν μη ομοιόμορφη κατανομή του συμπολυμερούς στη διπλοστοιβάδα, που μάλιστα οδηγεί σε solution-like model τις αναλογίες 9:1.0, 9:2.0 και 9:3.0.
- ✓ Όσον αφορά τις εξώθερμες μεταβάσεις (κρυσταλλοποίηση) των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 διπλοστοιβάδων πραγματοποιούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, συγκριτικά με HSPC διπλοστοιβάδες, και μάλιστα είναι πιο οξείες οι κορυφές στο Citrate buffer, συγκριτικά με εκείνες στο PBS.
- Χιμαιρικά λιποσωμιακά συστήματα
 - ✓ Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς PnBA-b-PAA 30/70 στα HSPC λιποσώματα μειώνει ελαφρώς την T_m (αστάθεια διπλοστοιβάδων).
 - ✓ Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς PnBA-b-PAA 30/70 στα HSPC λιποσώματα παρουσιάζει παρόμοια τιμή $\Delta T_{1/2}$, κάτι που υποδηλώνει σταθερή συνεργασιμότητα υλικών.
 - ✓ Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς PnBA-b-PAA 30/70 στα HSPC λιποσώματα επιφέρει αισθητά μεγάλη μείωση ΔH_m . Η εύκολη ρευστοποίηση της μεμβράνης –τιμήματος του καινοτόμου εκδόχου- (solution-like model) δυνητικά μπορεί να μεταφραστεί ως εύκολη αποδέσμευση της Φουροσεμίδης από το καινοτόμο έκδοχο χιμαιρικό λιπόσωμα.
 - ✓ Όσον αφορά τις εξώθερμες μεταβάσεις (κρυσταλλοποίηση) των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Furosemide λιποσωμάτων, η θερμοκρασία κρυσταλλοποίησης παραμένει σχεδόν ίδια, με πολύ μικρά ποσά εκλούμενης θερμότητας.

Γ.5.2 Συμπεράσματα για κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης και μίγματα αυτών, παρουσία και απουσία της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης

- Κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης και δραστική ουσία

- ✓ Το Αλγινικό Νάτριο παρουσιάζει μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή αφυδατώσεως, στους 120-190 °C, και ακολούθως, μετά τους 200 °C, παρουσιάζει εξώθερμες κορυφές που υποδηλώνουν σταδιακές αποσυνθέσεις.
 - ✓ Το Στεατικό Μαγνήσιο παρουσιάζει δύο ενδόθερμες κορυφές στο θερμοκρασιακό εύρος 90-120 °C, που υποδηλώνουν τη διαδοχική απώλεια των προσροφημένων μορίων ύδατος, ενώ η μικρή ενδόθερμη κορυφή που ακολουθεί, πιθανώς αποδίδεται στη συνύπαρξη Παλμιτικού Μαγνησίου.
 - ✓ Η Μονοϋδρική Λακτόζη παρουσιάζει δύο ενδόθερμες κορυφές, με πρώτη λόγω απώλειας μορίων ύδατος από την αφυδάτωση του δισακχαρίτη, και δεύτερη την τήξη. Αμέσως μετά πραγματοποιείται η θερμική αποσύνθεση της β-λακτόζης (καραμελοποίηση).
 - ✓ Οι Πολυβινυλοπυρρολιδόνες παρουσιάζουν κορυφή υαλώδους μετάπτωσης μέσα στο θερμοκρασιακό εύρος 120-160 °C. Η Πολυβινυλοπυρρολιδόνη MW:29,000 παρουσιάζει και άλλες κορυφές, κάτι που πιθανώς υποδηλώνει τη συνύπαρξη Πολυβινυλοπυρρολιδονών και άλλων μοριακών βαρών.
 - ✓ Τα Πολυαιθυλενοξειδία παρουσιάζουν ενδόθερμη κορυφή τήξης στους 70 °C περίπου, ενώ γύρω στους 160-180 °C, παρουσιάζουν μικρή εξώθερμη κορυφή, πιθανώς λόγω της αποσύνθεσής τους προς φορμικό εστέρα.
 - ✓ Η Φουροσεμίδη τήκεται στους 219 °C και κατευθείαν μετά αποσυντίθεται. Είναι τόσο οξεία η κορυφή της αποσύνθεσης, που για να φανεί οπτικά η κορυφή της τήξης, που προηγείται, είναι αναγκαία η μεγέθυνση του θερμογράμματος.
- Μίγματα κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης-δραστικής ουσίας Φουροσεμίδη: Πολυαιθυλενοξείδιο MW:4,000,000, αναλογίας 1.0:1.0, Φουροσεμίδη:Πολυαιθυλενοξείδιο MW:7,000,000, αναλογίας 1.0:1.0 και Φουροσεμίδη: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (MW:55,000):Αλγινικό Νάτριο:Στεατικό Μαγνήσιο, αναλογίας 1.0:0.5:1.0:0.01

Τα θερμογράμματα και των τριών μιγμάτων ταυτίζονται με εκείνα των εκδόχων ξεχωριστά· είναι, δηλαδή σα να αθροίζονται, το ένα πάνω στο άλλο, τα θερμογράμματα των ξεχωριστών εκδόχων. Σαφώς και παρατηρούνται κάποιες ανεπαίσθητες διαφορές σχήματος, ύψους, εύρους και θερμοκρασίας των κορυφών, οι

οποίες, όμως, είναι αναμενόμενες, καθώς αλλάζουν τα χαρακτηριστικά γεωμετρίας των εκδόχων. Σε κανένα μίγμα δεν παρατηρείται εξαφάνιση κάποιας κορυφής, γεγονός που υποδηλώνει συμβατότητα των εκδόχων – δραστικής ουσίας και απουσία θερμικώς προκαλούμενης αλληλεπίδρασης. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν μια ένδειξη πως οι φαρμακοτεχνικές μορφές που εμπεριέχουν αυτά τα μίγματα, θα είναι πιθανώς σταθερές στο χρόνο.

Γ.5.3 Τελικά συμπεράσματα

Όλα τα παραπάνω εξαίρουν την αξία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη μέθοδο της Θερμικής Ανάλυσης σε καινοτόμα έκδοχα, όπως είναι τα λιποσώματα (προηγμένα συστήματα μεταφοράς δραστικών ουσιών), αλλά και σε μίγματα κλασικών εκδόχων στερεάς κατάστασης. Αυτός είναι και ο λόγος που θα πρέπει να ενταχθεί η χρήση της μεθόδου, συνδυαστικά με άλλες μελέτες, στα πρώτα στάδια Προμορφοποίησης και Ανάπτυξης των φαρμάκων, πέρα από τα στάδια Ελέγχου. Οι πληροφορίες που παρέχουν σχετικά με τη συνεργασιμότητα των υλικών, τη θερμική τους σταθερότητα (που μπορεί να επεκταθεί σε επίπεδο επίδρασης κινητικής αποδέσμευσης του δραστικού μορίου), την ύπαρξη ή όχι νέων πολυμορφικών δομών, την ύπαρξη impurities στα μίγματα είναι μεγίστης σημασίας για τη διαμόρφωση μιας ασφαλούς και αποτελεσματικής φαρμακοτεχνικής μορφής.

Δ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσης Διπλωματικής Εργασίας διεξήχθησαν μελέτες Θερμικής Ανάλυσης σε Χιμαιρικές διπλοστοιβάδες (κομμάτι καινοτόμου εκδόχου λιπόσωμα), με σύσταση hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) και poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) με περιεχόμενο PAA 70% (PnBA-b-PAA 30/70), σε 6 διαφορετικές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0 και 9:3.0, σε Χιμαιρικά λιποσώματα (καινοτόμο έκδοχο – τελικό βιοεμπνευσμένο νανοσύστημα μεταφοράς), με σύσταση HSPC:PnBA-b-PAA 30/70:Furosemide, σε 3 διαφορετικές αναλογίες 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0 και 9:0.1:1.0, σε κλασσικά έκδοχα στερεάς κατάστασης Αλγινικό Νάτριο, Στεατικό Μαγνήσιο, Μονοϋδρική Λακτόζη, Πολυβινυλοπυρρολιδόνη διαφορετικών μοριακών βαρών (MW:10,000, MW:29,000, MW:55,000), Πολυαιθυλενοξειδίο διαφορετικών μοριακών βαρών (MW:4,000,000, MW:7,000,000), στη δραστική Φουροσεμίδα και σε μίγματά τους, παρουσία και απουσία της δραστικής Φουροσεμίδης. Στις χιμαιρικές διπλοστοιβάδες, αυξανόμενης της μοριακής αναλογίας PnBA-b-PAA 30/70, τόσο σε Citrate buffer όσο και σε PBS, παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών και εμφάνιση shoulders (solution-like model). Η εύκολη ρευστοποίηση παρατηρείται και στα χιμαιρικά λιποσωματικά συστήματα, κάτι που δυνητικά μπορεί να μεταφραστεί ως εύκολη αποδέσμευση της Φουροσεμίδης από το καινοτόμο έκδοχο. Όσον αφορά τα καινοτόμα έκδοχα και τη Φουροσεμίδα, η θερμική τους συμπεριφορά είχε απόλυτη ταύτιση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Στα μίγματα των εκδόχων με τη δραστική ουσία, τα θερμογράμματα είναι μια συγχώνευση των θερμικών εικόνων των ξεχωριστών εκδόχων (άθροισμα του ενός πάνω στο άλλο). Έτσι υπάρχει ένδειξη πως οι φαρμακοτεχνικές μορφές που θα εμπεριέχουν αυτά τα μίγματα, θα είναι πιθανώς σταθερές στο χρόνο. Συμπερασματικά, η σημαντικότητα της χρήσης της μεθόδου Θερμικής Ανάλυσης, συνδυαστικά με άλλες μελέτες, στα πρώτα στάδια Προμορφοποίησης και Ανάπτυξης των φαρμάκων. Οι παρεχόμενες πληροφορίες που προκύπτουν σχετικά με τη συνεργασιμότητα των υλικών, τη θερμική τους σταθερότητα (που μπορεί να επεκταθεί σε επίπεδο επίδρασης κινητικής αποδέσμευσης του δραστικού μορίου), την ύπαρξη ή όχι νέων πολυμορφικών δομών, την ύπαρξη impurities στα μίγματα, είναι μεγίστης σημασίας για τη διαμόρφωση μιας ασφαλούς και αποτελεσματικής φαρμακοτεχνικής μορφής.

E. ABSTRACT

In the context of this dissertation, experiments of Differential Scanning Calorimetry (DSC) are carried out in chimeric bilayers (part of the innovative excipient, called “liposome”), composed of hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) and poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) block copolymer with 70% content of PAA (PnBA-b-PAA 30/70), at 6 different molar ratios of 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0 and 9:3.0, in Chimeric liposomes (innovative excipient – advanced Drug Delivery Nanosystem), composed of HSPC:PNBA-b-PAA 30/70:Furosemide, at 3 different molar ratios of 9:0.0:0.0, 9:0.1:0.0 and 9:0.1:1.0, in solid-state pharmaceutical excipients Sodium Alginate, Magnesium Stearate, Lactose Monohydrate, Polyvinylpyrrolidone of 3 different molecular weights (MW: 10.000, MW: 29.000, MW: 55.000), Poly(ethylene oxide) of 2 different molecular weights (MW: 4.000.000, MW: 7.000.000), the bioactive compound Furosemide and mixtures of the solid-state excipients, in the presence and absence of the bioactive furosemide. In chimeric bilayers, increasing the molar ratio PNBA-b-PAA 30/70, both in Citrate Buffer and PBS, broadening of the peaks and appearance of shoulders are observed (solution-like model). Chimeric liposomal systems are characterized as “fluidlike” by their thermograms, which may be potentially translated as an easy way of release of the Furosemide from the advanced delivery system. Concerning the solid-state pharmaceutical excipients and Furosemide, their thermal behavior matches with the literature. Regarding the mixtures of the excipients-Furosemide, their DSC scans are fusion of the thermal behavior of each excipient (the total scan is like putting each scan over the other). This fact indicates that that the formulations, which will contain these mixtures, may retain their stability over time. In conclusion, it is obvious that using the DSC method, combined with other studies, at Preformulation and Development studies, is of great importance. The information which arises about the cooperativity of materials, their thermal stability (which may be extended at the level of kinetic release of the bioactive compound), polymorphism, and the presence of impurities in the mixtures, is very helpful for the research and development of safe and effective pharmaceutical formulations.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amado, E. and Kressler, J. (2011). Interactions of amphiphilic block copolymers with lipid model membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, pp. 491–498.
2. Attwood, D. and Florence, A.T. (2008). Physical Pharmacy. *Pharmaceutical Press*.
3. Baird, J.A., Taylor, L.S. (2012). Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 396-421.
4. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2011). Biochemistry, Fifth Edition.
5. Bibi, S., Bremner, D.H., Macdougall, H.M., Reid, R., Simpson, K., Tough, A., Waddell, S., Stewart, I.J. and Matthews, K.H. (2015). A preliminary investigation to group disparate batches of licit and illicit diazepam tablets using differential scanning calorimetry. *Analytical Methods*, 7, pp. 8597-8604.
6. Bruylants, G., Woutres, J. and Michaux, C. (2005). Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp. 2011-2020.
7. Cássia, R. and Semaan, F.S. (2013). Thermal behavior of furosemide. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111, pp. 1933-1937.
8. Ceckler, T.L. and Cunningham, B.E. (1997). Transition state thermodynamics of lipid bilayers characterized by differential scanning calorimetry. *The Chemical Educator*, 2(6), pp. 1-17.
9. Chadha, R. and Bhandari, S. (2014). Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, pp. 82-97.
10. Chaves, L.L., Rolim L.A., Gonçalves, M.L.C.M., Vieira, A.C.C., Alves, L.D.S., Soares, M.F.R., Soares-Sobrinho, J.L., Lima, M.C.A. and Rolim-Neto, P.J. (2013). Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbamazine citrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111, pp. 2179-2186.
11. Chen, J., Cheng, D., Li, J., Wang, Y., Guo, J., Chen, Z., Cai, B., and Yang T. (2013). Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(2), pp.197–204.

12. Chen, J., He, C., Lin, A., Xu, F., Wang, F., Zhao, B., Liu, X., Chen, Z. and Cai, B. (2014). Brucine-loaded liposomes composed of HSPC and DPPC at different ratios: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(2), pp.244-251.
13. Clas, S.D., Dalton, C.R. and Hancock, B.C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Research focus reviews PSTT*, 2(8), pp. 311-320.
14. Craig, D.Q.M. (1995). A review of thermal methods used for the analysis of the crystal form, solution thermodynamics and glass transition behaviour of polyethylene glycols. *Thermochimica Acta*, 248, pp. 189-203.
15. Crowley, P. and Martini, L.G. (2001). Drug-Excipient Interactions. *Pharmaceutical Technology*, 13, pp. 26-34.
16. Demetzos, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*, 18, pp. 159-173.
17. Demetzos, C. (2015). Biophysics and Thermodynamics: The Scientific Building Blocks of Nio-inspired Drug Delivery Nano Systems. *AAPS PharmSciTech*, 16(3), pp. 491-495.
18. Devarakonda, B., Otto, D.P., Judefeind, A., Hill, R.A. and Villiers M.M. (2007). Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM)dendrimer complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 345, pp. 142-153.
19. Di Foggia, M., Bonora, S., Tinti, A. and Tugnoli, V. (2016). DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of Ibuprofen at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, doi:10.1007/s10973-016-5408-8.
20. Dooren, A.A. and Müller, B.W. (1984). Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC)-a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, 20, pp. 217-233.
21. Drummond, D.C., Zignani, M. and Leroux, J.C. (2000). Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research*, 39, pp. 409-460.
22. Efentakis M. and Buckton G. (2002). The Effect of Erosion and Swelling on the Dissolution of Theophylline from Low and High Viscosity Sodium Alginate Matrices. *Pharmaceutical Development and Technology*, 7(1), pp. 69-77

23. Efentakis, M., Koutlis, A. and Vlachou, M. (2000). Development and Evaluation of Oral Multiple-unit and Single-unit Hydrophilic Controlled-release Systems. *AAPS PharmSciTech*, 1(4), pp. 62-70.
24. Efentakis, M., Naseef, H. and Vlachou, M. (2010), Two- and three-layer tablet drug delivery systems for oral sustained release of soluble and poorly soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(8), pp. 903-916.
25. Efentakis, M., Pagoni, I., Vlachou, M. and Avgoustakis, K. (2007). Dimensional changes, gel layer evolution and drug release studies in hydrophilic matrices loaded with drugs of different solubility. *International Journal of Pharmaceutics*, 339, pp. 66-75.
26. Efentakis, M and Vlachou, M. (2000). Evaluation of High Molecular Weight Poly(Oxyethylene) (Polyox) Polymer: Studies of Flow Properties and Release Rates of Furosemide and Captopril from Controlled-Release Hard Gelatin Capsules. *Pharmaceutical Development and Technology*, 5(3), pp. 339-346.
27. Felber, A.E., Dufresne, M-H. and Leroux, J-C. (2014). pH-sensitive vesicles, polymeric micelles and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 979-992.
28. Fujiwara, M., Baldeschwieler, J.D. and Grubbs R.H. (1996). Receptor-mediated endocytosis of poly(acrylic acid)-conjugated liposomes by macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1278, pp. 59–67.
29. Fujiwara, M., Grubbs, R. H. and Baldeschwieler J.D. (1997). Characterization of pH-Dependent Poly(acrylic Acid) Complexation with Phospholipid Vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185(1), pp. 210-216.
30. Garbett, N.C. and Brock, G.N. (2016). Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the valuation of biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860, pp. 981-989.
31. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Signorelli, M., Pusceddu, M., Micha-Screttas, M., Schiraldi, A., Demetzos, C. and Fessas, D. (2010). Thermodynamic and structural characterization of Liposomal-Locked in-Dendrimers as drug carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, pp. 11–19.
32. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K. and Demetzos, C. (2006). Effect of a bioactive curcumin derivative on DPPC membrane: A DSC and Raman spectroscopy study. *Thermochimica Acta*, 447, pp. 1–4.

33. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K., Wagner, M. and Demetzos, C. (2006). Interaction of dendrimers with model lipid membranes assessed by DSC and Raman Spectroscopy. *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy. Chapter 12*, pp. 207–220.
34. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K., Wagner, M. and Demetzos, C. (2006). A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 318, pp. 118–123.
35. Gatta, G.D., Richardson, M.J., Sarge, S.M. and Stølen, S. (2006). Standards, calibration, and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning calorimetry* (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 78(7), pp. 1455–1476.
36. Ghahramanpoor, M.K., Najafabadi, S A. H., Abdouss, M., Bagheri, F. and Eslaminejad, M.B. (2011). A hydrophobically-modified alginate gel system: utility in the repair of articular cartilage defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(10), pp. 2365-2375.
37. Hao, W., Han, X., Shang, Y., Xu, S. and Liu H. (2015). Insertion of pH-sensitive bola-type copolymer into liposome as a “stability anchor” for control of drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, pp. 809–816.
38. Hong, S.I. and Oh, S.Y. (2008). Dissolution kinetics and physical characterization of three-layered tablet with poly(ethylene oxide) core matrix capped by Carbopol. *International Journal of Pharmaceutics*, 356, pp. 121-129.
39. Hruby, M., Filippov, S.K. and Štěpanek, P. (2015). Smart polymers in drug delivery systems on crossroads: Which way deserves following?. *European Polymer Journal*, 65, pp. 82-97.
40. Huang, C. and Li, S. (1999). Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422, pp. 273–307.
41. Ionova, M., Gardikis, K., Wróbel, D., Hatziantoniou, S., Mourelatou, H., Majoral, J. P., Klajnert, B., Bryszewska, M. and Demetzos, C. (2011). Interaction of cationic phosphorus dendrimers (CPD) with charged and neutral lipid membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, pp. 8–12.

42. Júlio, T.A., Zâmara, I.F., Garcia, J.S. and Trevisan, M.G. (2013). Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(3), pp. 2037-2044.
43. Karehill, P.G., Glazer, M. and Nystrom C. (1990). The importance of surface roughness for the compactability of some directly compressible materials with different bonding and volume reduction properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 64(1), pp. 35-43.
44. Kitayama, H., Takechi, Y., Tamai, N., Matsuki, H., Yomota C. and Saito, H. (2014). Thermotropic phase behavior of hydrogenated soybean phosphatidylcholine-cholesterol binary liposome membrane. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 62(1), pp.58–63.
45. Knopp, M.M., Korbinian, L., Elder, D.P., Rades, T. and Holm, R. (2016). Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, pp. 164-173.
46. Koynova, R. and Caffrey, M. (1998). Phases and phase transitions of phosphatidylcholines. *Biochimica Biophysica Acta*, 1376, pp. 91–145.
47. Kyrili, A., Chountoulesi, M., Pippa, N., Meristoudi, A., Pispas S. and Demetzos C. (2017). Design and development of pH-sensitive liposomes by evaluating the thermotropic behavior of their chimeric bilayers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, pp. 1-12.
48. Lasic, D.D. (1990). On the thermodynamic stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1, pp. 302-304.
49. Lavour, E.P., Navarro, M.V.M., Freire, F.D., Aragão, C.F.S., Raffin, F.N., Barbosa, E.G. and Moura, T.F.A. (2014). Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs-excipient compatibility. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115, pp. 2303-2309.
50. Li, J., Zhao, J., Tao, L., Wang, J., Waknis, V., Pan, D., Hubert, M., Raghavan, K. and Patel, J. (2015). The Effect of Polymeric Excipients on the Physical Properties and Performance of Amorphous Dispersions: Part I, Free Volume and Glass Transition. *Pharmaceutical Research*, 32(2), pp. 500-515.
51. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X. and Deng Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, 10, pp. 81–98.

52. Liew, C.V., Chan, L.W., Ching, A.L., Wan, P. and Heng, S. (2006). Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), pp. 25–37.
53. Lima, N.G.P.B., Lima, I.P.B., Barros, D.M.C., Oliveira, T.S., Raffin, F.N., Moura, T.F.A., Medeiros, A.C.D., Gomes, A.P.B. and Aragão, C.S.F. (2014). Compatibility studies of trioxsalen with excipients by DSC, DTA, and FTIR. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115, pp. 2311-2318.
54. Lin, Y-L., Jiang, G., Birrell, L.K. and El-Sayed, M.E.H. (2010). Degradable, pH-sensitive, membrane-destabilizing, comb-like polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *Biomaterials*, 31, pp. 7150-7166.
55. Liu, X. and Huang, G. (2013). Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, pp. 319-328.
56. Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A. and Liang, X-J. (2014). pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 32, pp. 693-710.
57. Marian, E., Jurca, T., Kacso, I., Borodi, J., Rus, L.M. and Bratu, I. (2015). Compatibility study between simvastatin and excipients in their physical mixtures. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 66(6), pp.803-807.
58. Marinescu, C.D., Pincu, E. and Meltzer V. (2013). Thermodynamic study of binary system Propafenone Hydrochloride with Metoprolol Tartrate: Solid-liquid equilibrium and compatibility with α -lactose monohydrate and corn starch. *International Journal of Pharmaceutics*, 448, pp. 366-372.
59. Marti, E.E. (1972). Purity determination by Differential Scanning Calorimetry. *Thermochimica Acta*, 5, pp. 173-220.
60. Mashaghi, S., Jadidi, T., Koenderink, G. and Mashaghi, A. (2013). Lipid Nanotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, pp. 4242-4282.
61. Matsingou, C. and Demetzos C. (2007). Calorimetric study on the induction of interdigitated phase in hydrated DPPC bilayers by bioactive labdanes and correlation to their liposome stability-The role of chemical structure. *Chemistry and Physics of Lipids*, 145, pp. 45–62.
62. Mishra, R., Datt, M. and Banthia, A.K. (2008). Synthesis and Characterization of Pectin/PVP Hydrogel Membranes for Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech*, 9(2), pp. 395-403.

63. Munavirov B.V., Filippov, A.V., Rudakova M.A. and Antzutkin O.N. (2014). Polyacrylic Acid Modifies Local and Lateral Mobilities in Lipid Membranes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, doi:10.1080/01932691.2013.823096
64. Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D. (2014). Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology, Sixth Edition.
65. Narang, A.S., Desai, D. and Badawy, S. (2012). Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability. *Pharmaceutical Research*, 29, pp. 2660-2683.
66. Ohtakee, S., Schebor, C., Palecek, S.P. and Pablo J.J. (2015). Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713, pp. 57–64.
67. Patera, J., Zamostny, P., Litva, D., Berova, Z. and Belohlav, Z. (2012). Evaluation of functional characteristics of lactose by inverse gas chromatography. *Procedia Engineering*, 42, pp. 614-650.
68. Pearson, R.T., Warren, N.J., Lewis, A.L., Armes, S.P. and Battaglia, G. (2013). Effect of pH and Temperature on PMPC–PDPA Copolymer Self-Assembly. *Macromolecules*, 46, pp. 1400-1407.
69. Pielichowski, K. and Flejtuch K. (2002). Differential Scanning Calorimetry Studies on Poly(ethylene Glycol) with Different Molecular Weights for Thermal Energy Storage Materials. *Polymers for Advanced Technologies*, 13, pp. 690-696.
70. Pifferi, G., Santoro, P. and Pedrani, M. (1999). Quality and functionality of excipients. *Farmaco*, 54, pp. 1-14.
71. Pippa, N., Gardikis, K., Pispas, S. and Demetzos, C. (2014). The physicochemical/thermodynamic balance of advanced drug liposomal delivery systems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 116, pp. 99–105.
72. Pippa, N., Chountoulesi, M., Kyrili, A., Meristoudi, A., Pispas S. and Demetzos C. (2016). Calorimetric study of pH-responsive block copolymer grafted lipid bilayers: rational design and development of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 26(3), pp. 211–220.
73. Pippa, N., Dokoumetzidis, A., Pispas S. and Demetzos C. (2014). The interplay between the rate of release from polymer grafted liposomes and their fractal morphology. *International Journal of Pharmaceutics*, 465, pp. 63–69.

74. Pires, S.A., Mussel, W.N., Oliveira, M.A. and Yoshida, M.I. (2014). Compatibility studies of ciprofibrate with excipients by DSC, XRPD, and FTIR. In: *IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. Serra Negra*.
75. Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients. *Pharmaceutical Press*.
76. Rus, L. M., Tomuta, I., Iuga, C., Maier, C., Kacso, I., Borodi, G., Bratu, I. and Bojita, M. (2002). Compatibility studies of indapamide/pharmaceutical excipients used in tablet reformulation. *Farmacia*, 60(1), pp. 92-101.
77. Seongok, H., Chongyoun, K. and Dongsook, K. (1995). Thermal degradation of poly(ethylene Glycol). *Polymer Degradation and Stability*, 47, pp. 203-208.
78. Shashi, K., Satinder, K. and Bharat, P. (2012). A complete review on: Liposomes. *Internatiomal Research Journal of Pharmacy*, 3(7), pp. 10-16.
79. Shen, W., Hu, J. and Hu, X. (2014). Impact of amphiphilic triblock copolymers on stability and permeability of phospholipid/polymer hybrid vesicles. *Chemical Physics Letters*, 600, pp. 56–61.
80. Silva, R.C., Semaan, F.S., Novák, C. and Cavalheiro, E.T.G. (2013). Thermal behavior of furosemide. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(3), pp. 1933-1937.
81. Simões, S., Moreira, J-N., Fonseca, C., Düzgünes, N. and Pedroso, de Lima M.N. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 947– 965.
82. Soares, J.P., Santos, J.E., Chierice, G.O. and Cavalheiro, E.T.G. (2004). Thermal behavior of alginate acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29(2), pp. 57-63.
83. Teleginski, L.K., Maciel, A.B., Mendes, C., Segatto Silva, M.A., Bernardi, L.S. and Oliveira, P.R. (2015). Fluconazole – excipient compatibility studies as the first step in the development of formulation candidate for biowaiver. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120, pp. 771-781.
84. Tirrell, D.A. (1984). pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules*, 17(9), pp. 1692–1698.
85. Vlachou, M., Hani, N., Efentakis, M., Tarantili, P.A. and Andreopoulos, A.G. (2000). Polymers for Use in Controlled Release Systems: The Effect of Surfactants on Their Swelling Properties. *Journal of Biomaterials Applications*, 15, pp. 65-77.

86. Vlachou, M., Naseef, H. and Efentakis, M. (2010). Utilization of Hydrophilic Swellable Polymers as Carriers for Sustained Drug Delivery from Matrices and Three Layer Tablet Systems. *Current Drug Delivery*, 7, pp. 334-342.
87. Vlachou, M., Naseef, H., Efentakis, M., Tarantili, P.A. and Andreopoulos, A.G. (2001). Swelling Properties of Various Polymers Used in Controlled Release Systems. *Journal of Biomaterials Applications*, 16, pp. 125-138.
88. Vlachou, M. and Papaïoannou, G. (2003). Preparation and Characterization of the Inclusion Complex of Furosemide with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Journal of Biomaterials Applications*, 17, pp. 197-206.
89. Wang, L., Geng, D. and Su, H. (2014). Safe and efficient pH sensitive tumor targeting modified liposomes with minimal cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, pp. 395-402.
90. Wang, L., Geng, D. and Su, H. (2014). Safe and efficient pH sensitive tumor targeting modified liposomes with minimal cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, pp. 395–402.
91. Wang, Y., Luo, Y.H., Zhao, J. and Sun, B.W. (2014). Selection of excipients for dispersible tablets of itraconazole through the application of thermal techniques and Raman spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115, pp. 2391-2400.
92. Xia, T., Hao, W., Shang, Y., Xu, S. and Liu, H. (2016). Incorporation of Amphiphatic Diblock Copolymer in Lipid Bilayer for Improving pH Responsiveness. *International Journal Polymer Science*, doi: 10.1155/2016/5879428.
93. Yang, J., Zhao, J. and Fang, Y. (2008). Calorimetric studies of the interaction between sodium alginate and sodium dodecyl sulfate in dilute solutions at different pH values. *Carbohydrate Research*, 343, pp. 719-725.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Δεμέτζος, Κ. (2014). Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία-Βασικές Αρχές και Πρακτικές Εφαρμογές. *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου*.
2. Διαμαντίδη, Ε.Δ. (2016). Συγκριτικές μελέτες παρατεταμένης αποδέσμευσης των νέων αντιφυματικών ενώσεων 2,2-δις[4-(2-μορφολινοαιθοξυ)φαινυλ]αδαμαντάνιο και 1,3-δις[4-(2-μορφολινοαιθοξυ)φαινυλ]αδαμαντάνιο από υδρόφιλες μήτρες. *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Βιομηχανική Φαρμακευτική*.

3. Εφεντάκης Μ. (2011). Φαρμακευτική Τεχνολογία των στερεών μορφών, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής,.
4. Χατζηγεωργίου, Π. (2012). Φυσικοχημική Μελέτη Αλληλεπιδράσεων Βιοδραστικών Μορίων σε Λιπιδικές Μεμβράνες. *Διδακτορική Διατριβή*.
5. Χατζιωάννου, Θ.Π. (2010). Ενόργανη Ανάλυση.

Z. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Z.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και σταθερότητα χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0

Το μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος, Dh), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό (Zeta-Potential) των λιποσωμάτων μετρώνται άμεσα μετά την παρασκευή των λιποσωμάτων (ακολουθείται ακριβώς η ίδια μέθοδος παρασκευής που περιγράφηκε στο Πειραματικό μέρος (B), στο κεφάλαιο 2) με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων. Τα δείγματα σκεδαζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C. Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN. Τα παρασκευασθέντα λιποσώματα διατηρούνται στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4 °C και μετράται η σταθερότητά τους τις μέρες 1, 8, 13, 16, 20, 28, 30 (θεωρώντας ως Time(day)=0 την ημέρα παρασκευής τους).

Z.1.1 Υλικά

- H₂O HPLC καθαρότητας

Z.1.2 Όργανα

- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliterTM syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων (Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000, Instruments Ltd.)

Z.1.3 Αρχή λειτουργίας όργανου Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων

Σωματίδια μεγέθους από 1–5000nm μπορούν να μετρηθούν με τη μέθοδο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (photon correlation spectroscopy–PCS). Ένα από τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων είναι ότι βρίσκονται σε συνεχή τυχαία θερμική κίνηση (κίνηση Brown). Αυτή η κίνηση έχει ως αποτέλεσμα η ένταση του σκεδαζόμενου από τα σωματίδια φωτός να σχηματίζει ένα μοντέλο κινούμενου στίγματος. Αυτή η κινητικότητα ανιχνεύεται ως αλλαγή της έντασης σε σχέση με το χρόνο, από έναν ανιχνευτή και έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Τα μεγάλα σωματίδια κινούνται πιο αργά από τα μικρά και συνεπώς ο ρυθμός της διακύμανσης του σκεδαζόμενου φωτός είναι πιο βραδύς. Η φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων

χρησιμοποιεί το ρυθμό μεταβολής των διακυμάνσεων του φωτός για να προσδιορίσει την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων που προκαλούν το σκεδασμό του φωτός.

Στο όργανο αυτό η παραγωγή της δέσμης του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται από λυχνία He–Ne και το μήκος κύματος του φωτός είναι 633nm. Η ακτινοβολία προσπίπτει στα σωματίδια (π.χ. λιποσώματα), σκεδάζεται και στη συνέχεια, τα σκεδαζόμενα φωτόνια ανιχνεύονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Στο λογισμικό του οργάνου υπάρχει πρόγραμμα αλγορίθμων που επεξεργάζεται τις μεταβολές της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και καταλήγει στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται στο δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μαθηματική ανάλυση, η οποία συνίσταται από την ISO 13321 διεθνή μέθοδο, προκύπτει και ο μέσος όρος των μεγεθών. Κατά τις μετρήσεις αυτές το μέγεθος ορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων–λιποσωμάτων (Dh), ενώ ως δείκτης πολυδιασποράς (PDI) το εύρος κατανομής.

Το ζ–δυναμικό (ζ–Potential ή ZETA–Potential) των σωματιδίων που μετρά το όργανο είναι το ζ–δυναμικό της επιφάνειας κάλυψης του σωματιδίου που δημιουργείται μεταξύ του φορτίου του σωματιδίου και του μέσου, και όχι το φορτίο επιφάνειας του σωματιδίου.

Z.1.4 Εφαρμογή Δείγματος

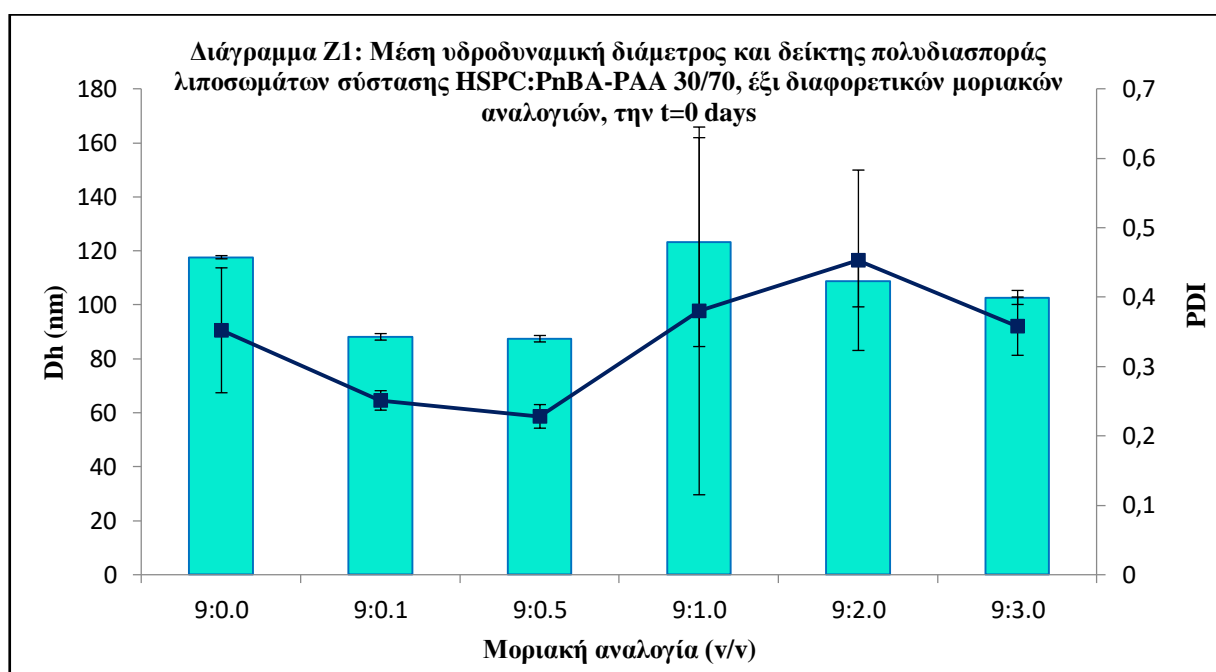
Κάθε λιποσωματικό εναιώρημα αραιώνεται 30 φορές (100μL δείγματος στα 2900μL H₂O HPLC καθαρότητας) σε κυψελίδα μιας χρήσης από πολυστυρένιο, όγκου 3ml σε H₂O HPLC καθαρότητας (pH 5.6–5.7) (από φίλτρο Millipore με διάμετρο πόρων 200nm). Αυτή τοποθετείται σε ειδική υποδοχή του οργάνου, η οποία κλείνει με καπάκι, ώστε να μη διαχέεται το σκεδαζόμενο φως και να μετράται το μέγεθος. Εν συνεχεία, το περιεχόμενο της κυψελίδας εγχέεται με σταθερό ρυθμό στην ειδική υποδοχή του οργάνου (προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που θα εμπόδιζαν τη σωστή μέτρηση του ζ–δυναμικού), που οδηγεί το λιποσωματικό εναιώρημα στην εσωτερική κυψελίδα του οργάνου και μετράται τα ζ–δυναμικό.

Z.1.5 Μέτρηση – Αποτελέσματα – Παρατηρήσεις

Z.1.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:PnBA-PAA 30/70 χημικών λιποσωμάτων (σε PBS), την t=0 days

Πίνακας Z1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:PnBA-PAA 30/70 χημικών λιποσωμάτων (σε PBS), την t=0 days

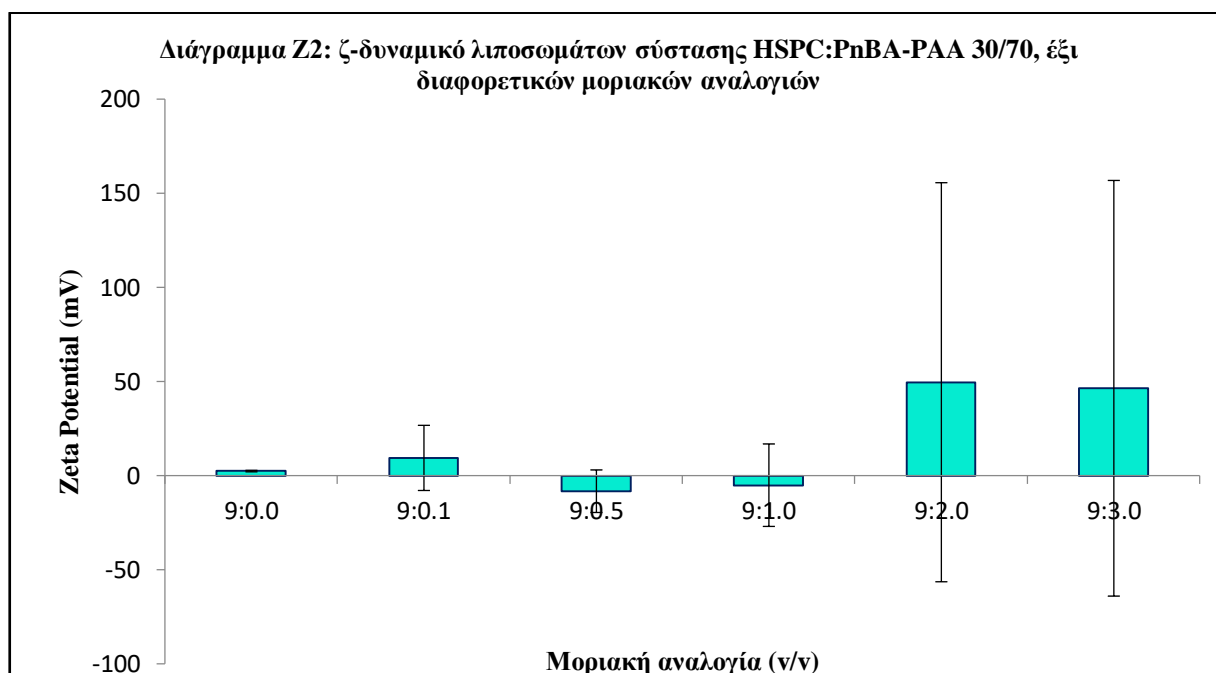
| Μοριακή Αναλογία | Dh(nm) | S.D. ⁱ (nm) | PDI ⁱⁱ | S.D. | Z-potential(mV) | S.D.(mV) |
|------------------|--------|------------------------|-------------------|-------|-----------------|----------|
| 9:0.0 | 117.6 | 0.6 | 0.352 | 0.090 | 2.4 | 0.4 |
| 9:0.1 | 88.1 | 1.2 | 0.251 | 0.014 | 9.4 | 17.3 |
| 9:0.5 | 87.4 | 1.2 | 0.228 | 0.017 | -8.3 | 11.3 |
| 9:1.0 | 123.2 | 38.7 | 0.380 | 0.265 | -5.1 | 21.9 |
| 9:2.0 | 108.7 | 9.5 | 0.453 | 0.130 | 49.6 | 106.0 |
| 9:3.0 | 102.7 | 2.6 | 0.358 | 0.042 | 46.4 | 110.4 |



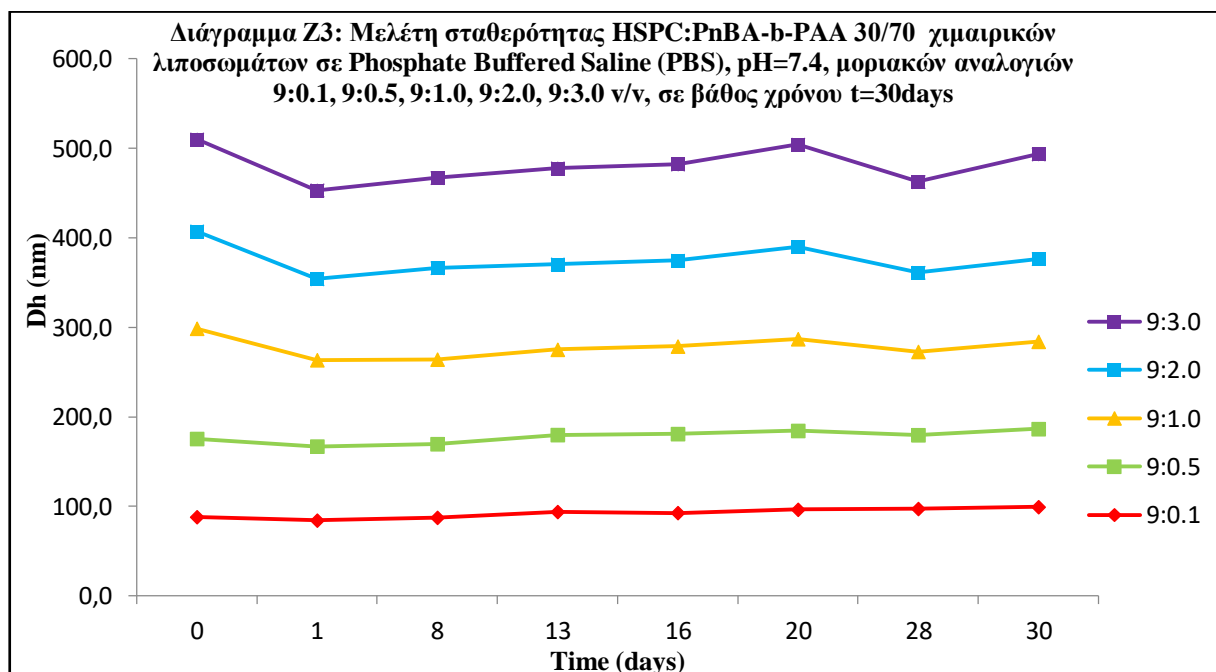
Μετά την ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA (30/70) στη χαμηλότερη μοριακή αναλογία, παρατηρείται μια μικρή μείωση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h), η οποία είναι περίπου ίδια με εκείνη που συμβαίνει και στην 9:0.5 μοριακή αναλογία, εν συγκρίσει με τη D_h των HSPC λιποσωμάτων. Επιπλέον αύξηση του PnBA-b-PAA (30/70) περιεχομένου, προκαλεί αύξηση της τιμής D_h , η οποία αγγίζει τα 123.2 nm στη μοριακή αναλογία 9:1.0, ενώ οι μοριακές αναλογίες 9:2.0 και 9:3.0 παρουσιάζουν μικρότερες D_h s (108.7 nm και 102.7 nm αντίστοιχα). Όλα αυτά τα κολλοειδή

συστήματα παρουσιάζουν, λίγο ή πολύ, χαμηλές τιμές δείκτη πολυδιασποράς (PDI κυμαίνεται μεταξύ 0.228 και 0.380), κάτι που υποδηλώνει ομοιογένεια μεγέθους. Μόνη εξαίρεση σε αυτό αποτελεί η τιμή PDI του συστήματος μοριακής αναλογίας 9:2.0, που σχεδόν αγγίζει το 0.5 (Πίνακας Z1, Διάγραμμα Z1).

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η τιμή του ζ-δυναμικού των χημικών λιποσωματικών κolloειδών διασπορών (Διάγραμμα Z2). Όσο αυξάνεται η ποσότητα του PnBA-b-PAA 30/70 σε αυτά τα ενυδατωμένα σε PBS συστήματα, η απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού αυξάνεται, συγκριτικά με τα συμβατικά λιποσώματα. Η μοριακή αναλογία 9:1.0 δε φαίνεται μόνο να ακολουθεί αυτή την τάση· αντιθέτως, παρουσιάζει μικρότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού, συγκριτικά με την αμέσως προηγούμενη μοριακή αναλογία. Από φυσικοχημική άποψη, μόνο οι κolloειδές διασπορές HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 αναλογίας 9:2.0 και 9:3.0 μπορούν να χαρακτηριστούν ως σταθερά συστήματα, καθώς η απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού τους είναι μεταξύ 40-80 mV.



Z.1.5.2 Μελέτη σταθερότητας HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 χημικών λιποσωμάτων, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0



Όσον αφορά τη μελέτη σταθερότητας των HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 χημικών λιποσωμάτων σε βάθος χρόνου t=30days (Διάγραμμα Z3), ξεκινώντας με τις μοριακές αναλογίες 9:0.1 και 9:3.0, παρατηρείται μια ελαφριά αύξηση περίπου 10% στη D_h τους, συγκριτικά με την τιμή την ημέρα της παρασκευής τους (t=0days) (88.1 nm σε 99.3 nm και 102.7 nm σε 117.9 nm, αντίστοιχα). Επιπλέον, η D_h στη μοριακή αναλογία 9:0.5 παραμένει σχεδόν σταθερή (περίπου 87 nm), καθόλη την περίοδο του ενός μήνα. Το μέγεθος των μοριακών αναλογιών 9:1.0 και 9:2.0 παρουσιάζει το εξής παράδοξο· οι D_h τους εμφανίζονται σημαντικά μικρότερες τη μέρα t=1day συγκριτικά με το μέγεθος την ημέρα t=0day. Αυτό πιθανώς σημαίνει πως τα συστήματα αυτά θέλουν πάνω από τριάντα λεπτά resting period πριν τη μέτρηση μεγέθους, προκειμένου να μπορέσουν να διαχειριστούν το ποσό ενέργειας που εισέλαβαν, μέσω της υπερήχησης με αισθητήρα. Πέρα από αυτό το παράδοξο, τα συγκεκριμένα συστήματα παρέμειναν ακριβώς ίδια, όσον αφορά το μέγεθος, μετά από τον ένα μήνα μετρήσεων (~97 nm και 95 nm, αντίστοιχα). Η τιμή του PDI των συστημάτων 9:0.1, 9:0.5 και 9:1.0 βρέθηκε να είναι 0.2-0.3, κάτι που υποδηλώνει καλή και ομοιόμορφη διασπορά των χημικών λιποσωματικών συστημάτων. Αντίθετα, για τα συστήματα 9:2.0 και 9:3.0, η διασπορά του μεγέθους ήταν πιο ετερογενής, αφού οι τιμές του PDI κυμαίνονται μεταξύ 0.35 και 0.45.

Όλα αυτά τα χημικά λιποσώματα οφείλουν τη σταθερότητά τους τόσο στο PAA όσο και στο PnBA κομμάτι τους. Το PAA κομμάτι αποτελεί έναν ασθενή ηλεκτρολύτη (pKa της πρώτης ιονιζόμενης επαναλαμβανόμενης μονάδας, εντοπίζεται περίπου σε τιμή 4.2) και έχει υδρόφιλο και pH-ευαίσθητο χαρακτήρα. Οι διασπορές παρασκευάστηκαν, όπως προαναφέρθηκε και στο πειραματικό κομμάτι, με προσθήκη PBS (pH=7.4). Σε αυτή την τιμή pH, το PAA block ιονίζεται μερικώς και οι αλυσίδες του επεκτείνονται. Το αρνητικό φορτίο της καρβοξυλομάδος (COO⁻), που εμφανίζει το πολυμερές σε ουδέτερο pH, προκαλεί απόθεση των λιποσωμάτων, προστατεύοντάς τα από πιθανή σύντηξή τους ή αποσταθεροποίησή τους. Το PAA block προστατεύει επιπροσθέτως τα λιποσώματα από διαδικασίες συσσωμάτωσης, αφού εξαιτίας της εκτεταμένης, τρισδιάστατης διαμόρφωσής του, σε ουδέτερα ή βασικά pH, εκτείνει την επιφάνεια των λιποσωμάτων (Liu et al., 2014; Wang et al., 2014; Drummond et al., 2000). Ένα πρόσθετος παράγων που μειώνει τη διαμορφωτική ικανότητα κάθε αλυσίδας, είναι τα προσροφημένα πάνω στις πολυμερικές αλυσίδες, μόρια ύδατος. Αυτά τα μόρια αυξάνουν την ωσμωτική πίεση μεταξύ των λιποσωμάτων και οδηγούν τελικώς σε απόθεσή τους. Από την άλλη πλευρά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και το PnBA- block, αφού δρα ως spacer, ανάμεσα στη λιποσωματική μεμβράνη, μειώνοντας έτσι τις Van der Waals δυνάμεις μεταξύ των υδρόφοβων HSPC λιπιδικών αλκυλ-αλυσίδων. Με αυτό τον τρόπο διαταρράσσεται η μεμβράνη και μειώνεται η επιφανειακή τάση μεταξύ των λιποσωμάτων, αποτρέποντας τη σύντηξή τους (Pirra et al., 2016). Η χαμηλή πυκνότητα πακεταρίσματος μειώνει τη διεπιφανειακή τάση, το οποίο αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες που προκαλούν σύντηξη στα λιποσώματα. Έτσι, η αναντιστοιχία μήκους δύναται να οδηγήσει με τη σειρά της σε διεμπλοκή και δημιουργία διαμόρφωσης φουρκέτας (hairpin), με την οποία το υδρόφοβο PnBA-block αναγκάζει τη μεμβράνη να πάρει ενεργειακά ευνοϊκές διαμορφώσεις, μειώνοντας περαιτέρω την τάση της μεμβράνης (Amado et al., 2011; Shen et al., 2014).

Z.1.5.3 Όξινο πρωτόκολλο

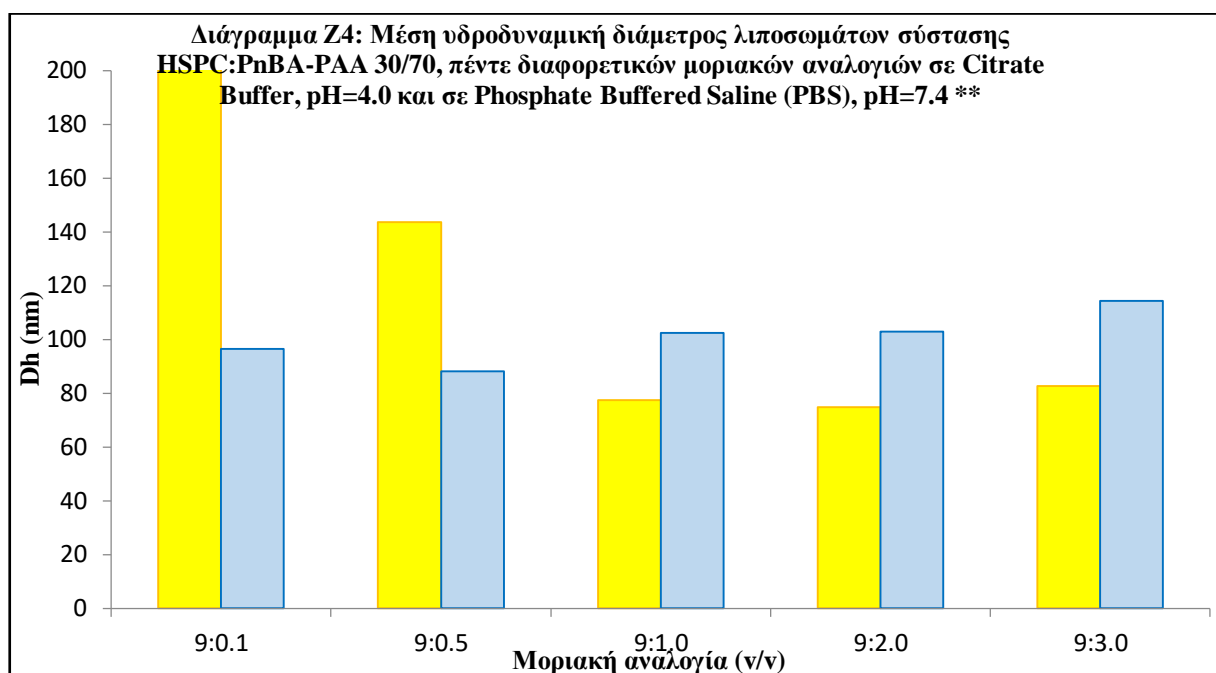
Πίνακας Z2: Συγκριτική παρουσίαση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των HSPC:PnBA-ΡΑΑ 30/70 χημαιρικών λιποσωμάτων σε Phosphate buffered saline (pH 7.4) και σε Citrate buffer (pH 4.0)

| Μέσο | Μοριακή Αναλογία | D _h (nm) | S.D. (nm) | PDI | S.D. | Z-potential (mV) | S.D. (mV) |
|----------------|------------------|---------------------|-----------|-------|-------|------------------|-----------|
| Citrate buffer | 9:0.1 | 14468.1 | 4624.8 | 0.695 | 0.528 | -13.2 | 57.8 |
| | 9:0.5 | 143.7 | 2.0 | 0.128 | 0.013 | 19.9 | 0.9 |
| | 9:1.0 | 77.4 | 0.5 | 0.128 | 0.005 | 42.3 | 72.9 |
| | 9:2.0 | 74.8 | 1.1 | 0.263 | 0.007 | 72.8 | 41.2 |
| | 9:3.0 | 82.7 | 0.3 | 0.265 | 0.025 | 9.7 | 19.6 |
| PBS | 9:0.1 | 96.4 | 0.4 | 0.273 | 0.021 | 8.2 | 21.4 |
| | 9:0.5 | 88.1 | 0.9 | 0.239 | 0.017 | 28.3 | 144.6 |
| | 9:1.0 | 102.5 | 0.4 | 0.245 | 0.012 | 13.9 | 8.2 |
| | 9:2.0 | 103.0 | 2.0 | 0.377 | 0.033 | 48.1 | 76.5 |
| | 9:3.0 | 114.4 | 1.0 | 0.325 | 0.036 | 80.1 | 78.6 |

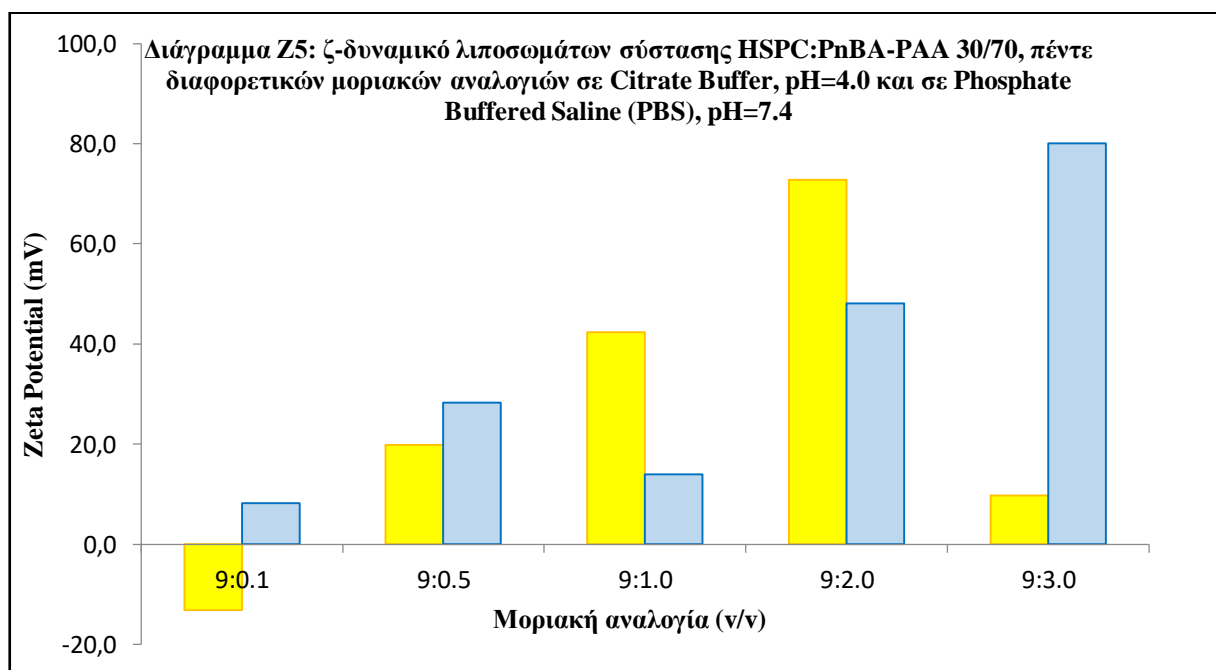
Η τροποποίηση του pH, αποτελεί έναν από τους νασικούς τρόπους (πέρα από την αλλαγή θερμοκρασίας ή διαλύτη), που δύναται να παρεμποδίζει τις ασθενείς δυνάμεις και ακολούθως να προκαλέσει αλλαγές στη δομή της διπλοστοιβάδας και έτσι τροποποιήσει της λειτουργικότητάς της (Ceckler et al., 1997). 100 μ L της εκάστοτε κολλοειδούς διασποράς αραιώνονται σε 950 μ L Citrate buffer σε μία κυψελίδα και αφήνεται σε ηρεμία για 30 min. Μετά από αυτή τη resting period, μετρείται η μέση υδροδυναμική διάμετρος (D_h) and και το μέγεθος του δείκτη πολυδιασποράς (PDI), αφού πρώτα όμως προστεθούν και 2 mL H₂O HPLC- καθαρότητας. Το λιποσωμακό σύστημα 9:0.1 παρουσιάζει δραματική αύξηση της D_h , αγγίζοντας τα 14.5 μ m (Πίνακας Z2, Διάγραμμα Z4). αυτή η ραγδαία και τεράστια αύξηση είναι εμφανής μακροσκοπικά (Εικόνα Z4), αφού η διασπορά έγινε υπόλευκη. Θολή και σταδιακά ξεκίνησε η καθίζηση λευκών κροκίδων. Όσον αφορά τη D_h του συστήματος μοριακής αναλογίας 9:0.5, αυξήθηκε ελαφρώς από 88.1 nm σε 143.7 nm. Για τα υπόλοιπα χημαιρικά λιποσωμακά συστήματα, το όξινο περιβάλλον προκάλεσε μείωση της D_h

τους, συγκριτικά με το μέγεθος που είχαν εκείνη την ημέρα που έλαβε χώρα το όξινο πρωτόκολλο (t=20days).

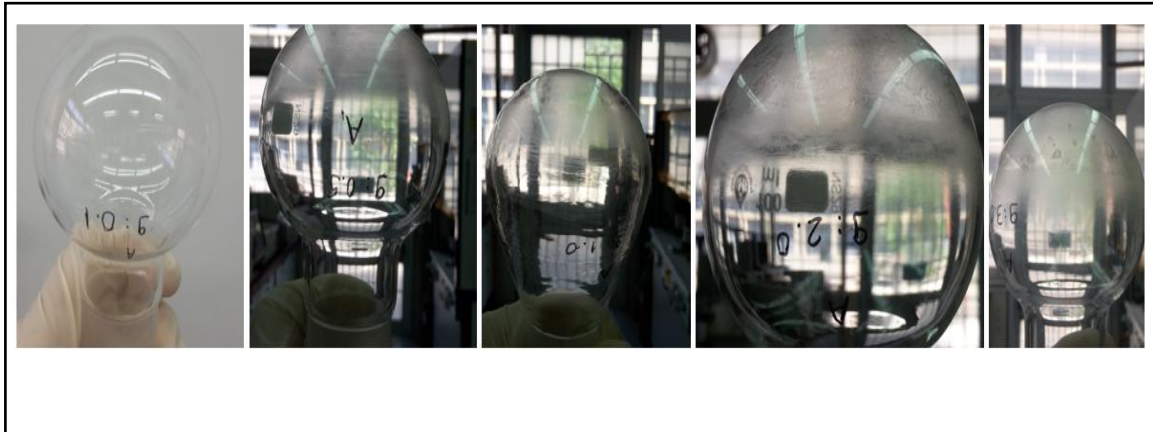
Είναι αλήθεια πως οι παραπάνω μειώσεις, βάσει βιβλιογραφίας, ήταν αναμενόμενες, καθότι το PAA block ($pK_a \sim 4.2$) παρουσιάζει pH-ευαίσθητες ιδιότητες. Σε υψηλές τιμές pH δεν υπάρχει συμπλοκή μεταξύ PAA και λιποσωματικής επιφάνειας (μόνο το PnBA block εισχωρεί στη σιπλοστοιβάδα), ενώ μία μείωση του pH έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη σύνδεση του PAA με τη μεμβράνη. Αυτή η αλλαγή μπορεί να αποδοθεί στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ του PAA και των λιπιδίων της μεμβράνης του λιποσώματος. Έτσι, λοιπόν, σε ουδέτερο pH (PBS), το block PAA ιονίζεται (περίπου 0.1% των καρβοξυλομάδων παραμένει πρωτονιωμένο και το 99.9% ιονίζεται, αφού $pK_a \sim 4.2$). με αυτό τον τρόπο οι αλυσίδες του PAA επεκτείνονται, ενώ σε συνθήκες όξινου pH, δηλαδή όπως και στο πείραμά μας, σε Citrate buffer conditions, pH=4.0, η $-\text{COO}^-$ ομάδα του PAA block πρωτονιώνεται σε $-\text{COOH}$, και το PAA κομμάτι χάνει την εκτεταμένη του διαμόρφωση στο χώρο και σταδιακά οι πολυμερικές του αλυσίδες (Drummond et al., 2000). Όσο οι καρβοξυλομάδες πρωτονιώνονται, τόσο το πολυμερές αποκτά μεγαλύτερο υδρόφοβο χαρακτήρα και αυξάνεται η επιφανειακή του προσρόφηση στη χιμαιρική διπλοστοιβάδα (Munavirovet al., 2014; Fujiwara et al., 1997; Pearson et al., 2013; Felber et al., 2014; Hao et al., 2015; Xia et al., 2016).



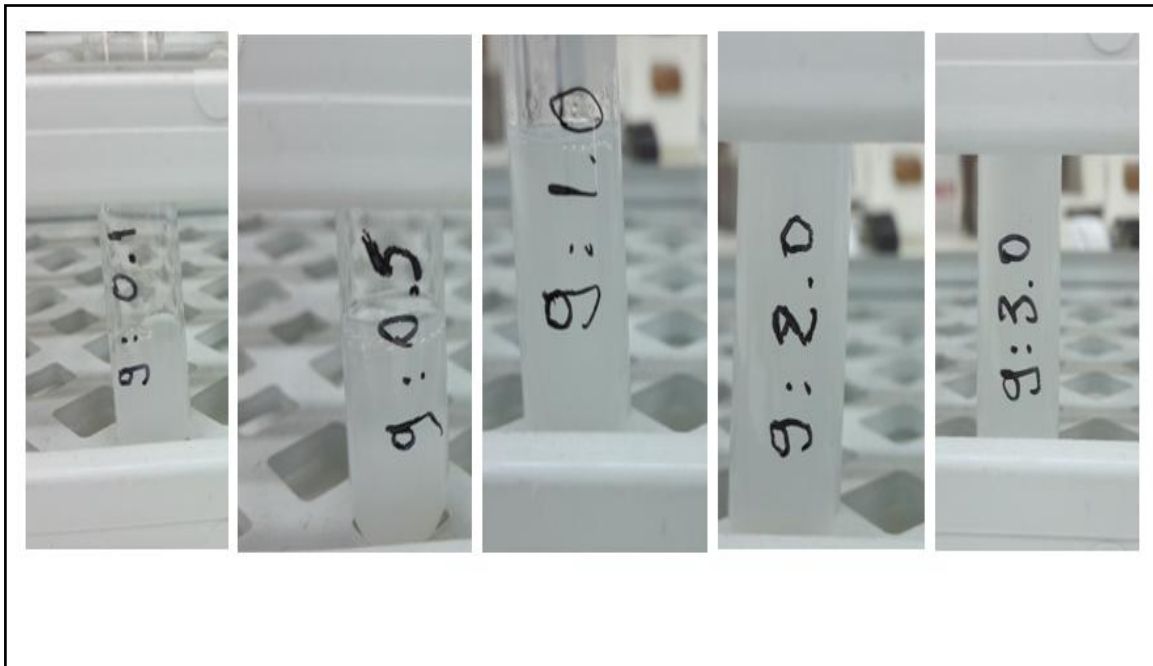
Το χημειοκωμικό λιποσωματικό σύστημα HSPC:PnBA-b-PAA 30/70 μοριακής αναλογίας 9:0.1 σε Citrate Buffer δεν παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα Z4, καθώς η D_h του αυξάνεται δραματικά πολύ, αγγίζοντας τα 14.5 μ m.



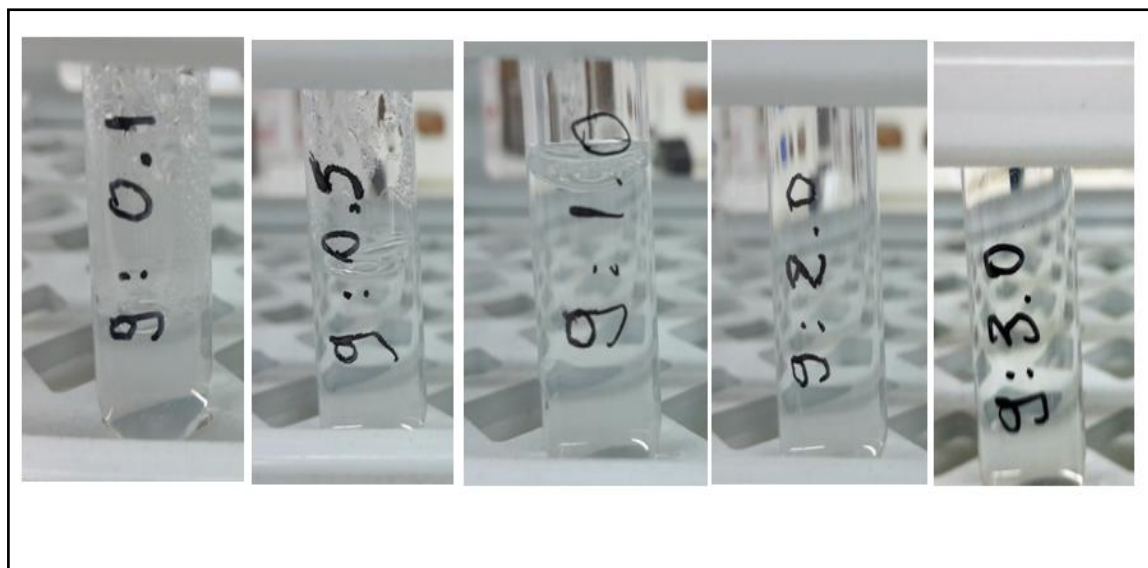
Z.2. Οπτικές παρατηρήσεις κατά την παρασκευή των χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0



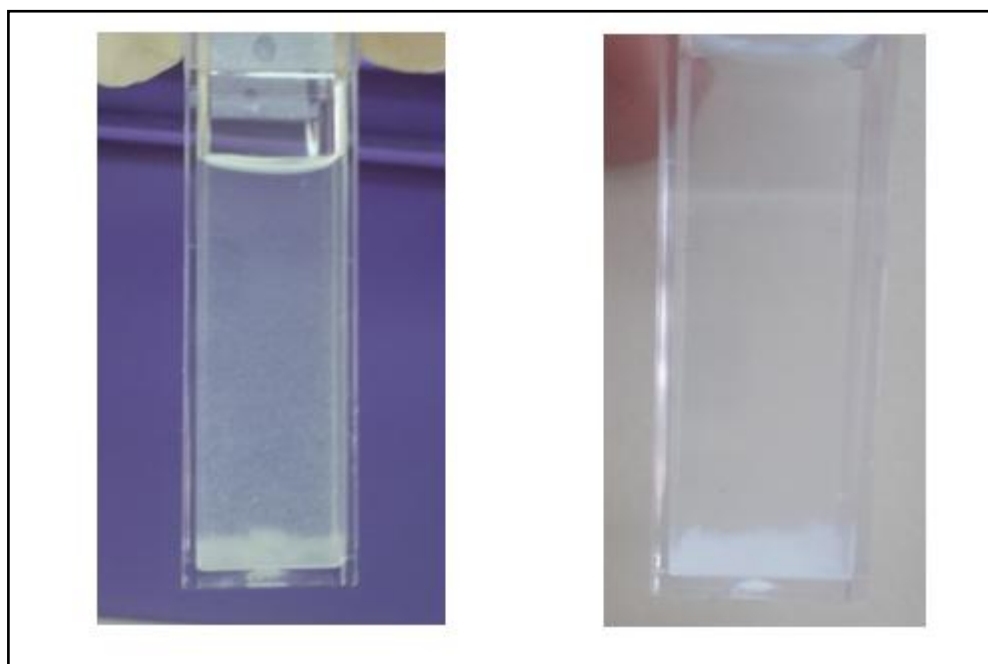
Εικόνα Z1: Εικόνα μακροσκοπικά μετά την παρασκευή των λεπτών λιπιδικών υμενίων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών (A) 9:0.1, (B) 9:0.5, (Γ) 9:1.0, (Δ) 9:2.0, (E) 9:3.0 v/v. Όλα είναι υπόλευκα, με εξαίρεση το σύστημα αναλογίας 9:0.1 v/v, που είναι διάφανο.



Εικόνα Z2: Εικόνα μακροσκοπικά μετά την ενυδάτωση των λεπτών λιπιδικών υμενίων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών (A) 9:0.1, (B) 9:0.5, (Γ) 9:1.0, (Δ) 9:2.0, (E) 9:3.0 v/v. Όλα τα κολλοειδή συστήματα είναι υπόλευκα-θολά.



Εικόνα Z3: Εικόνα μακροσκοπικά μετά την υπερήχηση με αισθητήρα των κολλοειδών συστημάτων HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακών αναλογιών (Α) 9:0.1, (Β) 9:0.5, (Γ) 9:1.0, (Δ) 9:2.0, (Ε) 9:3.0 v/v. Όλα τα κολλοειδή συστήματα είναι διαυγή.



Εικόνα Z4: Φαινόμενο καθίζησης, λόγω ραγδαίας και απότομης αύξησης της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, στο λιποσωματικό κολλοειδές σύστημα HSPC:PnBA PAA 30/70, μοριακής αναλογίας 9:0.1 v/v, μετά από την προσθήκη Citrate buffer (pH 4.0).

ⁱ Η “αληθινή ή πραγματική” τιμή (μ) του μετρούμενου μεγέθους σπάνια είναι γνωστή και αντ’ αυτής χρησιμοποιείται μια “παραδεκτή” τιμή, προς την οποία μπορούν να

συγκριθούν όλες οι πειραματικές τιμές. Μετά την εκτέλεση αριθμού (N) επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του μεγέθους και τη λήψη των αριθμητικών x_i , ως αντιπροσωπευτικότερη τιμή της (μ) προτείνεται ο αριθμητικός μέσος όρος ή μέση τιμή (mean, \bar{x}) των πειραματικών μετρήσεων. Η επαναληπτικότητα μίας σειράς μετρήσεων χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά μεταξύ τους βρίσκονται τα αποτελέσματα. Η επαναληπτικότητα είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων. Η τυπική (σταθερή) απόκλιση (Standard Deviation, SD) αποτελεί ένα μέτρο της επαναληπτικότητας μίας σειράς μετρήσεων (δηλαδή, στη συγκεκριμένη εργασία, εκφράζει τις αποκλίσεις των τιμών Dh, PDI, ζ-δυναμικού από τις τιμές κεντρικής τάσης).

Ορίζεται από τη σχέση:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Η ποσότητα $N-1$ καλείται και βαθμοί ελευθερίας. Επειδή στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία υπήρξε έλλειψη επαρκούς ποσότητας υλικών, δεν μπόρεσαν να δημιουργηθούν τρία δείγματα, όπως ορίζεται σε αντίστοιχες πειραματικές εργασίες. Αυτός είναι και ο λόγος που η SD υπολογίστηκε ενδοδειγματικά, στο ένα δείγμα που παρασκευάστηκε, για κάθε διαφορετική αναλογία. Πραγματοποιήθηκαν, δηλαδή, τρία σετ των δέκα μετρήσεων (συνολικά 30 μετρήσεις) από το όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων, στο ίδιο δείγμα, οι οποίες μετρήσεις επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Contin της Malvern και έδωσαν τα αποτελέσματα SD που λάβαμε. Επειδή ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 30 (>20), θεωρείται πως η τιμή \bar{x} πλησιάζει πολύ την τιμή μ και η τυπική απόκλιση s την τιμή της τυπικής αποκλίσεως του πληθυσμού (σ), που δίνεται από τη σχέση:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}} \text{ (Χατζηιωάννου, 2010).}$$

ii Ο δείκτης πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) αποτελεί ένα μέτρο κατανομής των λιποσωμάτων στο εκάστοτε δείγμα εναιωρήματος στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη. Πλέον η Παγκόσμια Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) απλοποιεί την ονομασία του PDI σε διασπορά και τη συμβολίζει με D . Ο PDI υπολογίζεται ως το πηλίκο του μέσου μοριακού βάρους (Weight Average Molecular Weight, M_w) προς

τον αριθμό του μέσου μοριακού βάρους (Number Average Molecular Weight, M_n).
Δηλαδή: $PDI=M_w/M_n$.

Ο M_w προσδιορίζεται με μεθόδους σκέδασης του φωτός, μέσω του τύπου:

$$M_w=(m_1M_1+m_2M_2+m_3M_3+\dots)/(m_1+m_2+m_3+\dots),$$

όπου m_1, m_2, m_3, \dots είναι οι μάζες των σωματιδίων (εδώ λιποσωμάτων) με μοριακό βάρος M_1, M_2, M_3, \dots αντίστοιχα.

Ο M_n προσδιορίζεται με μεθόδους χημικής ανάλυσης ή με μετρήσεις ωσμωτικής πίεσης, μέσω του τύπου:

$$M_n=(n_1M_1+n_2M_2+n_3M_3+\dots)/(n_1+n_2+n_3+\dots),$$

όπου n_1, n_2, n_3, \dots είναι τα moles των σωματιδίων (εδώ λιποσωμάτων) με μοριακό βάρος M_1, M_2, M_3, \dots αντίστοιχα (Attwood, 2007).