

## Χορήγηση φαρμάκων με τη βοήθεια πολυμερών: αποδέσμευση σαλικυλικού οξέος από πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ)

Σε αυτό το πείραμα θα γίνει εγκλεισμός σαλικυλικού οξέος σε μία πολυμερική μήτρα και θα μετρηθεί η απελευθέρωσή του σαν παράδειγμα χρήσης πολυμερών σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Το πείραμα εισάγει στις πρώτες αρχές που διέπουν την απελευθέρωση φαρμάκων από πολυμερικά υλικά.<sup>1</sup>

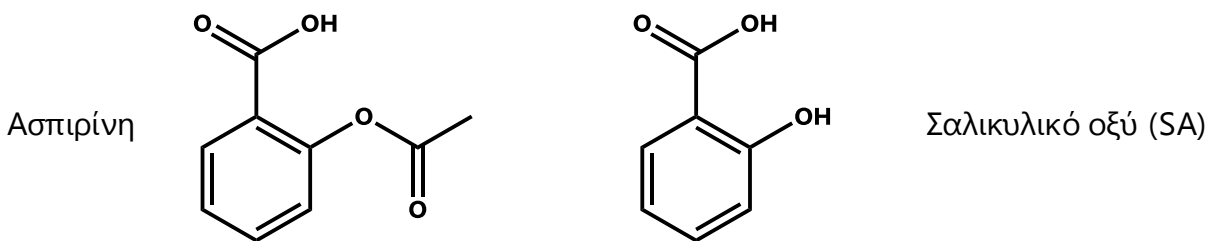


**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το δείγμα για το πείραμα αυτό θα πρέπει να παρασκευαστεί πριν από την προγραμματισμένη πειραματική μέρα.

### Ασπιρίνη και Σαλικυλικό Οξύ

Η ασπιρίνη (εμπειρική ονομασία για την ένωση 2-(ακετυλοξυ)βενζοϊκό οξύ ή οξικό σαλικυλικό οξύ, salicylic acid acetate) χρησιμοποιείται ευρέως ως αναλγητικό. Η φαρμακολογική δράση της ασπιρίνης οφείλεται στο σαλικυλικό οξύ (2-υδροξυβενζοϊκό οξύ salicylic acid, **SA**) που παράγεται στο σώμα από την υδρόλυση της ασπιρίνης.

Η φαρμακευτική ιστορία της ασπιρίνης είναι σχετικά πρόσφατη, η χρήση των φυτών όμως που περιέχουν δευτερευόντως σαλικυλικά παράγωγα χρονολογείται από την αρχαιότητα.<sup>2, 3</sup> Αρχικά αναφέρεται από Αιγύπτιους, Σουμέριους και τον Ιπποκράτη η χρήση αφεψημάτων που παρασκευάζονται από τα φύλλα και το φλοιό της ιτιάς για την αντιμετώπιση πόνων. Η ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού έγινε μόλις τον δέκατο ένατο αιώνα από τον Γάλλο χημικό C. F. Gerhardt.<sup>4</sup> Η ανακάλυψη της ασπιρίνης όμως αποδίδεται συχνότερα στον F. Hoffmann ο οποίος εξέλιξε την σύνθεση της ασπιρίνης για τα εργαστήρια της Bayer Chemical Co..<sup>5</sup>



Σχήμα 1: Χημική δομή ασπιρίνης και σαλικυλικού οξέος (SA).

Η ασπιρίνη είναι σήμερα ευρέως διαδεδομένη και χρησιμοποιείται σαν αναλγητικό, αντιφλεγμονώδες ή αντιπυρετικό ενώ δευτερευόντως έχει χρησιμοποιηθεί και για την αντιθρομβωτική της δράση. Το σαλικυλικό οξύ δρα παρεμποδίζοντας την σύνθεση προσταγλαδινών, οι οποίες αυξάνουν την διαπερατότητα νερού διαμέσου των τριχοειδών αγγείων, επιτρέποντας στο νερό να

περάσει στον γειτονικό ιστό πράγμα το οποίο μπορεί να προκαλέσει πόνο και οίδημα. Οι προσταγλαδίνες δρουν επίσης επί του θερμορυθμιστικού κέντρου του κεντρικού νευρικού συστήματος το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε πυρετό. Το σαλικυλικό οξύ, μειώνει την συγκέντρωση των προσταγλανδινών, με αποτέλεσμα να μπορεί να μειώσει πόνο, πυρετό και οιδήματα. Η ανακάλυψη ότι η ασπιρίνη αναστέλλει σχεδόν πλήρως το σχηματισμό των προσταγλανδινών και σχετικών ουσιών όπως η θρομβοξανή, βοήθησε στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης της ασπιρίνης και τιμήθηκε με το Νόμπελ Ιατρικής το 1982.<sup>6</sup>

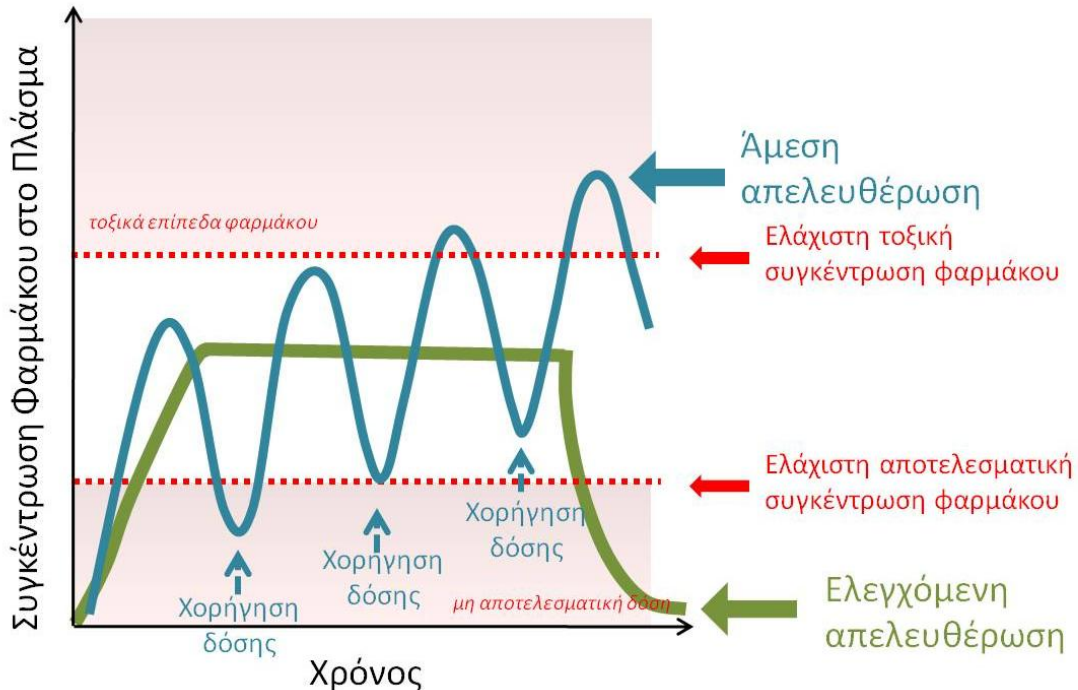
Το σαλικυλικό οξύ είναι ένα λευκό κρυσταλλικό στερεό που θα μπορούσε να ληφθεί από το στόμα, αλλά, όντας ένα σχετικά "ισχυρό" ασθενές οξύ [ $pK_a = 3,0$ ], προκαλεί ερεθισμό στο στόμα, τον οισοφάγο και το στομάχι. Ο F. Hoffman, του οποίου ο πατέρας έπασχε από αρθρίτιδα, ανακάλυψε ότι με τη χορήγηση ασπιρίνης αντί σαλικυλικού οξέος μπορούσαν να αποφευχθούν αυτές οι παρενέργειες. Η εμπορική σύνθεση της ασπιρίνης γίνεται με την βοήθεια μίας απλής αντίδρασης συμπύκνωσης μεταξύ του σαλικυλικού οξέος και οξικού ανυδρίτη. Η ανακάλυψη του Hoffman εξακολουθεί να αποτελεί μία τεράστια επιτυχία για την Bayer παρόλο που τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας έχουν εκπνεύσει προ πολλού.<sup>5</sup> Η ανακάλυψη και η εμπορευματοποίηση της ασπιρίνης ήταν μία από τις πρώτες περιπτώσεις σχεδιασμένης παροχής φαρμάκου.

## Μεταφορά Φαρμάκων

Συμβατικά η χορήγηση φαρμάκων περιλαμβάνει την άμεση παροχή του φαρμάκου από το στόμα ή ενδοφλεβίως. Πρόσφατες προσεγγίσεις στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων έχουν οδηγήσει σε φάρμακα τα οποία είναι περισσότερο ισχυρά αλλά έχουν μικρότερη διαλυτότητα (ή/και μεγαλύτερη τοξικότητα) από ότι οι προηγούμενες γενιές φαρμάκων. Οι συμβατικές μεθοδολογίες επομένως, καθίστανται όλο και λιγότερο αποτελεσματικές στην επίτευξη του βέλτιστου φαρμακοκινητικού ρυθμού χορήγησης φαρμάκων νέας γενιάς. Ο βέλτιστος φαρμακοκινητικός ρυθμός επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου φθάνει στο θεραπευτικό επίπεδο χωρίς να υπερβαίνει τη μέγιστη ανεκτή δόση, και στη συνέχεια η συγκέντρωση αυτή διατηρείται έως ότου να επιτευχθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα (Σχήμα 2). Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων ώστε η μεταφορά φαρμάκων να γίνεται πιο αποδοτικά και πιο αποτελεσματικά. Οι νέες τεχνικές περιλαμβάνουν συνήθως πολύπλοκα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με στόχο την χορήγησή τους από το στόμα ή ενδοφλεβίως καθώς και για την δημιουργία χειρουργικών εμφυτευμάτων.

Ο στόχος για πολλά από τα μελετούμενα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων είναι να επιτευχθεί ένας ρυθμός διανομής του φαρμάκου ο οποίος θα

παρέχει υψηλά, αλλά μη τοξικά, επίπεδα φαρμάκου στο αίμα για την επιθυμητή χρονική περίοδο.<sup>7</sup> Με την χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα (χάπια ή υγρό) ή ενδοφλεβίως, τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα κυμαίνονται σύμφωνα με το διάγραμμα που δίνεται στο Σχήμα 2 (μπλε γραμμή). Το επίπεδο της συγκέντρωσης του φαρμάκου αυξάνεται μετά από κάθε χορήγηση του φαρμάκου και στη συνέχεια μειώνεται μέχρι την χορήγηση της επόμενης δόσης. Η επιτυχία μιας φαρμακολογικής θεραπείας βασίζεται στην διατήρηση της διακύμανσης της συγκέντρωσης του ενεργού παράγοντα στο αίμα μεταξύ μιας μέγιστης τιμής (η οποία μπορεί να αναπαριστά ένα τοξικό επίπεδο), και μιας ελάχιστης τιμής (κάτω από την οποία το φάρμακο παύει να είναι αποτελεσματικό). Η βασική προϋπόθεση για την επιτυχία νέων συστημάτων ελεγχόμενης απελευθέρωσης του φαρμάκου βασίζεται στο σχεδιασμό τους που προβλέπει το επίπεδο του φαρμάκου στο αίμα να παραμένει σταθερό μεταξύ μίας μέγιστης και μίας ελάχιστης τιμής για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο (Σχήμα 2, πράσινη γραμμή).



Σχήμα 2. Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου με το χρόνο κατά την διάρκεια της άμεσης (μπλε γραμμή) ή ελεγχόμενης (πράσινη γραμμή) απελευθέρωσής του στο πλάσμα του αίματος.

Μία προσέγγιση για την επίτευξη στοχευμένης και παρατεταμένης παροχής φαρμάκου είναι ο εγκλεισμός του φαρμάκου σε μία μήτρα πολυμερούς. Το σύστημα παροχής του φαρμάκου οφείλει να είναι αρκετά σταθερό ώστε να μπορεί να μεταφερθεί στο στόχο του και να απελευθερώσει στη συνέχεια τον φαρμακευτικό παράγοντα για ένα ελεγχόμενο χρονικό διάστημα. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης μπορεί να περιλαμβάνει διάχυση έξω από την μήτρα του πολυμερούς ή

αποικοδόμηση της πολυμερικής μήτρας ή ένα συνδυασμό των δύο.

Ακόμα και στην περίπτωση που η απελευθέρωση φαρμάκου γίνεται κυρίως μέσω διάχυσης, η πολυμερική μήτρα θα πρέπει να είναι αποικοδομήσιμη, μη-τοξική και να έχει μη τοξικά προϊόντα αποικοδόμησης. Ιδιαίτερα όσον αφορά εμφυτεύματα, η αποικοδόμηση της πολυμερικής μήτρας κάνει την χειρουργική αφαίρεση περιττή. Το προφίλ αποικοδόμησης ενός πολυμερούς εξαρτάται από την χημική δομή του. Οι πολυεστέρες, για παράδειγμα, είναι γενικά πιο γρήγορα αποικοδομήσιμοι από τα πολυαμίδια. Ο ρυθμός αποικοδόμησης μίας πολυμερικής μήτρας εξαρτάται επίσης από την κρυσταλλικότητα (όσο υψηλότερη η κρυσταλλικότητα, τόσο πιο αργή είναι η αποικοδόμηση) και την υδροφιλικότητά της (τα υδρόφιλα πολυμερή γενικά αποικοδομούνται ταχύτερα από τα υδρόφοβα πολυμερή). Η μορφολογία του παρασκευάσματος καθορίζει επίσης τον ρυθμό απελευθέρωσης των φιλοξενούμενων φαρμάκων. Στα φαρμακευτικά παρασκευάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί διαφορετικές μορφολογίες πολυμερικών μητρών όπως για παράδειγμα μεμβράνες, πηκτώματα, κάψουλες, μικροκάψουλες, μικροσφαιρίδια και νανοσωματίδια. Τα μικροσφαιρίδια είναι ιδιαίτερα δημοφιλή επειδή παρασκευάζονται πιο εύκολα και είναι ενέσιμα σε διασπορά.

Η ζελατίνη (μετουσιωμένο κολλαγόνο) είναι ένα από τα πολυμερή που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο παρελθόν για τον εγκλεισμό βιοενεργών παραγόντων. Πρόσφατα, μια μεγάλη ποικιλία πολυμερικών παραγώγων ζελατίνης και μορφολογιών τους έχει χρησιμοποιηθεί για την χορήγηση φαρμάκων. Ένα συγκεκριμένο παράδειγμα είναι η χρήση πολυμερικών μικροσφαιρών για την ενθυλάκωση ηπαρίνης (αντιπηκτικό) που ακολουθείται από απομόνωση/παγίδευση των μικροσφαιριδίων σε μια αλγινική γέλη. Κατάποση των πηκτωμάτων έχει σαν αποτέλεσμα την προσρόφηση τους στα τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων η οποία ακολουθείται από ελεγχόμενη απελευθέρωση ηπαρίνης για μία περίοδο περίπου είκοσι πέντε ημερών.

Τα τελευταία χρόνια τα σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων και ιδιαίτερα οι δομές των πολυμερών που χρησιμοποιούνται στα συστήματα αυτά, έχουν εξελιχθεί και έχουν γίνει πιο εξεζητημένα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται και επιπλέον στόχοι από αυτόν της παράτασης της περιόδου αποδέσμευσης ενός συγκεκριμένου φαρμάκου.<sup>8, 9, 10</sup> Για παράδειγμα, τα σύγχρονα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων μπορούν να ανταποκριθούν σε αλλαγές του βιολογικού περιβάλλοντος και να διανείμουν ή να σταματήσουν να διανέμουν φάρμακα σύμφωνα με αυτές τις αλλαγές. Μία συγκεκριμένη μέθοδος χορήγησης φαρμάκου μπορεί επομένως να βασίζεται σε εξειδικευμένη στόχευση και εντοπισμό του φαρμάκου μειώνοντας τη συστηματική έκθεση του ασθενούς και/ή να αποσκοπεί σε παρατεταμένη ή διαρκή χορήγηση ενός φαρμάκου εξαλείφοντας την ανάγκη για πολλαπλές χορηγήσεις. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί στοχεύοντα συστήματα διανομής στα οποία ένα συγκεκριμένο σκεύασμα μπορεί να προσανατολιστεί ως προς το

κύτταρο, ιστό ή θέση όπου το φάρμακο το οποίο περιέχει πρέπει να απελευθερωθεί.

Ένα ιδανικό σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου θα πρέπει:

- ∅ να είναι αδρανές,
- ∅ να είναι βιοσυμβατό,
- ∅ να είναι μηχανικά ανθεκτικό,
- ∅ να μην ενοχλεί τον ασθενή,
- ∅ να είναι ικανό να μεταφέρει υψηλό φορτίο φαρμάκου,
- ∅ να είναι ασφαλές ως προς κάποια τυχαία αποδέσμευση,
- ∅ να είναι απλό στη χορήγηση και στην απομάκρυνση,
- ∅ να είναι εύκολο στη παρασκευή και στην αποστείρωση.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι και η πρόσφατη ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία της Διαταραχής Ελλειματικής Προσοχής - Υπερκινητικότητας (ADHD) ιδιαίτερα όσον αφορά παιδιά.<sup>11</sup> Σε αυτή τη διαταραχή τα φάρμακα άμεσης αποδέσμευσης δεν έχουν ικανοποιητικό αποτέλεσμα αφού η δράση τους δεν διαρκεί αρκετά ώστε τα παιδιά να μπορούν να αντεπεξέλθουν στις σχολικές τους υποχρεώσεις. Παράλληλα, τα περισσότερα αρκετά παιδιά με ADHD δεν είναι σε θέση ή δεν θέλουν να παίρνουν νέα δόση φαρμάκου στο σχολείο. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν *φάρμακα συνεχούς αποδέσμευσης* (ή αλλιώς μακράς δράσης), *ελεγχόμενης παράδοσης*, ή *παρατεταμένης αποδέσμευσης* με στόχο να δίνεται στο παιδί μία δόση κάθε ημέρα. Στα φάρμακα Ritalin SR<sup>®</sup>, Ritalin LA<sup>®</sup>, Metadate CD<sup>®</sup> και Concerta<sup>®</sup>, το δραστικό συστατικό είναι μεθυλοφαινιδάτη (α-φαινυλοπιπεριδινό-2-οξικός μεθυλεστέρας, methylphenidate). Η Ritalin SR<sup>®</sup> συσκευάζεται σε δισκία που περιέχουν κυτταρίνη και μια πρωτεΐνη καλαμποκιού (zein). Στην CD Metadate<sup>®</sup>, οι κάψουλες που χρησιμοποιούνται, περιέχουν το 30% της δόσης στην μορφή σφαιριδίων πολυμερούς άμεσης απελευθέρωσης και το υπόλοιπο 70% στην μορφή σφαιριδίων πολυμερούς παρατεταμένης απελευθέρωσης. Το φάρμακο Concerta<sup>®</sup> συσκευάζεται σε δισκία που περιέχουν οξική κυτταρίνη, υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-κυτταρίνη, και πολυαιθυλενογλυκόλη. Τα δισκία αποτελούνται από έναν πυρήνα και μια στιβάδα επικάλυψης του φαρμάκου που χωρίζονται από μια ημιπερατή μεμβράνη πολυμερούς. Αρχικά γίνεται άμεση απελευθέρωση του φαρμάκου από την επικάλυψη (~ 1 ώρα) και στην συνέχεια το νερό διεισδύει μέσω της μεμβράνης προς τον πυρήνα με αποτέλεσμα ένα πολυμερικό συστατικό του πυρήνα να διαστέλλεται και να αναγκάζει το φάρμακο να εξέλθει μέσω ενός στομίου που έχει προβλεφθεί στο δισκίο. Η μεμβράνη ελέγχει το ρυθμό με τον οποίο το νερό εισέρχεται στον πυρήνα, ο οποίος με τη σειρά του ελέγχει την απελευθέρωση του φαρμάκου. Το Adderall XR<sup>®</sup>, ένα άλλο φάρμακο για ADHD, αποτελείται από ένα μείγμα αμφεταμίνης συσκευασμένο σε ένα δισκίο που περιέχει σφαιρίδια που περιέχουν φάρμακο. Η σύνθεση τμήματος των σφαιριδίων βασίζεται σε ζελατίνη, η σύνθεση των υπολοίπων σφαιριδίων βασίζεται σε μια πολυμερική μήτρα υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-κυτταρίνης με συμπολυμερές

μεθακρυλικού οξέος. Το φάρμακο Strattera<sup>®</sup> περιέχει σαν ενεργή ουσία atomoxetine συσκευασμένη σε κάψουλες που περιέχουν άμυλο που έχει ζελατινοποιηθεί και είναι επικαλυμμένες με ένα περίβλημα ζελατίνης. Κάθε ένα από τα προηγούμενα παρασκευάσματα μπορεί να επιτύχει διαφορετικό ρυθμό παράδοσης της ενεργής ουσίας στον οργανισμό και να ικανοποιεί τις ανάγκες ανάλογα με τον ασθενή.

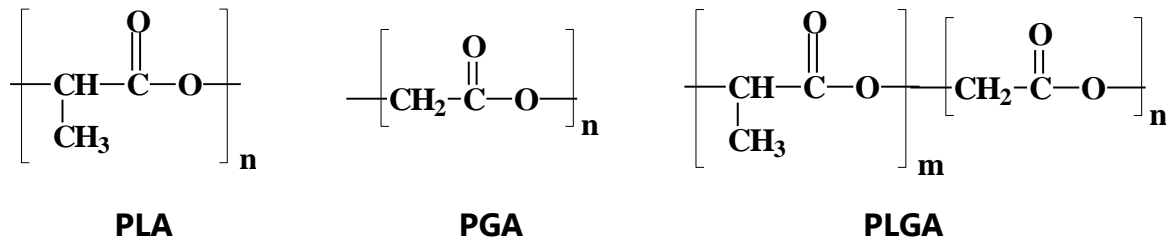
## **Αποικοδόμηση Πολυμερών**

Τα περισσότερα πετροχημικά πολυμερή φέρουν στην κύρια πολυμερική αλυσίδα μόνο απλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα οι οποίοι τα καθιστούν εξαιρετικά σταθερά. Παραδείγματα τέτοιων πολυμερών είναι οι πολυολεφίνες (πολυαιθυλένιο, πολυβινύλοχλωρίδιο, πολυπροπυλένιο και πολυστυρένιο). Το πολύ(τερεφθαλικό αιθυλένιο) [PET] είναι ένα συνθετικός πολυεστέρας που περιέχει ένα ετεροάτομο στην κύρια πολυμερική αλυσίδα. Στην γενική περίπτωση, η παρουσία ενός ετεροατόμου στην κύρια πολυμερική αλυσίδα καθιστά το πολυμερές βιοαποικοδομήσιμο. Το PET και παράγωγά του όμως είναι μη αποικοδομήσιμα εξαιτίας της υψηλής τους κρυσταλλικότητας που αναστέλλει την υδρόλυση. Στην κατηγορία των βιοδιασπώμενων πετροχημικών πολυμερών περιλαμβάνονται τα πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA), πολυ(αιθυλενογλυκόλη), πολυκαπρολακτόνη (PCL) και πολυ(γλυκολικό οξύ). Το πολυμερές PVA αποτελεί ιδιαίτερη περίπτωση αφού παρόλη την έλλειψη ετεροατόμου στην κύρια ανθρακική αλυσίδα, αποικοδομείται μέσω υδρόλυσης που διευκολύνεται από την ύπαρξη ομάδα υδροξυλίου σε εναλλασσόμενα άτομα άνθρακα της κύριας πολυμερικής αλυσίδας.

Τα βιοπολυμερή είναι εγγενώς βιοδιασπώμενα. Σε αφθονία υπάρχουν βιοπολυμερή όπως πολυσακχαρίτες φυτών με παράδειγμα το άμυλο (που αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη), η κυτταρίνη, η αγαρόζη και καραγενάνη καθώς και πολυσακχαρίτες ζώων, όπως η χιτίνη και οι γλυκοσαμινογλυκάνες. Στην κατηγορία των βιοπολυμερών ανήκουν και πρωτεΐνες που συναντάμε σε αφθονία στην Φύση όπως ζελατίνη (μετουσιωμένο/υδρολυμένο κολλαγόνο), κασεΐνη, κερατίνη και οι πρωτεΐνες του μεταξιού. Οι βιοδιασπώμενοι πολυεστέρες παράγονται και από μικροοργανισμούς οι οποίοι τους χρησιμοποιούν για αποθήκευση ενέργειας και σαν πηγή άνθρακα. Κάποιοι από αυτούς τους πολυεστέρες παράγονται πλέον και εμπορικά με την βοήθεια ζύμωσης. Η δομή τους εξαρτάται από το μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιείται και το μονομερές που παρέχεται.

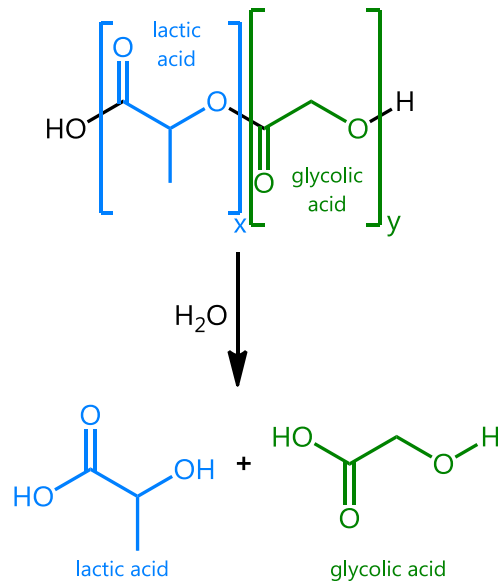
Το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) είναι ένα συνθετικό, βιοδιασπώμενο, εμπορικά διαθέσιμο πολυμερές. Το μονομερές το γαλακτικό οξύ παράγεται σε μεγάλες ποσότητες μέσω ζύμωσης ενώ στη συνέχεια το πολυμερές συντίθεται με συμβατικές μεθόδους πολυμερισμού.

Σε αυτό το πείραμα θα ενσωματώσετε σαλικυλικό οξύ σε μία μήτρα του συμπολυμερούς πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA).



Σχήμα 3: Χημική δομή PLA, PGA, PLGA.

Το συμπολυμερές PLGA (Σχήμα 3) είναι εμπορικά διαθέσιμο σε δομές που διαφέρουν μεταξύ τους στην αναλογία LA/GA και/ή στα μοριακά βάρη. Η οικογένεια αυτή των πολυμερών εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων με πολλές -συνήθως- βιοϊατρικές- εφαρμογές. Τα πολυμερή PLA, PGA, PLGA είναι σύμφωνα με την βιβλιογραφία βιοδιασπώμενα, βιοσυμβατά, και μη τοξικά. Έχουν χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από 20 χρόνια και έχουν βρει εφαρμογή στη χορήγηση φαρμάκων, τη θεραπεία τραυμάτων και την δημιουργία εμφυτευμάτων. Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε διάφορες εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων είναι τα PLA και PLGA. Το PLGA είναι περισσότερο υδρόφιλο από το PLA και επομένως αποικοδομείται ταχύτερα υδρολυτικά.




Σχήμα 4: Υδρόλυση PLGA

Μία εντελώς διαφορετική προσέγγιση αφορά την αυξανόμενη χρήση των βιοαποδομήσιμων και λιπασματοποιήσιμων πολυμερών και πλαστικών σε εφαρμογές προϊόντων μεγάλης κλίμακας, όπως σακούλες σκουπιδιών και προϊόντων που αφορούν επιχειρήσεις εστίασης (πλαστικά πιρούνια, κουτάλια, κύπελλα και πιάτα) για την βιομηχανία και για οικιακή χρήση. Η ανάπτυξη των βιοαποδομήσιμων και

λιπασματοποιήσιμων πλαστικών εν μέρει καθοδηγείται από την ανάγκη διαχείρισης αποβλήτων. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό που απαιτείται σε αυτόν τον τομέα είναι η παρασκευή πλαστικών από ανανεώσιμη βιομάζα η οποία μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση των μη ανανεώσιμων πηγών ορυκτών.



### **Πειραματική Διαδικασία - προετοιμασία ΠΡΙΝ από την προγραμματισμένη εργαστηριακή μέρα**

Εργαστείτε στην εστία  χρησιμοποιώντας συσκευή μαγνητικής ανάδευσης. Τοποθετήστε μια μικρή μαγνητική ράβδο σε ένα ποτήρι ζέσεως (~ 50 mL). Προσθέστε 1.5 mL χλωροφορμίου και 10.0 mg του πολυμερούς PLGA. Αναδεύστε μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές χωρίς να θερμάνετε. Εξετάστε το διάλυμα προσεκτικά και επιβεβαιώστε ότι όλο το πολυμερές έχει διαλυθεί και δεν παραμένει προσκολλημένο πάνω στη ράβδο ανάδευσης ή στα τοιχώματα του ποτηριού ζέσεως. Η πλήρης διάλυση του πολυμερούς μπορεί να διαρκέσει αρκετά λεπτά.

Προσθέστε 5.0 mg σαλικυλικού οξέος στο διάλυμα και συνεχίστε την ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως χωρίς να θερμάνετε. Αναδεύστε για πέντε επιπλέον λεπτά. Τέλος, τοποθετήστε το διάλυμα σε ένα πιάτο εξάτμισης και αφήστε στην εστία έως ότου φύγει ο διαλύτης.

### **Πειραματική Διαδικασία - Προγραμματισμένη Εργαστηριακή μέρα**



Ενεργοποιήστε το UV-VIS φασματόμετρο αν δεν είναι ήδη σε λειτουργία. Το μηχάνημα θα πρέπει τεθεί σε λειτουργία τουλάχιστον 15 λεπτά πριν από τη χρήση.

### **Συλλογή δειγμάτων**

Τοποθετήστε 4.5 mL αποσταγμένου νερού σε φιαλίδιο των 12 ml και τοποθετήστε τη φιάλη σε υδατόλουτρο στους 25°C μέχρι να επιτευχθεί θερμική ισορροπία. Τοποθετήστε μια δεύτερη φιάλη με νερό σε υδατόλουτρο των 37°C.

Ζυγίστε  $5.0 \pm 1.0$  mg της ξηρής μεμβράνης PLGA-SA, καταγράψτε το ακριβές βάρος. Τοποθετήστε το δείγμα σε ένα άδειο ποτήρι φιαλίδιο και στηρίξτε σε υδατόλουτρο, έτσι ώστε όταν προστεθούν τα 4 mL νερού το επίπεδο του διαλύματος στο φιαλίδιο να είναι κάτω από το επίπεδο του νερού στο υδατόλουτρο. Τοποθετήστε ένα δεύτερο δείγμα PLGA-SA στο υδατόλουτρο των 37°C.

Κατά την προσθήκη του νερού στο δείγμα, το SA θα αρχίσει αμέσως να απελευθερώνεται. Για την παρακολούθηση της απελευθέρωσης του SA, συλλέξτε περιοδικά κλάσματα του 500 μl με πιπέτα ακριβείας αρχίζοντας με (ονομαστικά) μηδενικό χρόνο δειγματοληψίας και συνεχίζοντας μετά από 3 λεπτά, 5 λεπτά, 15



λεπτά, 30 λεπτά, 60 λεπτά, 90 λεπτά, και 120 λεπτά και τοποθετήστε τα δείγματα που συλλέγετε σε πλαστικές κυψελίδες. Ανακατεύετε το περιεχόμενο του ποτηριού περιοδικά.

Όταν είστε έτοιμοι να ξεκινήσετε τις μετρήσεις, προσθέστε το νερό που βρίσκεται στο υδατόλουτρο των 25°C στο δείγμα, ανακατέψτε μία φορά και αφαιρέστε αμέσως το πρώτο σας δείγμα. Στο τέλος των δύο ωρών θα έχετε συλλέξει οκτώ δείγματα.

Αφού λάβετε τα πρώτα δείγματα από το διάλυμα που βρίσκεται στους 25 °C, μπορείτε να αρχίσετε τη δειγματοληψία στους 37°C. Δώστε ιδιαίτερη προσοχή στην σήμανση των δειγμάτων. Μπορείτε να αρχίσετε την ανάλυση των δειγμάτων πριν από το τέλος των δύο ωρών.

### **Ανάλυση δειγμάτων**

Το SA σε καθένα από τα δείγματα θα συμπλοκοποιηθεί με το ιόν μετάλλου μεταπτώσεως  $Fe^{3+}$ . Το σύμπλοκο SA- $Fe^{3+}$  έχει μωβ-ροζ χρώμα και μέγιστη απορρόφηση κοντά στα 535 nm. Θα μετρηθεί η απορρόφηση του συμπλόκου που σχηματίζεται καθώς προστίθεται σίδηρος στα δείγματα της μελέτης απελευθέρωσης SA.

Υπό τις συνθήκες αυτού του πειράματος, το ιόν σιδήρου είναι σε περίσσεια έτσι ώστε η συγκέντρωση του συμπλόκου να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος στο διάλυμα. Σύμφωνα με τον νόμο του Beer η απορρόφηση του διαλύματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος στο διάλυμα.

Προσθέστε 1.00 mL απιονισμένου νερού και 1 ml του αντιδραστηρίου  $Fe^{3+}$  [1.0% (w/v)  $FeCl_3$ , 1.0% (w/v) HCl] σε κάθε ένα από τα δείγματα που έχετε συλλέξει και ανακατέψτε καλά πριν από κάθε μέτρηση.

Προσθέστε 1.00 ml του αντιδραστηρίου  $Fe^{3+}$  σε 1.50 ml αποσταγμένου νερού σε νέα κυψελίδα. Αυτό θα είναι το *διάλυμα αναφοράς* για τις μετρήσεις απορρόφησης.

### **Λευκό Πείραμα**

Για να δειχθεί ότι η ενθυλάκωση του σαλικυλικού οξέος στη μήτρα του πολυμερούς επιβραδύνει την απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος, θα μετρηθεί παράλληλα και διάλυμα καθαρού σαλικυλικού οξέος. Ακολουθήστε το ίδιο πρωτόκολλο όπως παραπάνω. Για την Παρασκευή του δείγματος διαλύστε 3.0 mg SA αντί για το δείγμα εγκλεισμού στο πολυμερές σε 1 ml αιθανόλης και φέρετε στον ίδιο τελικό όγκο (4ml).

Μετά την προσθήκη νερού στο σαλικυλικό οξύ, θα ληφθούν δείγματα σε (ονομαστικό) χρόνο μηδέν και μετά από 3, 5, 10, 15, και 30 λεπτά.

Όταν έχουν ληφθεί και φιλτραριστεί όλα τα δείγματα, μεταφέρετε 1.00 mL από το

καθένα σε κυψελίδα, προσθέστε 1.00 ml του αντιδραστηρίου  $\text{Fe}^{3+}$  [1.0% (w/v)  $\text{FeCl}_3$ , 1.0% (w/v)  $\text{HCl}$ ] σε κάθε ένα από τα δείγματα και ανακατέψετε. Μετρήστε την απορρόφηση όπως πριν.

Εάν υπάρχει χρόνος, επαναλάβετε το λευκό πείραμα στους 37 ° C.

Όταν τελειώσετε τη συλλογή δεδομένων, απενεργοποιήστε το φασματόμετρο και καθαρίστε τα γυαλικά σας.

**Υπολογισμοί και Αναφορά (Οι πρώτες δύο ερωτήσεις είναι καλύτερο να απαντηθούν πριν την εκτέλεση του πειράματος)**

1. Σύμφωνα με τον Νόμο του Beer,  $A = \epsilon l c$ , για μήκος κυψελίδας  $l = 1.00$  cm, υπολογίστε τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης του συμπλόκου σαλικυλικού οξέος- $\text{Fe}^{3+}$  σε pH 7 από τα παρακάτω δεδομένα. Επίσης, υπολογίστε την εκτιμώμενη τυπική απόκλιση.

Συγκέντρωση ( $10^{-4}$ M)	Απορρόφηση σε $\lambda_{\text{max}}$
2.64	0.377
5.27	0.816
7.91	1.216
10.53	1.623
13.16	2.017

2. Με βάση τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης που υπολογίσατε, προσδιορίστε την αναμενόμενη απορρόφηση ενός διαλύματος που περιέχει 12 mg σαλικυλικού οξέος σε 40 mL νερού, αν αυτό το διάλυμα αραιωθεί 1:1 με την προσθήκη του αντιδραστηρίου  $\text{Fe}^{3+}$ .
3. Σχεδιάστε (με την βοήθεια του προγράμματος Excel) τα γραφήματα της απορρόφησης ως προς τον χρόνο για κάθε ένα από τα πειράματα απελευθέρωσης του φαρμάκου και το λευκό πείραμα. Πως συγκρίνεται η παρατηρηθείσα απορρόφηση σε μεγάλους χρόνους με την τιμή που υπολογίσατε στην ερώτηση 2; Αιτιολογήστε. Υπολογίστε τον χρόνο που χρειάστηκε για να απελευθερωθεί το 50% του σαλικυλικού οξέος σε κάθε περίπτωση και συνοψίστε σε ένα πίνακα. Σχολιάστε την εξάρτηση από την θερμοκρασία.
4. Στην χρονική κλίμακα αυτού του πειράματος, η απελευθέρωση του φαρμάκου εξαιτίας της αποικοδόμησης του πολυμερούς δεν είναι σημαντική: Το πολυμερές είναι βιοαποικοδομήσιμο σε μία περίοδο ημερών ή εβδομάδων, αλλά όχι στους χρόνους του πειράματος. Η κινητική της απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος καθορίζεται από τη διάχυση του νερού μέσα στη μεμβράνη του πολυμερούς, τη διάλυση του σαλικυλικού οξέος, και την διάχυση έξω του σαλικυλικού οξέος από την μεμβράνη. Έτσι προκύπτει μία σύνθετη κινητική για την απελευθέρωση του σαλικυλικού οξέος. Εμπειρικά η απελευθέρωση του φαρμάκου μπορεί να προσεγγιστεί από την εξίσωση:

$$\text{Κλάσμα του φαρμάκου που απελευθερώθηκε σε χρόνο } t = k t^n,$$

όπου  $k$  είναι η σταθερά απελευθέρωσης και  $n$  είναι μία σταθερά μικρότερη του 2.

Αν υποθεθεί ότι η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη προς το κλάσμα του φαρμάκου που απελευθερώθηκε σε χρόνο  $t$ , τότε:

$$A(t) = k' \cdot t^n$$
$$\ln A(t) = \ln k' + n \ln t$$

Σχεδιάστε το γράφημα της τιμής  $\ln A(t)$  ως προς  $\ln t$  για κάθε ένα από τα πειράματά σας. Τα γραφήματα δεν θα είναι γραμμικά, κάτι που επιβεβαιώνει την πολυπλοκότητα της κινητικής απελευθέρωσης. Σχολιάστε την τιμή της σταθεράς  $n$  καθώς ο χρόνος  $t$  τείνει στο 0 (δηλαδή την αρχική κλίση στο διάγραμμα  $\ln$ - $\ln$ ).

5. Σε ένα πίνακα, δείξτε τις τιμές των  $\ln k'$  και  $k'$  σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας για τα λευκά πειράματα και τα πειράματα απελευθέρωσης του σαλικυλικού οξέος. Είναι η σταθερά απελευθέρωσης  $k'$  για το σαλικυλικό οξύ μικρότερη ή μεγαλύτερη όταν αυτό βρίσκεται εγκλεισμένο στην πολυμερική μήτρα;

Πως επηρεάζει η μεταβολή της θερμοκρασίας την τιμή της σταθεράς απελευθέρωσης του φαρμάκου. Υποθέστε συμπεριφορά Arrhenius,

$$\ln \left( \frac{k_2}{k_1} \right) = - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

Από την παρατηρούμενη εξάρτηση από την θερμοκρασία υπολογίστε την φαινομενική ενθαλπία ενεργοποίησης για την απελευθέρωση σαλικυλικού οξέος στο λευκό πείραμα και την μήτρα πολυμερούς.

## Αναφορές

- <sup>1</sup> Ανάπτυξη πειράματος σύμφωνα με πρότυπο πείραμα από το Παν/μιο του Binghamton, Biophysical Chemistry Course (Prof. E. Stevens).
- <sup>2</sup> Jack, D. B. *The Lancet*, **1997**, 350, 437.
- <sup>3</sup> Lévesque, H., Lafont, O. *Rev. Méd. Interne*, **2000**, 21, S8.
- <sup>4</sup> Gerhardt, C.F. *Liebig's Annalen*, **1853**, 87, 149.
- <sup>5</sup> U.S. patent [Patent 644,077](#), **1900**.
- <sup>6</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1982/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1982/)
- <sup>7</sup> Santusa, G., Baker, R. W. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition), 2001 Elsevier Science Ltd., **2003**, [791](#).
- <sup>8</sup> Langer R., *Nature*. **1998**, 392, 5.
- <sup>9</sup> Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz N., Couvreur, P. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 1147.
- <sup>10</sup> Rösler, A., Vandermeulen, G.W.M., Klok H.-A. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, 64, 270.
- <sup>11</sup> Hosenbocus, S., Chahal, R. *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **2009**, 18, 331.