

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ, ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:
ΥΔΡΟΓΕΛΕΣ ΛΑΡΟΝΙΤΕ® XL-21 XR ΩΣ ΑΠΟΚΡΙΣΙΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΟΣΤΕΟΠΟΡΩΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: ΝΙΡΓΙΑΝΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2023

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



POSTGRADUATE PROGRAMME:
*ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH
BIOLOGICAL ACTIVITY*

CRYSTAL ENGINEERING, GROWTH AND DESIGN LABORATORY

MASTER'S THESIS:

**LAPONITE® XL-21 XR HYDROGELS AS STIMULI-RESPONSIVE
SYSTEMS FOR THE RELEASE OF ANTI-OSTEOPOROTIC DRUGS**

AUTHOR: NIRGIANAKI KALLIOPI
MASTER THESIS SUPERVISOR: KONSTANTINOS DEMADIS

HERAKLION 2023

Εξεταστική Επιτροπή (Αλφαβητικά):

Δημάδης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας (Επιβλέπων)

Νεοχωρίτης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Σπύρος Απόστολος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού κρυστάλλων του Τομέα Ανόργανης Χημείας, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά τη χρονική περίοδο 2020-2023, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Απομόνωση και Σύνθεση φυσικών προϊόντων με βιολογική δραστικότητα», του Τμήματος Χημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Δημάδη για την εμπιστοσύνη και τη συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, καθώς επίσης και τον καθηγητή και CEO Mr. Bernd Diehl που δέχτηκε να με επιβλέψει στα πλαίσια του προγράμματος «Erasmus Placement» που πραγματοποιήθηκε από 1-10-2022 έως και 31-1-2023 στην εταιρεία Spectral Service AG (Κολωνία, Γερμανία).

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας για τις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό που μου παρείχε, όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και βοήθεια τους καθώς και την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Κωνσταντίνο Νεοχωρίτη και κ. Απόστολο Σπύρο που δέχτηκαν να γίνουν μέλη της 3-μελούς Επιτροπής μου και να αξιολογήσουν το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσής μου.

Καλλιόπη Νιργιανάκη
Ηράκλειο 2023

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

📍 Λυκάστου 19, Πόρος, 71307, Ηράκλειο, Κρήτη (Ελλάδα)

☎ (+30) 6942949033

✉ kallia.niryanakis@gmail.com

 <https://www.linkedin.com/in/kallia-nirgianaki-008593209/>

Ημερομηνία Γέννησης: 31/03/1998 | Εθνικότητα: Ελληνική

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2020-παρόν

Υποψήφια μεταπτυχιακός φοιτήτρια και εκπόνηση διπλωματικής εργασίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κωνσταντίνου Δημάδη, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο (Βαθμός: 9.17/10)

2016-2020

Πτυχίο στην Χημεία (Βαθμός: 8.06/10)
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

Προπτυχιακή έρευνα υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κωνσταντίνου Δημάδη με τίτλο: “Μέταλλο-φωσφονικά παράγωγα του αντιοστεοπορωτικού φαρμάκου Clodronate και ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας” (Βαθμός: 10/10).

Εργαστήριο Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού Κρυστάλλων, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

➤ Γλώσσες:

Αγγλικά-Michigan certificate of English language competency (Επίπεδο: B2) | Ελληνικά (Μητρική)

Κοινό Ευρωπαϊκό πλαίσιο αναφοράς

http://europass.cedefop.europa.eu/sites/default/files/europass_cv_instructions_en.pdf

➤ Εμπειρία στην χρήση αναλυτικών οργάνων:

NMR spectrometer (300 MHz, 500 MHz, 600 MHz) | UV-VIS spectrophotometer | ATR-IR spectrometer

➤ Ηλεκτρονικές Δεξιότητες:

Microsoft Office Suite (Word, Excel, PowerPoint) | OriginPro 85 | IGOR | Mercury | EFT IR | ChemDraw Professional | ACD/ChemSketch

➤ Δίπλωμα Οδήγησης: B

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΚΑΙ ΒΡΑΒΕΙΑ

- 01/10/2022-31/1/2023** Υπότροφος για Πρακτική άσκηση στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών (Erasmus+) στην αναλυτική εταιρεία Spectral Service AG (Κολωνία, Γερμανία) που ειδικεύεται στην φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού.
- 2017** Υπότροφος του ιδρύματος Χρυσάνθου και Αναστασία Καρύδη
- 2016** Βραβείο εισαγωγής (πρώτη στην κατάταξη) στο Τμήμα Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης από το τοπικό παράρτημα της Ένωσης Ελλήνων Χημικών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 06/2021-08/2021** Εκτέλεση επικουρικού έργου ως εργαστηριακός βοηθός στα εκπαιδευτικά εργαστήρια της Ανόργανης Χημείας (I και II) στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 02/2018-05/2018** Εργαστηριακός βοηθός παρασκευής διαλυμάτων στα εκπαιδευτικά εργαστήρια Γενικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

«Surface-Modified Silica Hydrogels for the Controlled Release of the Anti-Osteoporosis Drug Etidronate»

Alatzoglou, F.-E.G.; Vassaki, M.; **Nirgianaki, K.**; Tripodianos, E.; Turhanen, P.; Demadis, K.D.*; Papathanasiou, K.E.* Journal of Drug Delivery Science and Technology **2023**, under review.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Μέλος της ένωσης Ελλήνων Χημικών


CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

📍 Lykastou 19, Poros, 71307, Heraklion, Crete (Greece)

☎ (+30)6942949033

✉ kallia.niryanakis@gmail.com

 <https://www.linkedin.com/in/kallia-nirgianaki-008593209/>

Date of Birth: 31/03/1998 | Nationality: Greek

EDUCATION

2020-present Postgraduate student and master's thesis supervised by Prof. Konstantinos D. Demadis, University of Crete, Department of Chemistry, Heraklion (Grade: 9.17/10)

2016-2020 **B. Sc. In Chemistry**, (Grade: 8.06/10)
University of Crete, Department of Chemistry, Heraklion

Undergraduate research, supervised by Prof. Konstantinos D. Demadis entitled: "Metal-Phosphonate derivatives of the antiosteoporotic drug Clodronate and Controlled release studies of the active drug (Grade: 10/10).

Crystal Engineering, Growth and Design Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion

SKILLS

➤ Languages:

English-**Michigan certificate of English language competency** (Level:B2)| Greek (native speaker)

Common European Framework of Reference for Languages

http://europass.cedefop.europa.eu/sites/default/files/europass_cv_instructions_en.pdf

➤ Efficiently operating:

NMR spectrometer (300 MHz, 500 MHz, 600 MHz) | UV-VIS spectrophotometer | ATR-IR spectrometer

➤ IT Skills:

Microsoft Office Suite (Word, Excel, PowerPoint) | OriginPro 85 | IGOR | Mercury | EFT IR | ChemDraw Professional | ACD/ChemSketch

➤ **Driving Licence:B**

FELLOWSHIPS

01/10/2022-31/12/2023 Fellowship for Traineeship in the framework of Erasmus placement program, at Spectral Service AG (Cologne, Germany) which specializes in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

2017 Scholarship of the institution Chrisanthou and Anastasia's Karidi

2016 Rewarded for the highest entrance grade in the University of Crete, Department of Chemistry (2016) by the local department of the Greek Chemist Association

LABORATORY EXPERIENCE

06/2021-08/2021 Teaching assistant at the Undergraduate Inorganic Chemistry Laboratory (I and II), at the University of Crete, Department of Chemistry.

02/2018-05/2018 Laboratory Assistant at the General Chemistry Laboratory for undergraduate students at the University of Crete, Department of Chemistry

PUBLICATIONS

«Surface-Modified Silica Hydrogels for the Controlled Release of the Anti-Osteoporosis Drug Etidronate»

Alatzoglou, F.-E.G.; Vassaki, M.; **Nirgianaki, K.**; Tripodianos, E.; Turhanen, P.; Demadis, K.D.*; Papathanasiou, K.E.* Journal of Drug Delivery Science and Technology **2023**, under review..

MEMBERSHIPS

Greek Chemists' Association

Περίληψη

Οι διφωσφονικές ενώσεις αποτελούν μία οικογένεια φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης και άλλων ασθενειών που αφορούν τα οστά. Τα διφωσφονικά αποτελούν σταθερότερο χημικό ανάλογο του πυροφωσφορικού οξέος, το οποίο λαμβάνει μέρος στα μεταβολικά μονοπάτια ρύθμισης εναπόθεσης ασβεστίου (ασβεστοποίηση). Μερικά από τα μειονεκτήματα των προαναφερόμενων ενώσεων, αποτελούν η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, η μειωμένη βιοσυμβατότητα και ο γρήγορος μεταβολισμός τους, επάγοντας μία πληθώρα παρενεργειών. Συνεπώς, η ανάπτυξη έξυπνων συστημάτων μεταφοράς τους είναι αναγκαία για την αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής τους ικανότητας.

Το ορυκτό Laronite[®] ανήκει σε μία τάξη φυλλοπυριτικών αργίλων, το οποίο είναι αδιάλυτο στο νερό, αλλά μπορεί να υποστεί ισχυρή ενυδάτωση σχηματίζοντας υδρογέλες με υψηλή θιξοτροπική ικανότητα. Η θιξοτροπία αποτελεί ιδιότητα των κολλοειδών διαλυμάτων διασποράς, και εκφράζεται με τη μετατροπή τους από υδρογέλες σε κολλοειδή διαλύματα με αντιστρεπτό τρόπο, όταν τους ασκείται εξωτερική πίεση ή ανακινούνται. Οι υδρογέλες Laronite[®] είναι μη τοξικές και βιοσυμβατές. Ως φυσικό επακόλουθο, χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα για την ρύθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Επιπρόσθετα, τα διαλύματα διασποράς τους σχηματίζουν μία ιδιαίτερη δομή ονομαζόμενη “house-of-cards”. Αυτή επιτρέπει το σχηματισμό κενών χώρων και μπορεί να υποστεί διαμητική αραίωση, καθιστώντας τα ιδανικά ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων για ενέσιμη χορήγηση. Κατά αυτό τον τρόπο η θεραπεία μπορεί να εκτελεστεί με πιο στοχευμένο τρόπο μειώνοντας την εμφάνιση παρενεργειών και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά της.

Στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η παρασκευή σταθερών υδρογελών Laronite[®] XL-21 XR ($F_{18}Mg_{16}Na_{10}O_{66}Si_{27}$) που φέρουν το αντιοστεοπορωτικό φάρμακο Etidronic acid ($CH_3C(OH)(PO_3H_2)_2$), και η αξιολόγησή τους, ως αποκρίσιμα σε εξωτερικούς παράγοντες συστήματα, για την ελεγχόμενη αποδέσμευση του ενθυλακωμένου φαρμάκου.

Η φόρτωση του Etidronic acid στις υδρογέλες Laronite[®] ήταν αποτελεσματική, διότι μπορεί να αλληλεπιδράσει ηλεκτροστατικά ή να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με το πυριτικό δίκτυο του αργίλου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ελεγχόμενης αποδέσμευσης σε τεχνητά υδατικά συστήματα που προσομοιάζουν το ανθρώπινο στομάχι (pH 1.3) και το πλάσμα του αίματος (pH 7.4). Υδρογέλες Laronite[®] φορτωμένες με φάρμακο Etidronic acid

παρασκευάστηκαν και αφέθηκαν να ωριμάσουν σε ποτήρια ζέσεως. Κατόπιν, προστέθηκε προσεκτικά στο επάνω μέρος της υδρογέλης υδατικό διάλυμα κατάλληλου pH και σύστασης ως υπερκείμενη φάση. Ως φυσικό επακόλουθο, το φάρμακο απελευθεωνόταν σταδιακά από την υδρογέλη στην υπερκείμενη φάση και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου. Τα δεδομένα που παρήχθησαν (ολοκλήρωμα κορυφών σε συνάρτηση με τον χρόνο) μετατράπηκαν σε διαγράμματα αποδέσμευσης (% αποδέσμευση σε συνάρτηση με τον χρόνο). Μελετήθηκαν ποικίλοι παράγοντες προκειμένου να επιτευχθεί βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των συγκεκριμένων συστημάτων υδρογέλης και του προφίλ αποδέσμευσης που εμφανίζουν. Μερικοί παράγοντες που παρατηρήθηκε ότι επηρέασαν την κινητική αποδέσμευσης ήταν: (α) Η σύσταση της υδρογέλης και της υπερκείμενης φάσης, (β) το pH της υπερκείμενης φάσης, και (γ) Η θερμοκρασία του συστήματος. Προκειμένου να επιτευχθεί βαθύτερη κατανόηση του δικτύου της υδρογέλης, διεξήχθησαν μελέτες διαρροής ιόντων Mg^{2+} και διαλυτών ειδών πυριτικών, που είναι ενδογενή στην υδρογέλη.

Τέλος, επιχειρήθηκε η επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας της υδρογέλης, χρησιμοποιώντας τα οργανοσιλάνια APTES (3-aminopropyl)triethoxysilane) και TESPSA (3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride) προκειμένου να ληφθούν επιφανειακά σιλανοποιημένα παράγωγα. Στόχος ήταν η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων, που θα αλλάξουν το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων του αργίλοπυριτικού υποστρώματος. Ως φυσικό επακόλουθο, αναμένεται να επηρεαστεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης μεταξύ του Etidronic acid και της υδρογελικής μήτρας, που θα προκαλέσει ελεγχόμενη τροποποίηση της κινητικής αποδέσμευσης του φαρμάκου.

Λέξεις κλειδιά: Laponite[®] XL-21 XR, υδρογέλες, Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, Διφωσφονικές ενώσεις, Etidronic acid, Ενέσιμες υδρογέλες, Σιλανοποίηση

Abstract

Bisphosphonates (BPs) constitute a class of drugs that are used to mitigate osteoporosis and other bone-related diseases. BPs comprise a more stable chemical analog of pyrophosphoric acid, which participates in the regulation process of biological metabolic path of calcification. Some drawbacks of these BP drugs are their limited bioavailability, poor biocompatibility and fast excretion that lead to a plethora of side effects. Hence, the design and fabrication of smart drug delivery systems is necessary, in order to achieve effective treatment.

Laponites[®] constitute a class of phyllosilicate inorganic minerals, which are insoluble in water, but can undergo extensive hydration to form highly thixotropic gels. Thixotropy is the ability of a colloidal dispersion to transit from gel-to-sol, when it is shaken or shear-stressed, in a reversible way. Laponite[®] hydrogels are non-toxic and biocompatible. As a result, they are broadly used in cosmetics and pharmaceutical products to enhance their organoleptic properties. In addition, they possess a unique “house-of-cards” structure in water dispersions and display void spaces within the clay’s particles and shear thinning capacity, which render them suitable as drug delivery systems for injectable drugs. In this way, the treatments can be conducted in a more targeted fashion, reducing the side effects and enhancing the treatment’s effectiveness.

The scope of the present Master’s Thesis was focused on different formulations of Laponite[®] XL-21 XR ($F_{18}Mg_{16}Na_{10}O_{66}Si_{27}$) in order to fabricate stable hydrogels, loaded with the anti-osteoporosis drug Etidronic acid ($CH_3C(OH)(PO_3H_2)_2$), and on the evaluation of the controlled release profile of the drug.

Etidronic acid was effectively loaded on the Laponite[®] hydrogels, because it can interact electrostatically or via hydrogen-bonds with the hydrogel’s silicatic network. Subsequently, controlled release studies were conducted in artificial fluids that mimic the human stomach (pH 1.3) or the human blood (pH 7.4). Drug-loaded Laponite[®] hydrogels were prepared and were allowed to mature. Subsequently, an aqueous medium of appropriate pH was carefully added as a supernatant fluid phase. As a result, the active drug was gradually released to the supernatant phase and the quantification of the initial release rate of the active drug was realized by ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. The raw data (peak integration vs. time) were converted to release diagrams (% drug release vs. time). Different variables have been studied in order to fully understand the behavior of these drug-loaded hydrogel systems and their release profiles. Some factors that appeared to influence the release profiles were:

(a) the composition of the gel or the supernatant, (b) the pH of the supernatant, and (c) the system's temperature. In order to gain a deeper insight in the hydrogel's network, leaching studies of inherent Mg^{2+} and silicate ions were carried out.

Lastly, attempts of grafting the clay's surface were conducted using the organosilanes APTES (3-aminopropyl)triethoxysilane) and TESPSA (3-(triethoxysilyl)propylsuccinic anhydride) in order to produce silane-grafted derivatives. The approach was based on the concept of adding different functional groups that can change the overall charge of the exposed nanoparticle surface. This is expected to influence the interactions between Etidronic acid and the hydrogel matrix, thus altering the release profile of the drug.

Keywords:Laponite[®] XL-21 XR, hydrogels, drug delivery systems, Bisphosphonates, Etidronic acid, injectable Hydrogels, Silane grafting

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	17
1.1. Διφωσφονικές ενώσεις ως αντιοστεοπορωτικά φάρμακα	17
1.1.1. Η μεταβολική πορεία αναδιαμόρφωσης των οστών (Bone turnover) και οστικές παθήσεις 21	
1.1.2. Μηχανισμός Φαρμακευτικής δράσης διφωσφονικών ενώσεων in vivo	23
1.1.3. Etidronic acid.....	26
1.2. Ιστορική αναδρομή του Laronite®	27
1.2.1. Χημική δομή και Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	29
1.3. Υδρογέλες Laronite®	34
1.3.1. Εφαρμογή στις βιοεπιστήμες ως έξυπνο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων	37
1.3.2. Μέθοδος Παρασκευής Υδρογέλης	42
1.3.3. Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογέλης Laronite®	43
1.4. Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR).....	47
2. Στόχος Εργασίας.....	52
3. Πειραματικό Μέρος	54
3.1. Χημικά Αντιδραστήρια και Όργανα.....	54
3.2. Πειραματική Πορεία.....	56
3.2.1. Παρασκευή υδρογελών Laronite® παρουσία του φαρμάκου Etidronic acid	56
3.2.2. Μελέτη μεταβολής της τιμής pH της υπερκείμενης φάσης όταν βρίσκεται σε επαφή με την υδρογέλη	57
3.2.3. Μελέτη διαρροής δισθενών ιόντων Μαγνησίου από το δίκτυο της υδρογέλης	57
3.2.4. Μελέτη διαρροής διαλυτών πυριτικών από το δίκτυο της υδρογέλης.....	59
3.2.5. Παρασκευή διαφορετικής σύστασης υπερκείμενων φάσεων ως μέσο όπου θα αποδεσμευτεί το ETID.	61
3.2.6. Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκου.....	63
3.2.7. Πειράματα ανταγωνισμού παρουσία EDTA	66
3.2.8. Επιφανειακή τροποποίηση υδρογελών Laronite® με Οργανοσιλάνια.....	68
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	81
4.1. Μελέτες χημικής σταθερότητας των υδρογελών Laronite® XL-21 XR όταν εκτίθενται σε υδατικό μέσο.....	81
4.1.1. Μελέτες μεταβολής τιμής pH της υπερκείμενης φάσης.....	81
4.1.2. Μελέτες διαρροής ιόντων Mg^{2+} , μέσω τιτλοδότησης με EDTA και δείκτη EBT	82
4.1.3. Μελέτες διαρροής διαλυτών ειδών $Si(OH)_4$ με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος.....	84
4.2. Απόκριση της αποδέσμευσης του ETID σε εξωτερικά ερεθίσματα	87

4.2.1.	Μεταβολή pH	89
4.2.2.	Αποδέσμευση σε διαφορετικής ιοντικής σύστασης υπερκείμενη φάση	91
4.2.3.	Μεταβολή θερμοκρασίας	99
4.2.4.	Μεταβολή Όγκου υπερκείμενης φάσης	105
4.2.5.	Μεταβολή συγκέντρωσης του ETID	107
4.3.	Προσδιορισμός τρόπου αλληλεπίδρασης ETID με το δίκτυο της υδρογέλης Laponite® XL-21 XR 108	
4.4.	Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογελών Laponite® XL-21 XR και η επιρροή στο κινητικό προφίλ αποδέσμευσης του ETID.....	116
i.	Προσθήκη του αντιδραστηρίου (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES).....	116
ii.	Προσθήκη του αντιδραστηρίου (3-Triethoxysilyl)propyl succinic anhydride (TESPSA) ..	121
4.4.1.	Τροποποίηση μέσω εισαγωγής των οργανοσιλανίων πριν την πήξη της υδρογέλης ...	127
4.4.2.	Οργανική τροποποίηση Laponite® XL-21 XR μέσω one-pot αντίδρασης	129
4.4.3.	Τροποποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης στην προσχηματισμένη υδρογέλη	135
4.5.	Αξιολόγηση επαναληψιμότητας πειραματικής πορείας μελετών αποδέσμευσης	149
4.6.	Κινητική μελέτη Δεδομένων	151
5.	Συμπεράσματα και Προοπτικές	154
5.1.	Συμπεράσματα	154
5.2.	Προοπτικές.....	157
6.	Βιβλιογραφία	158
7.	Παραρτήματα	165
7.1.	Μελέτες χημικής σταθερότητας των υδρογελών Laponite® XL-21 XR όταν εκτίθενται σε υδατικό μέσο	165
7.1.1.	Μελέτες μεταβολής τιμής pH της υπερκείμενης φάσης	165
7.1.2.	Μελέτες διαρροής ιόντων Mg ²⁺ , μέσω τιτλοδότησης με EDTA και δείκτη EBT	165
7.1.3.	Μελέτες διαρροής διαλυτών ειδών Si(OH) ₄ με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος	166
7.2.	Ελεγχόμενη αποδέσμευση ETID ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα.	167
7.2.1.	Μεταβολή pH.	167
7.2.2.	Αποδέσμευση σε διαφορετικής ιοντικής σύστασης υπερκείμενη φάση.	168
7.2.3.	Μεταβολή θερμοκρασίας.	169
7.2.4.	Μεταβολή όγκου υπερκείμενης φάσης.	170
7.3.	Προσδιορισμός τρόπου αλληλεπίδρασης ETID με το δίκτυο της υδρογέλης Laponite® XL-21 XR.....	170
7.4.	Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογελών Laponite® XL-21 XR και η επιρροή στο κινητικό προφίλ αποδέσμευσης του ETID.....	172
7.4.1.	Τροποποίηση μέσω εισαγωγής πριν την πήξη της υδρογέλης.	173
7.4.2.	Οργανική τροποποίηση Laponite® XL-21 XR στην ξηρή μορφή	174

7.4.3. Τροποποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης στην προσχηματισμένη υδρογέλη	174
7.5. Επαναληψιμότητα μεθόδου ποσοτικοποίησης.....	177

Συντομογραφίες

PPi: Pyrophosphate (Πυροφωσφορικό)

BPs: Bisphosphonates (Διφωσφονικές ενώσεις με δομική μονάδα $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}_2\text{-C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)$)

HAP: Hydroxyapatite (υδροξυαπατίτης, η κρυσταλλική μορφή του φωσφορικού ασβεστίου στα οστά)

NNBPs: Non-Nitrogen-containing Bisphosphonates (1^η γενιά διφωσφονικών ενώσεων. Δεν περιέχουν N σε καμία από τις πλευρικές ομάδες R_1 και R_2)

NBPs: Nitrogen-containing Bisphosphonates (2^η γενιά διφωσφονικών ενώσεων. Περιέχουν N στην πλευρική ομάδα R_2)

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη (αποτελεί την πηγή ενέργειας των έμβιων οργανισμών)

A-p-p-c-p: Ο μεταβολίτης που φέρει την φαρμακευτική δράση στον μηχανισμό δράσης της πρώτης γενιάς διφωσφονικών ενώσεων (Είναι ένα μόριο μονοφωσφορυλιωμένης αδενίνης συζευγμένο με την διφωσφονική ένωση που φέρει την δομική μονάδα P-C-P)

FPP: Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο

GGPP: Πυροφωσφορική γεραυλογερανιόλη

FPPS: Συνθέταση του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου

γ-MPDES: γ-methacryloxypropyldimethylmethoxy silane

qNMR: quantitative Nuclear Magnetic Resonance

ETID: Etidronic acid

PB: Phosphate buffer solution

Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

SBF: Simulated Body Fluid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EBT: Eriochrome Black T

APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane

TESPSA: 3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride

TMS: Τετραμέθυλοσιλάνιο

TMSP: Trimethylsilylpropanoic acid

PES: Phosphonoacetic acid

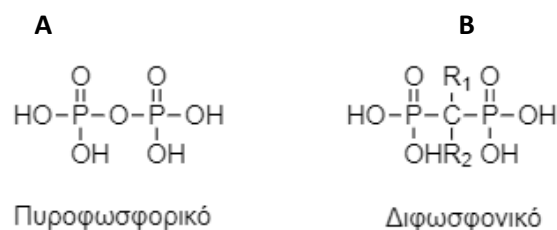
DOSY: Diffusion-ordered NMR spectroscopy

1. Εισαγωγή

1.1. Διφωσφονικές ενώσεις ως αντιοστεοπορωτικά φάρμακα

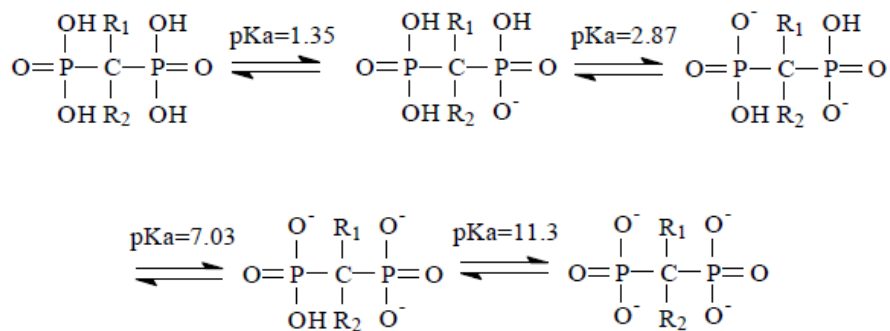
Το έναυσμα για τη σύνθεση των διφωσφονικών ενώσεων στηρίχτηκε στη διευκρίνηση του ενδογενή βιολογικού ρόλου του πυροφωσφορικού οξέος (**PPi**). Το πυροφωσφορικό οξύ (**Εικόνα 1**), αποτελεί παραπροϊόν πολλών βιολογικών διεργασιών και δρα ως φυσικός αποσκληρυντικός παράγοντας στο υδατικό περιβάλλον των οργανισμών, λόγω της ικανότητας του να συναρμόζεται με τα δισθενή ιόντα ασβεστίου σε φυσιολογικό pH. Με τη δέσμευση των «ελεύθερων» ιόντων Ca^{2+} , αναστέλλει την εναπόθεση δυσδιαλύτων αλάτων ασβεστίου (διαδικασία ασβεστοποίησης) στον σκελετό και σε μαλακούς ιστούς (όπως είναι το δέρμα, τα νεφρά και τα αγγεία), μια διαδικασία που συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις (όπως είναι η Οστεοπόρωση και η δημιουργία πέτρας σε μαλακούς ιστούς). Τα επίπεδα του πυροφωσφορικού στον οργανισμό ρυθμίζονται από την αλκαλική φωσφατάση, όπου μέσω υδρόλυσης του παρεμποδίζει την ανασταλτική δράση του. Συγκεκριμένα, η αλκαλική φωσφατάση αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη προσδεμένη στις μεμβράνες των κυττάρων και είναι παρούσα σχεδόν παντού στα θηλαστικά. Καταλύει την υδρόλυση φωσφορικών μονοεστέρων σε φυσιολογικό pH και έχει τέσσερις ισοενζυμικές μορφές [2]. Η υδρόλυση του πυροφωσφορικού, από την μη ειδική ισοενζυμική μορφή στο συκώτι, στο νεφρό και στα οστά, οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας σταθερότερων παρεμποδιστών ασβεστοποίησης.

Οι διφωσφονικές ενώσεις αποτελούν σταθερότερα χημικά ανάλογα του πυροφωσφορικού οξέος. Αντί της δομικής μονάδας P-O-P, διαθέτουν ένα κεντρικό άτομο άνθρακα (P-C-P) και δύο πλευρικές ομάδες (R_1, R_2), διαφορετικής ή ίδιας φύσης, προσδεμένες σε αυτόν (**Εικόνα 1**). Από το πλήθος των ενώσεων που συντέθηκαν, μεταβάλλοντας τον αριθμό των ανθράκων στην κεντρική δομική μονάδα (P-C_x-P), εκείνες που είχαν ένα μόνο κεντρικό άτομο άνθρακα (Δομική μονάδα P-C-P), εμφάνιζαν την υψηλότερη ανθεκτικότητα τόσο στην ενζυμική όσο και στη χημική υδρόλυσή τους. Οι πρώτες μελέτες που αφορούσαν τις διφωσφονικές ενώσεις δημοσιεύτηκαν το 1969, όπου γνωστοποιήθηκε η παρεμποδιστική δράση τους στην εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου *in vivo*. Επιπρόσθετα, τότε χρονολογούνται οι πρώτες αναφορές εργαστηριακής σύνθεσης του υδροξυαπατίτη (HAP, η κρυσταλλική μορφή του φωσφορικού ασβεστίου στα κόκκαλα) *in vitro*. Τα παραπάνω επιτεύγματα, συνέλαβαν στην επακόλουθη μελέτη τους ως αντιοστεοπορωτικά φάρμακα σε ζωντανούς ιστούς [3].



Εικόνα 1. Αναπαράσταση της σχηματικής δομής του πυροφωσφορικού (A) και της ευρύτερης κατηγορίας των διφωσφονικών ενώσεων (B).

Εξετάζοντας τη δομή των διφωσφονικών ενώσεων με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, διαπιστώνεται ότι αποτελούν μόρια που περιέχουν δύο φωσφονικές ομάδες με τετραεδρική γεωμετρία που συνδέονται στο ίδιο κεντρικό άτομο άνθρακα. Η τετραεδρική γεωμετρία του P οφείλεται στο ότι έχει 5 ηλεκτρόνια σθένους τοποθετημένα στα υβριδισμένα sp^3 τροχιακά. Κάθε άτομο P σχηματίζει έναν απλό δεσμό με το κεντρικό άτομο άνθρακα, δύο απλούς δεσμούς με δύο υδροξυλομάδες και ένα διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου. Τα υδρογόνα των υδροξυλίων παρουσιάζουν διαφορετική οξύτητα, ανάλογα με τις πλευρικές ομάδες του κεντρικού ατόμου άνθρακα, ο οποίος μπορεί να είναι αλειφατικός ή αρωματικός [4]. Ως πολυπρωτικά οξέα, μπορούν να αποπρωτονιωθούν σε τέσσερα στάδια ανάλογα με την τιμή του pH του διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη αποπρωτονίωση πραγματοποιείται σε $\text{pH} \approx 1.35$, η δεύτερη σε $\text{pH} \approx 2.87$, η τρίτη σε $\text{pH} \approx 7.03$ και η τέταρτη σε $\text{pH} \approx 11.3$ (όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 2** από την βιβλιογραφία [4]). Ο βαθμός πρωτονίωσης του διφωσφονικού οξέος επηρεάζει άμεσα την θεραπευτική δράση και την ικανότητά του να προσροφάται στον HAP και να δεσμεύει Ca^{2+} και άλλα δισθενή ιόντα. Η μορφή του λοιπόν, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον καθορισμό της φαρμακοκινητικής, της φαρμακοδυναμικής και των παρενεργειών που θα εμφανίσει.

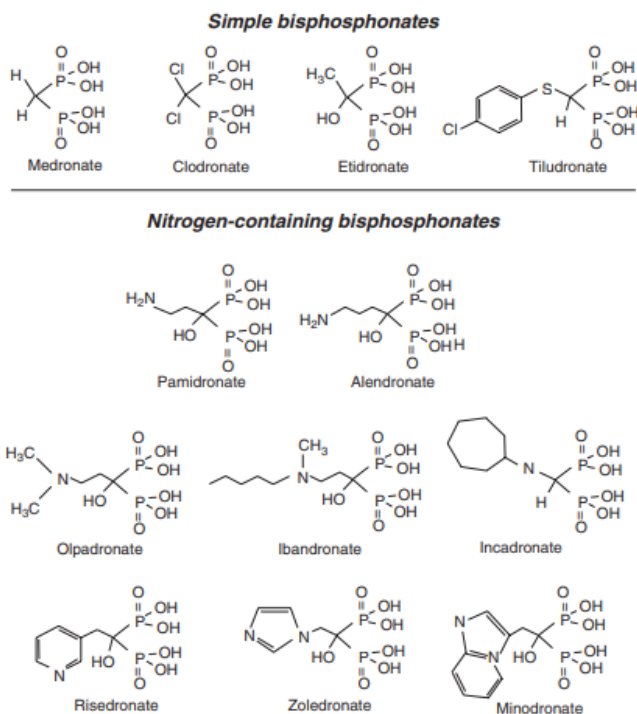


Εικόνα 2 . Αποπρωτονιωμένες μορφές των διφωσφονικών ενώσεων ανάλογα με την σταθερά pK_a , όπως λήφθηκε από την βιβλιογραφία [4].

Μετά από ενδελεχή έρευνα, έγινε αντιληπτό ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της δομής των διφωσφονικών ενώσεων και της δράσης τους ως αντιοστεοπορωτικά φάρμακα. Όπως προαναφέρθηκε, η αντικατάσταση του οξυγόνου στην μονάδα P-O-P του πυροφωσφορικού με ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, έδωσε δραστικότερους αναστολείς. Παράλληλα, η μεταβολή των πλευρικών ομάδων R_1 και R_2 , ανέδειξε ενώσεις με διαφορετικές δομές, και, ως φυσικό επακόλουθο, διαφορετική δραστηριότητα. Οι υπάρχουσες διφωσφονικές ενώσεις έχουν κατηγοριοποιηθεί στις λεγόμενες «γενιές» των διφωσφονικών ενώσεων, με κριτήριο διαφοροποίησης, τον μηχανισμό δράσης τους. Συγκεκριμένα, έχουν ταξινομηθεί στις εξής γενιές:

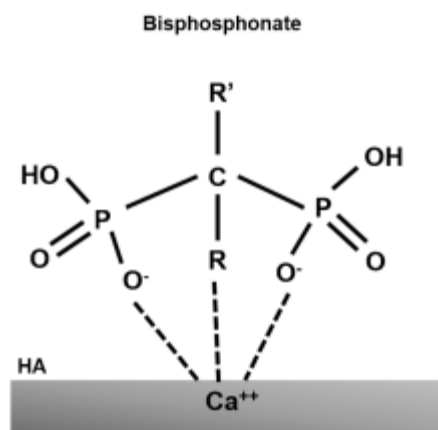
- 1) **Πρώτη γενιά.** Δεν περιέχεται άζωτο (**NNBPs**) σε καμία από τις πλευρικές ομάδες R_1, R_2
- 2) **Δεύτερη γενιά.** Περιέχεται άζωτο (**NBPs**) σε κάποια από τις πλευρικές ομάδες

Μερικά παραδείγματα διφωσφονικών ενώσεων τοποθετημένα στην αντίστοιχη κατηγορία που ανήκουν αναπαριστώνται στην **Εικόνα 3**.



Εικόνα 3. Αναπαράσταση των δύο ευρύτερων κατηγοριών διφωσφονικών ενώσεων και κάποια παραδείγματα ενώσεων που περιλαμβάνουν, όπως λήφθηκε από την παραπομπή [5].

Δεν θα έπρεπε να παραληφθεί ότι, υπάρχουν και άλλες γενιές, που όμως δεν θα αναλυθούν περαιτέρω στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία. Η ικανότητα των διφωσφονικών να ενσωματώνονται στον HAP οφείλεται στην δομική μονάδα P-C-P, η οποία ενισχύεται με την ύπαρξη μίας επιπλέον ομάδας -OH, ως πλευρική ομάδα R₁. Από την άλλη, η δομή και η τρισδιάστατη διεύθυνση στο χώρο της ομάδας R₂ καθορίζει την επιρροή των διφωσφονικών ενώσεων στα κύτταρα και τη σχετική αποτελεσματικότητά τους ως αντιοστεοπορωτικά φάρμακα [8]. Παρόλο που οι διφωσφονικές ενώσεις έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, κάθε μία παρουσιάζει το δικό της προφίλ δραστηριότητας που εξαρτάται από τις πλευρικές ομάδες στον κεντρικό C. Στην **Εικόνα 4** αναπαριστάται σχηματικά ένας πιθανός τρόπος αλληλεπίδρασης ενός διφωσφονικού φαρμάκου με την επιφάνεια του HAP.

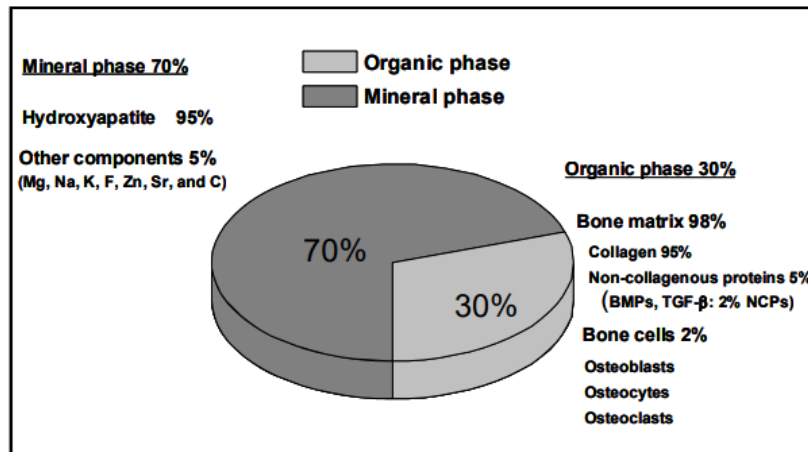


Εικόνα 4. Αναπαράσταση αλληλεπίδρασης των διφωσφονικών ενώσεων με τον HAP των οστών όπως λήφθηκε από την παραπομπή [7].

1.1.1. Η μεταβολική πορεία αναδιαμόρφωσης των οστών (Bone turnover) και οστικές παθήσεις

Τα οστά αποτελούν μεταβολικά ενεργούς ιστούς που υποβάλλονται σε συνεχή αναδιαμόρφωση (bone turnover), προκειμένου να διατηρήσουν τη μηχανική αντοχή τους σε όλη την διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Αποτελούνται περίπου από 30 % οργανικά συστατικά (γλυκοπρωτεΐνες, κύτταρα), ενώ το υπόλοιπο περίπου 70 % αποτελεί το ανόργανο μέρος του που περιέχει κυρίως HAP (όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 5**). Πρόκειται για μία κυκλική μεταβολική πορεία από δύο αλληλοεξουδετερώμενες διεργασίες: (α) το σχηματισμό του οστού (**formation**) και (β) την επαναρρόφηση (**resorption**). Αυτές οι διεργασίες εξαρτώνται από την δραστηριότητα των οστεοκλαστών (κύτταρα που ρυθμίζουν την επαναρρόφηση), των οστεοβλαστών (κύτταρα που ρυθμίζουν το σχηματισμό) και των οστεοκυττάρων. Υπό κανονικές συνθήκες ο σχηματισμός και η επαναρρόφηση είναι συζευγμένες, έτσι ώστε το μέρος του οστού που καταστρέφεται να «ισούται» με εκείνο που σχηματίζεται. Αυτή η ισορροπία επιτυγχάνεται και ρυθμίζεται από ορμόνες του παραθυρεοειδούς αδένου, τη Βιταμίνη D, στεροειδείς ορμόνες και τοπικούς μεταβολίτες (κυτταροκίνες και παράγοντες ανάπτυξης). Διαταραχή της ισορροπίας αυτής, μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της δομής, της δύναμης και της μάζας του οστού [10]. Μερικές από τις παθολογικές περιπτώσεις που προκύπτουν από την προαναφερόμενη διαταραχή είναι η οστεοπόρωση (υποβάθμιση της μηχανικής αντοχής του οστού) και η νόσος Paget (μειωμένη μάζα οστού λόγω αυξημένης δραστηριότητας των οστεοκλαστών) [15]. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2022, καταγράφηκαν παγκοσμίως 8.9 εκατομμύρια περιπτώσεις

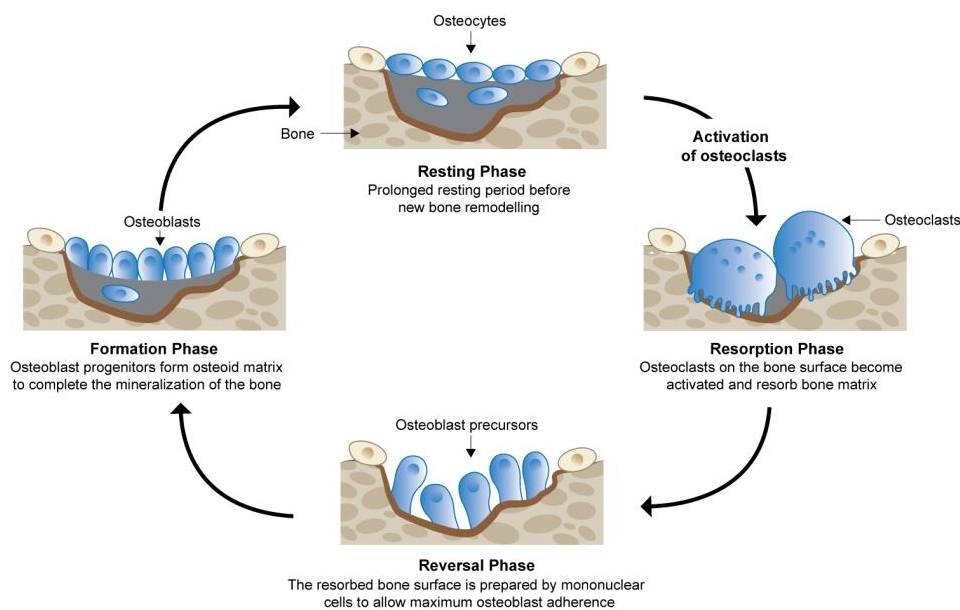
οστεοπορωτικού κατάγματος ετησίως, δηλαδή η εμφάνιση ενός κατάγματος ανά 3 δευτερόλεπτα. Η οστεοπόρωση πλήττει σε μεγαλύτερο ποσοστό και σε μικρότερη ηλικία τις γυναίκες από τους άντρες. Κατά μέσο όρο, μία στις τρεις γυναίκες έχουν υποστεί τουλάχιστον ένα κάταγμα σε ηλικία άνω των πενήντα ετών [15]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτή η αναγκαιότητα μείωσης της εμφάνισης οστικών παθήσεων.



Εικόνα 5. Διάγραμμα Κατανομής οργανικού και ανόργανου μέρους των οστών όπως λήφθηκε από την παραπομπή [9].

Η αναδιαμόρφωση των οστών απαρτίζεται από τις εξής φάσεις: (α) την ενεργοποίηση, (β) την επαναρρόφηση, (γ) την ανατροπή (reversal) και (δ) το σχηματισμό (όπως γίνεται και εμφανές στην **Εικόνα 6**). Στη φάση της ενεργοποίησης τα οστεοκύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση και στρατολόγηση των οστεοκλαστών στην περιοχή αναδιαμόρφωσης. Ωριμα κύτταρα οστεοβλαστών (lining cells), που καλύπτουν την επιφάνεια του οστού, ενεργοποιούνται και απογυμνώνουν μικρή περιοχή, καθιστώντας το οστό προσβάσιμο στους οστεοκλάστες. Ακολουθεί η φάση της επαναρρόφησης από ενεργοποιημένους οστεοκλάστες, όπου κατευθύνονται και ενσωματώνονται στα οστά. Η ισχυρή πρόσδεση των οστεοκλαστών στην επιφάνεια των οστών και με τον συνεπακόλουθο σχηματισμό της ζώνης σφραγίσματος (sealing zone), οδηγεί στην όξυνση του μικροπεριβάλλοντος μεταξύ των οστεοκλαστών και των οστών [13]. Ως φυσικό επακόλουθο, πρώτα υδρολύεται το ανόργανο μέρος και κατόπιν αποικοδομείται η οργανική μήτρα. Κατά αυτό τον τρόπο, δισθενή ιόντα ασβεστίου και άλλα ιόντα απελευθερώνονται στο πλάσμα, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Αντίστοιχα, τα προϊόντα

αποικοδόμησης της οργανικής μήτρας απελευθερώνονται στο πλάσμα. Η χρονική περίοδος μεταξύ της επαναρρόφησης και του σχηματισμού του οστού, αποτελεί τη φάση ανατροπής. Στην συγκεκριμένη φάση, μονοπυρηνικά κύτταρα ενεργοποιούν τους οστεοβλάστες και συζευγνύει τις διεργασίες επαναρρόφησης και σχηματισμού. Τέλος, στην φάση του σχηματισμού, ενεργοποιημένα πρόδρομα μόρια οστεοβλαστών μεταναστεύουν στην περιοχή επαναρρόφησης και επανασυνθέτουν την οργανική μήτρα και κατόπιν τον HAP [12].

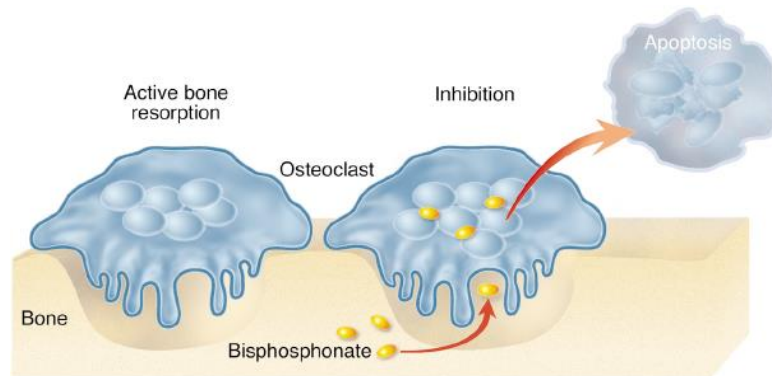


Εικόνα 6. Οι τέσσερις φάσεις στην μεταβολική πορεία αναδιαμόρφωσης των οστών από την βιβλιογραφία [14]. Από την αρχική κατάσταση ισορροπίας ακολουθεί η ενεργοποίηση όπου οι οστεοκλάστες στρατολογούνται και κατευθύνονται στην περιοχή επαναρρόφησης (Φάση επαναρρόφησης). Κατόπιν, ακολουθεί η φάση ανατροπής και τέλος ο σχηματισμός του νέου οστού.

1.1.2. Μηχανισμός Φαρμακευτικής δράσης διφωσφονικών ενώσεων *in vivo*

Ένα φαρμακολογικά κοινό χαρακτηριστικό των διφωσφονικών ενώσεων αποτελεί η υψηλή συγγένεια εναπόθεσής τους στα κόκκαλα, συγκριτικά με άλλους ιστούς του σώματος [15]. Η παραπάνω παρατήρηση οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν δυσθενές ασβέστιο, αλλά και στις τρισδιάστατες δομές που σχηματίζουν οι εν λόγω ενώσεις. Η επιλεκτική στόχευση των οστών από τις διφωσφονικές ενώσεις οφείλεται στη σύσταση του οστού, το οποίο αποτελείται κυρίως από HAP. Οι διφωσφονικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι

προτιμούν να προσδεθούν σε ενεργές περιοχές αναδιαμόρφωσης του οστού και συγκεκριμένα σε περιοχές που πραγματοποιείται επαναρρόφηση [15], όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 7**. Με αυτό τον τρόπο, μεγάλη ποσότητα της διφωσφονικής ένωσης εναποτίθεται γρήγορα και επικεντρωμένα, γεγονός που αιτιολογεί την ευρεία χρήση τους στην θεραπεία οστικών παθήσεων.



Εικόνα 7. Απεικόνιση της περιοχής δράσης των διφωσφονικών ενώσεων όπως λήφθηκε από την παραπομπή [16].

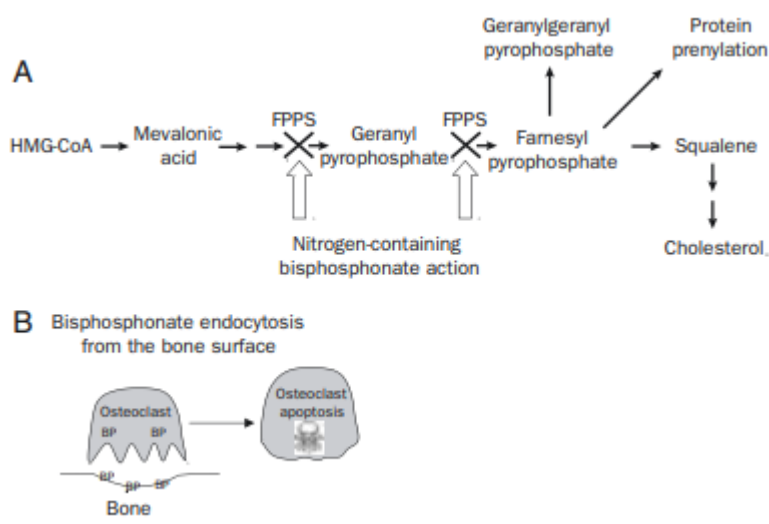
Όπως προαναφέρθηκε, η διαφοροποίηση μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης γενιάς των διφωσφονικών ενώσεων στηρίζεται στο διαφορετικό μηχανισμό δράσης τους. Παρακάτω περιγράφεται λεπτομερώς η φαρμακοδυναμική των δύο διαφορετικών γενεών διφωσφονικών ενώσεων.

Η πρώτη γενιά **NNBPs** έχει παρατηρηθεί ότι μετατρέπεται σε τοξικά ανάλογα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (**ATP**), όπου προσλαμβάνονται από τους οστεοκλάστες μέσω ενδοκυττάρωσης. Λόγω της μη υδατοδιαλυτής φύσης των μεταβολικών προϊόντων, θεωρείται ότι συσσωρεύονται στο εσωτερικό των κυττάρων αναστέλλοντας ένζυμα που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια σημαντικά για την λειτουργία του κυττάρου. Ως φυσικό επακόλουθο, επέρχεται η αναστολή της λειτουργίας ή απόπτωση του κυττάρου [15]. Η συγκεκριμένη γενιά ενώσεων λειτουργεί ως προφάρμακο (prodrug) και προσλαμβάνεται μέσω ενδοκυττάρωσης στο εσωτερικό του οστεοκλάστη. Μετατρέπεται στην ενεργό ουσία (*Appcp*) από την συνθετάση της αμινοάκυλο-tRNA (Τύπου II) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση [19]:





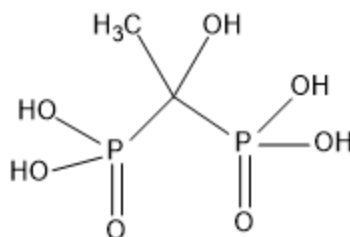
Η δεύτερη γενιά **NBPs** παρεμβαίνει στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης του μεβαλονικού όπως γίνεται εμφανές και στην **Εικόνα 8**. Η σύνθεση του μεβαλονικού αποτελεί ένα καθοριστικό ενδιάμεσο για την σύνθεση της χοληστερόλης, στερολών και ισοπρενοειδών λιπιδίων. Τα σημαντικότερα ισοπρενοειδή λιπίδια που επηρεάζει είναι το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (**FPP**) και την πυροφωσφορική γερανυλογερανιόλη (**GGPP**). Τα παραπάνω ισοπρενοειδή λιπίδια είναι πολύ σημαντικά, διότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για την προ-μεταφραστική τροποποίηση μικρών GTP-ασών. Οι GTP-άσες είναι απαραίτητα σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζουν ποικίλες διεργασίες σημαντικές για την λειτουργία των οστεοκλαστών. Ουσιαστικά, παρουσία NBPs αναστέλλεται η προσθήκη ισοπρενυλικών μονάδων στις GTP-άσες, που λειτουργεί ως άγκυρα πρόσδεσης τους στην κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Αυτές οι περιφερειακές πρωτεΐνες κρίνονται απαραίτητες για τον σχηματισμό των οστεοκλαστών, την λειτουργία και την επιβίωση τους. Η κύρια περιοχή δράσης των NBPs είναι η συνθετάση του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (**FPPS**) που συνδέεται άμεσα με την αναστολή επαναρρόφησης στο κόκκαλο [19].



Εικόνα 8. Διαγραμματική αναπαράσταση αναστολής σύνθεσης μεβαλονικού από την δεύτερη γενιά διφωσφονικών ενώσεων (NBPs), όπως λήφθηκε από την βιβλιογραφία [15].

1.1.3. Etidronic acid

Το Etidronic acid (ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonic acid ή EHDP) αποτελεί την πρώτη διφωσφονική ένωση που έχει συμπεριληφθεί σε κλινικές μελέτες [20]. Κατατάσσεται στην κατηγορία των διφωσφονικών ενώσεων NNBP, περιέχει μία -OH ομάδα (R_1 πλευρική ομάδα) και μία $-CH_3$ ομάδα (R_2 πλευρική ομάδα), **Εικόνα 9**. Αποτελεί ευρέως γνωστό φάρμακο στην αντιμετώπιση οστικών παθήσεων και είναι ανεκτό από ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών.



Εικόνα 9. Σχηματική δομή του Etidronic acid.

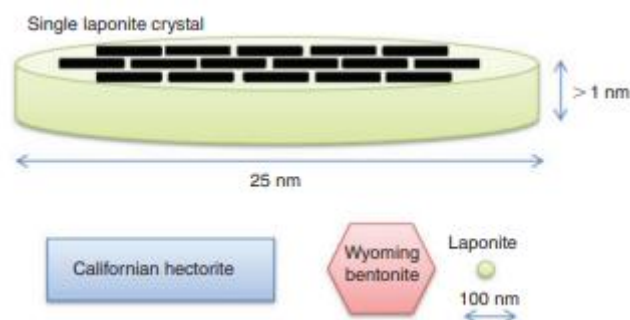
Μπορεί να χορηγηθεί είτε από το στόμα είτε ενδοφλέβια. Στην περίπτωση της στοματικής χορήγησης εμφανίζει μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα. Συγκεκριμένα, η βιοδιαθεσιμότητα του ανέρχεται σε ποσοστό 1-10 %, καθώς μόνο το 20-50 % της απορροφημένης δόσης κατευθύνεται στα κόκκαλα ενώ το υπόλοιπο μεταβολίζεται και απεκκρίνεται από τον οργανισμό εντός 24 ωρών. Επιπρόσθετα, μέρος του μπορεί να συσσωρευτεί στο στομάχι, το σκόπι ή την σπλήνα δημιουργώντας μία πληθώρα παρενεργειών. Από την άλλη πλευρά, όταν χορηγηθεί ενδοφλέβια, επειδή είναι αρκετά υδατοδιαλυτό δεν καταφέρνει να διαχυθεί εύκολα διαμέσου των λιπιδικών μεμβρανών των κυττάρων, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από το πλάσμα εντός 2 ωρών. Επίσης φέρει κίνδυνο να σχηματίσει αδιάλυτα σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα που φέρει το πλάσμα (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), προκαλώντας ανεπιθύμητες παρενέργειες [20].

Η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, η αναποτελεσματική στοχευμένη δράση στα οστά και η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών μπορούν να εξαλειφθούν χρησιμοποιώντας κάποιο έξυπνο σύστημα μεταφοράς/αποδέσμευσης της ένωσης. Το σύστημα θα πρέπει να είναι βιοσυμβατό και να φέρει κατάλληλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που θα αυξήσουν την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, έτσι ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση του στην θεραπευτική δόση για επιθυμητό χρονικό διάστημα ανάλογα την κλινική περίπτωση. Τα

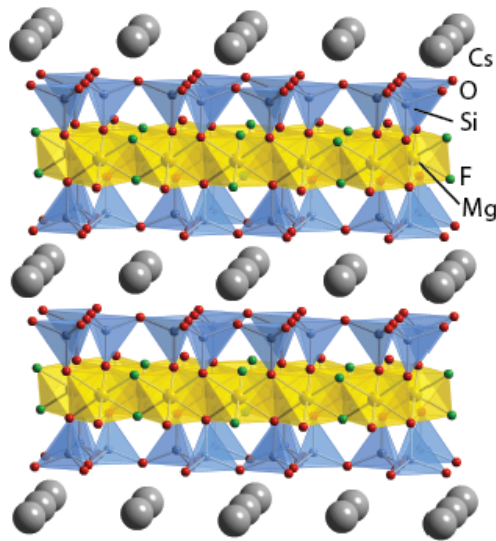
επόμενα κεφάλαια θα διαπραγματευτούν τη χρήση υδρογέλης Laponite[®] ως αποκρίσιμο σύστημα αποδέσμευσης της φαρμακευτικής ένωσης, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η φαρμακοκινητική του και να μειωθούν οι παρενέργειες.

1.2. Ιστορική αναδρομή του Laponite[®]

Ο συνθετικός άργιλος Laponite[®] έχει μορφή λευκής πούδρας και προέρχεται από την επεξεργασία του φυσικού αργίλου Hectorite, ένα ορυκτό όπου εντοπίζεται στην περιοχή Hector στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Παρόλο που η χρήση ορυκτών ήταν γνωστή από τα αρχαία χρόνια, ιδιαίτερα στους τομείς της ιατρικής, της αρχιτεκτονικής και των καλλυντικών, η σύνθεση και η επιστημονική μελέτη τους ξεκίνησε περίπου το 1930. Η πρώτη εμφάνιση του Laponite[®] στη βιομηχανία χρονολογείται περίπου το 1960, όπου έβρισκε εφαρμογή σε οικιακά και αγροτικά προϊόντα, στην επίστρωση επιφανειών (σμάλτο), στα κεραμικά και στην βιομηχανία ελαίων. Η ονομασία του καθιερώθηκε και προστατεύεται νομικά από την βιομηχανία χρωμάτων, όπου ως Laponite[®] ορίζει οποιοδήποτε συνθετικό υλικό νανοσωματιδιακής κλίμακας (**Εικόνα 10**) που προσεγγίζει την δομή και σύσταση του Hectorite (**Εικόνα 11**) και φέρει σημαντικές κολλοειδείς ιδιότητες. Η εισαγωγή του Laponite[®] στα καλλυντικά και στα προϊόντα περιποίησης πραγματοποιήθηκε από τις φαρμακευτικές εταιρείες περίπου το 1970, με έναυσμα το ότι συνθετικά νανοσωματίδια εγγενώς δεν φέρουν μικροοργανισμούς και είναι βιοσυμβατά [21]. Συνεπώς, οι φαρμακοβιομηχανίες μπορούσαν να τα χρησιμοποιήσουν χωρίς περεταίρω επεξεργασία και να επωφεληθούν οικονομικά.

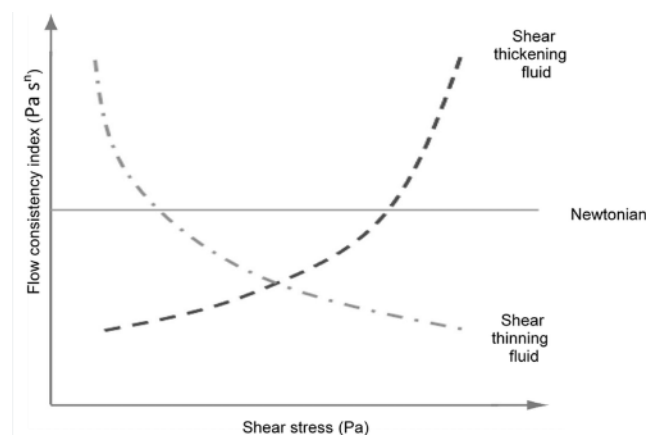


Εικόνα 10. Απεικόνιση μεγέθους μονοκρυστάλλου Laponite[®] συγκριτικά με τον φυσικό άργιλο Hectorite όπως λήφθηκε από την παραπομπή [24].



Εικόνα 11. Αναπαράσταση τμήματος της κρυσταλλικής δομής και σύστασης του αργίλου Hectorite. Τα φύλλα του υλικού συνήθως διαχωρίζονται με ιόντα Cs^+ ή K^+ . Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [26].

Στο παρελθόν ο άργιλος Laponite[®] χρησιμοποιούταν κυρίως ως πρόσθετο ή έκδοχο για τον σχεδιασμό φαρμάκων ή μεταφορέων της φαρμακευτικής ένωσης. Ήταν χρήσιμος όταν ήταν αναγκαία η ρύθμιση του ιξώδους ή των ρεολογικών ιδιοτήτων, ή αύξηση της σταθερότητας του συστήματος ως προς τον χρόνο, ή στην διευκόλυνση της εφαρμογής του συστήματος ή στον έλεγχο της μη Νευτώνειας συμπεριφοράς κολλοειδών υγρών (shear thinning, shear thickening), όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 12** [22].



Εικόνα 12. Μη Νευτώνειο ρευστό ονομάζεται το ρευστό όπου το ιξώδες του παρουσιάζει εξάρτηση από την εφαρμογή εξωτερικής τάσης, σε αντίθεση με το Νευτώνειο που είναι ανεξάρτητο. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μη Νευτώνειων ρευστών: (α) Ρεοπηκτικό (Shear

thickening fluid), όπου το ιξώδες του είναι ευθέως ανάλογο με την εφαρμοζόμενη τάση (**β**) **Θιξοτροπικό (Shear thinning fluid)**, παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση ιξώδους-τάσης [28]. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [27].

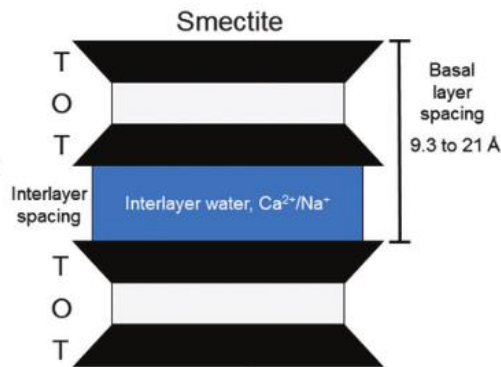
Παρόλο που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στις εταιρείες καλλυντικών και γενικότερα χημικών, τα συστήματα αυτά έχουν μελετηθεί λιγότερο στις βιοεπιστήμες. Ως φυσικό επακόλουθο, στη βιβλιογραφία εντοπίζεται περιορισμένος αριθμός επιστημονικών άρθρων που αφορούν τον άργιλο Laponite® στις βιοεπιστήμες. Μάλιστα, χρονολογείται ότι μόλις από το 2016 και έπειτα έχει ελκύσει ιδιαίτερα το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που φέρει το υλικό [21]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, ο μειωμένος αριθμός διαθέσιμης βιβλιογραφίας, καθιστά το συγκεκριμένο υλικό ιδανικό για περαιτέρω μελέτη και ακολούθως στην διεκπεραίωση καινοτόμων ερευνητικών εφαρμογών.

Το ίδιο το υλικό θεωρείται βιολογικά ενεργό, διότι, λόγω της σύστασής του, φέρει βιοχημικούς παράγοντες που μπορούν να επάγουν βιολογική απόκριση. Για αυτό το λόγο, βρίσκει εφαρμογές στην αναπλαστική Ιατρική και μηχανική των ιστών (π.χ. θεραπεία πληγών). Από την άλλη πλευρά, ως συστατικό συστήματος μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, εφαρμόζεται στην διάγνωση μέσω βιοαπεικόνισης ή ακόμα και στη θεραπεία ασθενειών και παθήσεων [23].

1.2.1. Χημική δομή και Φυσικοχημικές Ιδιότητες

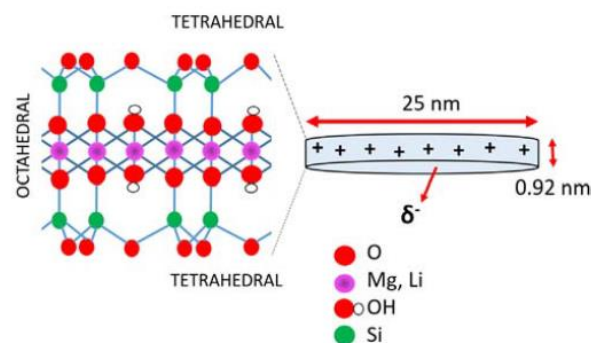
Χημική δομή

Ο συνθετικός Άργιλος Laponite®, αποτελεί ένα μονοκλινές ορυκτό που υπάγεται στην κατηγορία των φυλλοπυριτικών υλικών (Smectite group). Τα συγκεκριμένα υλικά παρουσιάζουν νανοδομή φύλλων σε αναλογία 2:1, όπου ένα φύλλο οκταέδρων είναι τοποθετημένο ενδιάμεσα από δύο φύλλα τετραέδρων (Δομή T-O-T) [25], όπως αναπαριστώνται στην **Εικόνα 13**. Η συγκεκριμένη δομή μπορεί να δώσει φύλλα πλάτους 1 nm και ποίκιλα μήκη (συνήθως 25 nm).



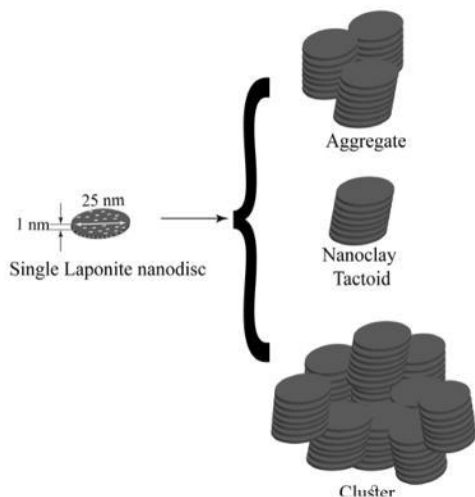
Εικόνα 13. Αναπαράσταση τριοκταεδρικής δομής της οικογένειας των σηκτικών φυλλοπυριτικών υλικών, όπου στο διαστρωματικό χώρο μπορούν να υπάρχουν ιόντα Ca²⁺, Na⁺ ή μόρια νερού. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [25].

Εξετάζοντας τη μοναδιαία κυψελίδα, φαίνεται ότι διαμορφώνεται μία δισδιάστατη δισκοειδής μορφή. Κάθε μονάδα των νανοκρυστάλλων του Laponite[®] περιλαμβάνει ένα φύλλο οκταεδρικής δομής οξειδίου του μαγνησίου που περιβάλλεται ενδιάμεσα από δύο παράλληλα φύλλα διοξειδίου του πυριτίου με τετραδική δομή. Το οκταεδρικό φύλλο αποτελείται από οξυγόνα και υδροξυλομάδες τα οποία βρίσκονται πολύ κοντά τοποθετημένα και συναρμοσμένα σε κέντρο Μαγνησίου με οκταεδρική γεωμετρία, γεγονός που συμβάλει στη σταθερότητα του υλικού ακόμα και σε νανοκλίμακα [29]. Ένας ενδεικτικός χημικός τύπος του Laponite[®] είναι ο $\text{Na}_{0.7}\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3}\text{O}_{20}(\text{OH})_4$, όπου τα κατιόντα Λιθίου αντικαθιστούν αυθόρμητα τα κατιόντα μαγνησίου. Η συγκεκριμένη ισομορφική υποκατάσταση επάγει ένα αρνητικό φορτίο (περίπου 50-55 mmol/100 g) στην πρόσοψη του δισκοειδούς μονοκρυστάλλου όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 14**.



Εικόνα 14. Αναπαράσταση τμήματος της 2D χημικής δομής και σύστασης των νανοδισκίων Laponite[®] όπως λήφθηκε από την παραπομπή [23].

Η ηλεκτρική ουδετερότητα επιτυγχάνεται μέσω εξισορρόπησης του αρνητικού φορτίου της επιφάνειας με τα κατιόντα Νατρίου που υπάρχουν στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των δισκίων. Η παραπάνω ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση οδηγεί στη δημιουργία κρυσταλλικών στοιβάδων από δισκία (Τακτοειδή) στην αφυδατωμένη στερεά μορφή του [29], όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 15**.

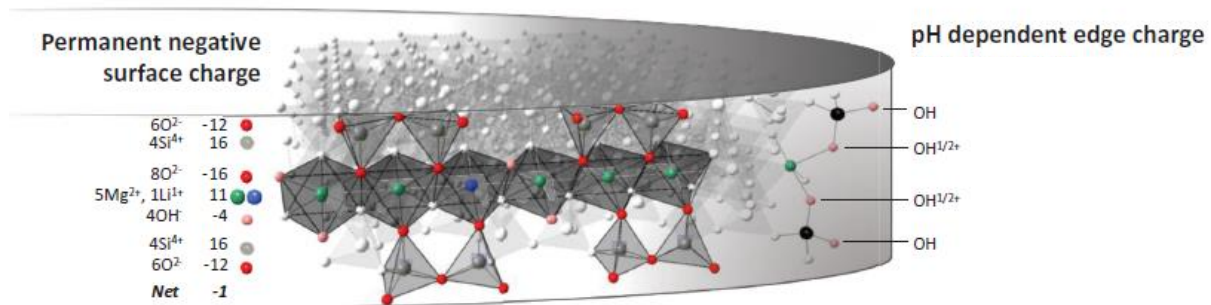


Εικόνα 15. Στην ξηρή μορφή τα δισκία Laponite[®] μπορούν να σχηματίσουν Τακτοειδή (Tactoid) συσσωματώματα (aggregates) ή clusters, προκειμένου να επιτευχθεί ηλεκτρική ουδετερότητα του υλικού. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [30].

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Το νανοδισκίο, παρέχει μεγάλη επιφάνεια με υψηλή ιοντική ισχύ, για αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως ιονικό φύλλο (**Εικόνα 16**) και μπορεί να συγκρατήσει κάποια φαρμακευτική ένωση με δύο τρόπους: (α) Μέσω ιονανταλλακτικής αντίδρασης, ή (β) μέσω αλληλεπίδρασης ιόντος-διπόλου με υδρόφιλα μόρια [23]. Ταυτόχρονα, οι άκρες των δισκίων περιέχουν εκτεθειμένες υδροξυδομάδες που μπορούν να πρωτονιωθούν, παράγοντας ένα μερικώς θετικό φορτίο (περίπου 4-5 mmol/100 g) ή ένα λιγότερο αρνητικό σχετικά με το περιβάλλον pH του συστήματος. Ειδικότερα, έχουν γίνει αναφορές ότι οι άκρες των δισκοειδών κρυστάλλων φέρουν θετικό φορτίο σε τιμές $\text{pH} < 9-11$ (πιεζοηλεκτρικό σημείο Laponite[®]), ενώ σε $\text{pH} > 9-11$ μπορούν να αποπρωτονιωθούν [31][33]. Το πιεζοηλεκτρικό σημείο εξαρτάται από την σύσταση της κάθε τάξης Laponite[®]. Άλλες αμφοτερικές ομάδες που επηρεάζονται από το pH του μικροπεριβάλλοντος αποτελούν οι Li-OH και Si-OH, γεγονός που καθιστά το σύστημα ευαίσθητο στην μεταβολή του pH (pH-responsive).

Πληροφορίες για το φορτίο της επιφάνειας και των άκρων μπορούν να ληφθούν μέσω προσδιορισμού των τιμών pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας [23].



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του μόνιμου επιφανειακού αρνητικού φορτίου λόγω ισομορφικής αντικατάστασης των ιόντων Mg²⁺, από ιόντα Li⁺ του κρυσταλλικού πλέγματος, καθώς και των μερικώς θετικά φορτισμένων άκρων που εξαρτώνται από το pH του μικροπεριβάλλοντος που θα βρεθεί το δισκίο. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [33].

Άλλο φυσικοχημικό χαρακτηριστικό του υλικού αποτελεί η ικανότητα διόγκωσης σε υδατικό περιβάλλον, η οποία παρουσιάζει εξάρτηση από το είδος των ιόντων στο χώρο μεταξύ των δισκίων (διαστρωματικός χώρος) και το χημικό δυναμικό της υδατικής φάσης. Το μέγεθος της διόγκωσης μπορεί να αυξηθεί προσθέτοντας στο σύστημα ένα αρκετά υδρόφιλο κατιόν (όπως NH₄⁺), λόγω αύξησης των απωστικών δυνάμεων [34]. Συνήθως μπορούν να διογκωθούν περίπου μέχρι 40 nm σε μήκος και 3.5 nm σε πάχος [35].

Ανάλογα με την σύσταση του Laponite[®] υπάρχουν ποικίλες εμπορικά διαθέσιμες κατηγορίες, όπου παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες και περιορισμούς, και για αυτό το λόγο βρίσκουν εφαρμογή σε διαφορετικά πεδία. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι υπάρχουσες διαφορετικές τάξεις Laponite[®].

Πίνακας 1. Εμπορικά διαθέσιμα είδη Laponite[®] και καταγραφή της μορφής των διαλυμάτων διασποράς τους, των χαρακτηριστικών, των πλεονεκτημάτων και περιορισμών που εμφανίζουν. Λήφθηκε από την παραπομπή [32].

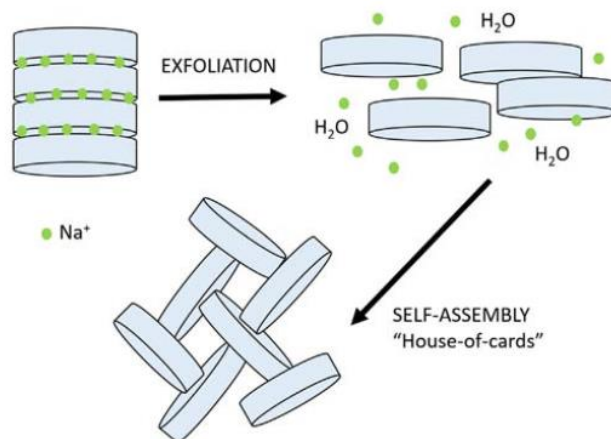
Laponite [®] grade name	Dispersion's Form	Features	Benefits and limitations
RD	Stable gel	General purpose grade	Universal application and high efficiency in water based systems; Rheology control in

			surface coatings, household products and general and industrial fields
RDS	Temporary sol	General purpose sol grade	As for LAPONITE RD, universal application and high efficiency in water based systems, recommended for use in formulations that have low levels of free water. Suitable for use in soft and hard water up to 20 °dH/ 20 °E/ 350 ppm CaCO ₃ .
S482	Permanent sol	Very high sol stability grade	Aqueous dispersions of this grade will remain as stable liquids for very long periods of time. Suitable for use in all levels of water hardness. Recommended for use in highly filled surface coatings that have low levels of free water. Also for use in non-rheology applications, such as electrically conductive, antistatic and barrier films.
SL25	Permanent sol	A long term stable aqueous dispersion of Laponite®	Ready-for-use, simply mix into a ready made formulation. Suitable for use in all levels of water hardness. Recommended for use in highly filled surface coatings. Also for use in non-rheology applications, such as electrically conductive, antistatic and barrier films.
EP	Stable gel	Organic modification for extra performance in “difficult” systems	Functions well in formulas with very high or very low pH level. Recommended for systems containing higher levels of dissolved solids. Very efficient stabilization of emulsions and suspended solids.
JS	Temporary sol	High sol stability grade	Optimized for use in non-rheology applications such as electrically conductive, antistatic and barrier films.
Grades used in personal care products:			
XLG	Stable gel	High purity, certified low heavy metal and low microbiological content.	For rheology control in personal care and cosmetic applications, used to stabilize emulsions, lotions and creams.
XLS	Temporary sol	High purity, certified low heavy metal and low microbiological content.	For rheology control in personal care and cosmetic applications, often used in rinse-off products containing surfactants.

XL21	Stable gel	High purity, certified low heavy metal and low microbiological content.	For rheology control in personal care and cosmetic applications, optimized for use in skincare formulations stabilized at pH 5.5 or lower.
D	Stable gel	Optimized for rapid dispersion insorbitol solution.	For rheology control in toothpaste formulations

1.3. Υδρογέλες Laponite®

Το στερεό Laponite® είναι αδιάλυτο στο νερό, ωστόσο όταν υποβληθεί ταχεία ανάδευση σε υδατικό περιβάλλον διογκώνεται, σχηματίζοντας σε κάποιες περιπτώσεις τρισδιάστατα δίκτυα υδρογελών. Σε συνθήκες vortex τα μόρια του νερού αποσπούν τα κατιόντα νατρίου, διαχωρίζουν πλήρως μεταξύ τους τα δισκία των τακτοειδών και κατόπιν, λόγω ωσμωτικής πίεσης μπορούν να διαχυθούν στην μήτρα του υλικού, δίνοντας διαφανή κολλοειδή διαλύματα. Το μέγεθος της διόγκωσης, όπως προαναφέρθηκε, εξαρτάται από το είδος των κατιόντων που υπάρχουν στους διαστρωματικούς χώρους, την ιονική ισχύ του περιβάλλοντος και τη συγκέντρωση του Laponite® στο υδατικό περιβάλλον. Η απελευθέρωση των κατιόντων νατρίου δημιουργεί μόνιμο αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια των δισκίων. Οι πλευρές των νανοκρυστάλλων μπορούν να αποκτήσουν μερικώς θετικό φορτίο ανάλογα το pH του συστήματος. Στην προκειμένη περίπτωση τα δισκία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ηλεκτροστατικά μέσω της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας και των θετικά φορτισμένων άκρων, επάγοντας την αυτο-οργάνωση του 3D πλέγματος με διαμόρφωση T γνωστή ως «house-of-cards» (Εικόνα 17). Η συγκεκριμένη διαμόρφωση του δικτύου της υδρογέλης εμπεριέχει χώρους (voids) όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί ενθυλάκωση φαρμακευτικών ουσιών καθιστώντας το ιδανικό ως σύστημα μεταφοράς φαρμάκων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σταθερές υδρογέλες σχηματίζονται όταν υπερνικηθούν οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των επιφανειών των δισκίων [23][21][31].



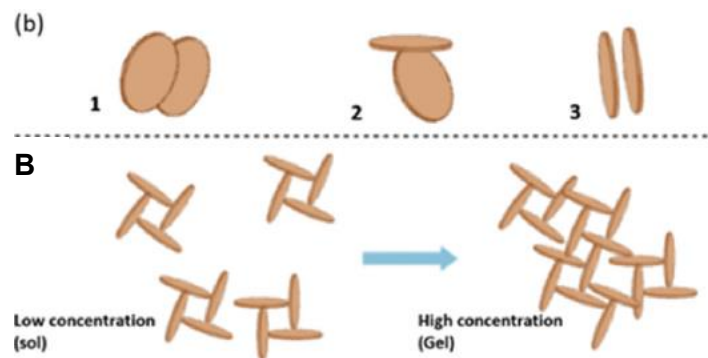
Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση διαχωρισμού των δισκίων των τακτοειδών σε συνθήκες vortex και υδάτινο περιβάλλον, όπου απελευθερώνονται τα διαστρωματικά ιόντα Na^+ . Κατόπιν, αν οι συνθήκες του πειράματος το επιτρέπουν, το σύστημα αυτο-οργανώνεται σε τρισδιάστατο πλέγμα που προσομοιάζει διαμόρφωση αναφερόμενη ως «house-of-cards». Στη συγκεκριμένη διαμόρφωση δημιουργούνται κενοί χώροι (void spaces), όπου μπορούν να ενθυλακωθούν χημικές ενώσεις. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [23].

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των υδρογελών Laponite[®] είναι ότι εμφανίζουν θιξοτροπικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, συμπεριφέρονται ως μη Νευτώνεια υγρά, όταν εφαρμόζεται στην υδρογέλη διατμητική τάση (shear stress) ή όταν ανακινείται έντονα. Με αυτό τον τρόπο, η υδρογέλη μετατρέπεται σε κολλοειδές διάλυμα με μειωμένη τιμή ιξώδους κατά αντιστρεπτό τρόπο. Αν το κολλοειδές διάλυμα αφηθεί να επανέλθει σε ισορροπία επιστρέφει στη μορφή σταθερής υδρογέλης. Η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται gel-sol-gel μετατροπή φάσης. Ο ανασχηματισμός της υδρογέλης πραγματοποιείται σε βαθμό και χρόνο που εξαρτάται από τις συνθήκες του πειράματος [36]. Η παραπάνω ιδιότητα είναι αρκετά σημαντική για την χορήγηση φαρμάκων ενδοφλέβια, υποδόρια ή ενδομυϊκά, καθώς καθιστά εφικτή τη ροή μέσω πολύ λεπτής σύριγγας και παράλληλα τη μείωση της διάχυσης του μεταφερόμενου φαρμάκου στον οργανισμό λόγω μεγάλου ιξώδους του συστήματος.

Άλλο κοινό χαρακτηριστικό που εμφανίζουν τα κολλοειδή διαλύματα του Laponite[®] σε υδατικά συστήματα είναι ότι εμφανίζουν τιμές pH περίπου 10-11, διότι μπορούν να συλλέξουν πρωτόνια από το υδατικό περιβάλλον που εμπεριέχονται λόγω πρωτονίωσης των εκτεθειμένων υδροξυδομάδων. Συνεπώς θεωρείται ότι δρα ως ασθενής βάση [23].

Το ιξώδες των κολλοειδών διαλυμάτων Laponite[®] αυξάνεται με το πέρας του χρόνου λόγω της δυναμικής διάχυσης των σωματιδίων που περιορίζουν την διάχυση του νερού. Ο χρόνος

μετατροπής από την κολλοειδή φάση στη φάση της υδρογέλης εξαρτάται από το pH, τη συγκέντρωση του Laponite[®] και την ιοντική ισχύ του συστήματος. Στις περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης Laponite[®], ο χρόνος που απαιτείται για την πήξη του συστήματος είναι αρκετά μεγάλος. Η χρόνος πήξης στην προκειμένη περίπτωση μπορεί να μειωθεί αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος, προσθέτοντας κάποιο άλας (συνήθως NaCl). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του συστήματος εξαλείφονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των επιφανειών των δισκίων υποβοηθώντας το σύστημα να αλληλεπιδράσει με τον επιθυμητό τρόπο (διαμόρφωση house-of-cards). Πρέπει να ληφθεί όμως υπόψη ότι σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις άλατος υπερισχύουν οι μετωπικές αλληλεπιδράσεις τύπου Van der Waals δίνοντας συσσωματώματα τύπου μπάντας ή στοιβάδας (Εικόνα 18). Η διαμόρφωση που θα λάβουν τα σωματίδια στο δίκτυο της υδρογέλης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαπερατότητα του νερού και τη διάχυση μικρών μορίων. Στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση του Laponite[®] είναι μεγαλύτερη ή ίση με 10 g/L η προσθήκη άλατος δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του χρόνου ζελοποίησης. Τέλος, ο χρόνος πήξης και η συγκέντρωση άλατος δεν έχουν αναλογική συσχέτιση, αλλά η σχέση τους εξαρτάται από το είδος του Laponite[®] [37].

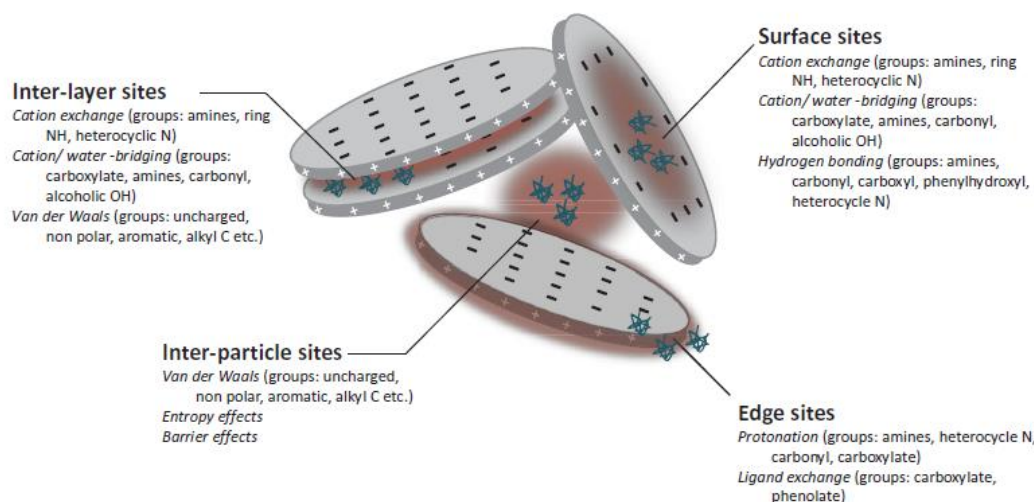


Εικόνα 18. (A) Σχηματική αναπαράσταση αλληλεπίδρασης των δισκίων ανάλογα με την συγκέντρωση του Laponite[®], την ιοντική ισχύ και το pH του υδατικού μέσου. Όταν υπερισχύουν οι απωστικές δυνάμεις τα δισκία Laponite[®] μπορούν να σχηματίσουν μπάντες (1) ή στοιβάδες (3). Αντίθετα, όταν υπερισχύουν οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις, σχηματίζουν τη διαμόρφωση (2). (B) Σε υψηλές συγκεντρώσεις Laponite[®], τα δισκία μπορούν να έρθουν κοντά αναπτύσσοντας εκτεταμένες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό σταθερών υδρογελών. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [21].

1.3.1. Εφαρμογή στις βιοεπιστήμες ως έξυπνο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων

Ο Άργιλος Laponite[®] μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αυτούσιος στο σχηματισμό συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων ή ως πληρωτικό υλικό νανοκλίμακας (nanofiller) σε πιο πολύπλοκα πολυμερικά δίκτυα (scaffold). Στην πρώτη περίπτωση, το ίδιο το υλικό προστατεύει, μεταφέρει και απελευθερώνει τη φαρμακευτική ουσία που φέρει. Στη δεύτερη περίπτωση λειτουργεί ως έκδοχο προκειμένου το σύστημα να αποκτήσει επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. ρυθμίζει τις ρεολογικές ιδιότητες, βοηθάει στην διαλυτοποίηση υδρόφοβων ενώσεων, συνεισφέρει στην γαλακτοματοποίηση) και επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες (μείωση ρυθμού αποικοδόμησης του συστήματος).

Υπάρχουν διάφοροι πιθανοί τρόποι φόρτωσης φαρμακευτικών ουσιών στα συστήματα μεταφοράς Laponite[®]. Ένας από αυτούς αποτελεί η επιφανειακή προσρόφηση ιόντων ή άλλων μορίων μέσω μηχανισμού ιονανταλλαγής ή λόγω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (όπως δυνάμεις Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες ιόντος-νερού). Από την άλλη πλευρά, στις κρυσταλλικές άκρες μπορεί να επιτευχθεί φόρτωση μέσω πρωτονίωσης των εκτεθειμένων -OH ή μέσω αντίδρασης ανταλλαγής υποκαταστάτη (Ligand substitution). Άλλος πιθανός τρόπος αποτελεί η παρεμβολή κάποιας ένωσης μεταξύ των δισκίων στα τακτοειδή, μια διαδικασία που ονομάζεται intercalation. Τέλος, η εισαγωγή κάποιας φαρμακευτικής ένωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενθυλάκωσης (encapsulation) στους πόρους (void spaces) που δημιουργούνται στο διακρυσταλλικό χώρο όταν το υλικό είναι διεσπαρμένο σε υδατικό μέσο (εγκλωβισμένο στους κενούς χώρους της διαμόρφωσης house-of-cards) [33][21]. Ο τρόπος που θα αλληλεπιδράσει το δίκτυο Laponite[®] με τα εισαγόμενα μόρια εξαρτάται από το pH της μήτρας, τα ηλεκτροστατικά χαρακτηριστικά και το μέγεθος του εισαγόμενου μορίου. Στην **Εικόνα 19** απεικονίζονται οι πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης με τα εισαγόμενα μόρια.

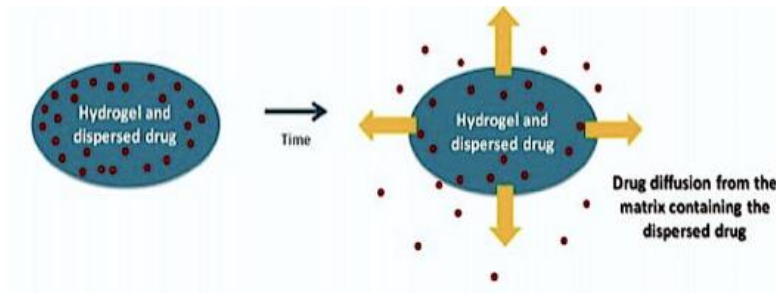


Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων ενεργών περιοχών αλληλεπίδρασης των δισκίων Laponite® με οργανικές ενώσεις: (α) Επιφάνεια δισκίου (Surface site), (β) Άκρες (Edge sites), (γ) Μεταξύ των σωματιδίων στα κολλοειδή διαλύματα (Inter-particle) και (δ) Μεταξύ των φύλλων των τακτοειδών (Inter layer sites). Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [33].

Ο μηχανισμός απελευθέρωσης του φαρμάκου από το σύστημα εξαρτάται από το σχεδιασμό του και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσουν τα συστατικά του με το φάρμακο. Σε γενικότερα πλαίσια μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω διάχυσης της ένωσης ή διόγκωσης του συστήματος ή μέσω χημικής ή ενζυματικής αποικοδόμησης του συστήματος [38].

1. Αποδέσμευση μέσω διάχυσης

Το δίκτυο της υδρογέλης καθυστερεί και ταυτόχρονα ελέγχει την διάχυση των μορίων του φαρμάκου. Αυτό επιτυγχάνεται, διότι τα μόρια πρέπει να διανύσουν ένα ελικοειδές μονοπάτι διαμέσου των πόρων της μήτρας, ώστε να τη διαπεράσουν. Όταν πραγματοποιείται αποδέσμευση φαρμακευτικής ένωσης μικρού μεγέθους μέσω διάχυσης (**Εικόνα 20**), ο χρόνος απελευθέρωσης εξαρτάται από το μέγεθος και το φορτίο της ένωσης. Για την διάχυση μεγαλύτερων μορίων η ταχύτητα εξαρτάται από την σχέση μεταξύ του μεγέθους τους και το μέγεθος των πόρων του δικτύου. Ο χρόνος που απαιτείται για να απελευθερωθεί μία ουσία αυξάνεται σημαντικά, όταν σχηματίζει δραστικούς δεσμούς υδρογόνου και ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [41].



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση απελευθέρωσης φαρμακευτικής ένωσης μέσω διάχυσης από το δίκτυο της υδρογέλης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [38].

2. Αποδέσμευση λόγω διόγκωσης

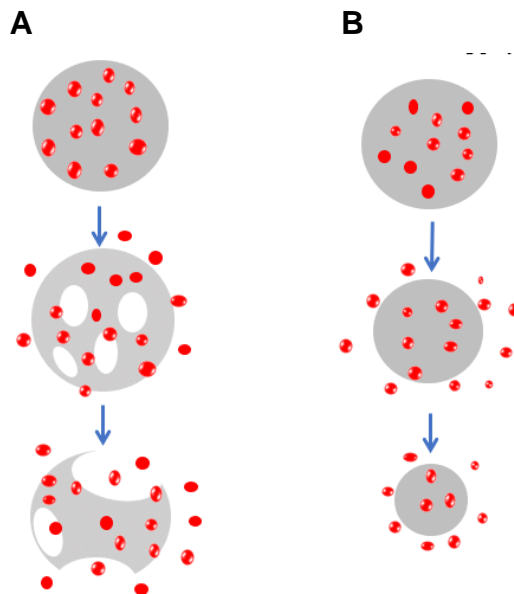
Μη διαλυτά σωματίδια που έχουν την τάση να ενυδατώνονται όταν εμβαπτιστούν σε υδατικά διαλύματα προσροφούν νερό σε ποσοστό που ισοδυναμεί με έως και χιλιάδες φορές το ξηρό τους βάρος. Ως φυσικό επακόλουθο, επέρχεται η διόγκωση των πόρων του και κατ' επέκταση επάγουν την ταχύτερη διάχυση του φαρμάκου από τη μήτρα (**Εικόνα 21**). Ο έλεγχος της αποδέσμευσης μέσω διόγκωσης των πόρων πραγματοποιείται όταν η ταχύτητα διάχυσης του φαρμάκου από τη μήτρα είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα διόγκωσης των πόρων της.



Εικόνα 21. Μηχανισμός αποδέσμευσης μέσω διόγκωσης του δικτύου της υδρογέλης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [40].

3. Αποδέσμευση λόγω διάβρωσης της μήτρας.

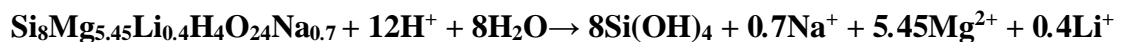
Ένας εναλλακτικός τρόπος αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας είναι μέσω αποικοδόμησης του συστήματος, είτε αυτή πραγματοποιείται σταδιακά από την επιφάνεια (Surface erosion) είτε από όλο το σύνολο της υδρογέλης (Bulk erosion) όπως αναπαριστάται στην **Εικόνα 22**.



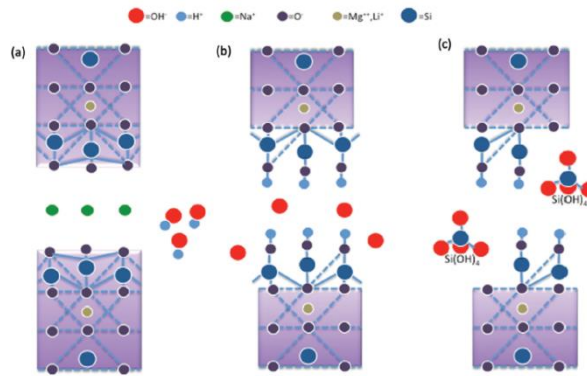
Εικόνα 22. Διαφορετικοί μηχανισμοί διάβρωσης του δικτύου της υδρογέλης: (A) Διάβρωση από το σύνολο του δικτύου (Bulk erosion), (B) Σταδιακή διάβρωση από την επιφάνεια της υδρογέλης. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [43].

Η διάσπαση του συστήματος στην περίπτωση των υδρογελών Laponite[®] μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους:

1. Σε όξινο pH έχουν γίνει αναφορές ότι το υλικό αποικοδομείται δίνοντας πυριτικό οξύ, και ιόντα Mg^{2+} , Na^+ και Li^+ , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



2. Όταν το νερό εισχωρεί στο κενό χώρο μεταξύ των φύλλων Laponite[®] μέσω διάχυσης, πραγματοποιείται αντίδραση υδρόλυσης και συμπύκνωσης με το δεσμό $M^{n+}-O$ παράγοντας ανιόντα υδροξειδίου. Κατόπιν, τα ανιόντα υδροξειδίου προσβάλλουν το δίκτυο του διοξειδίου του πυριτίου της επιφάνειας, αποικοδομούν τους δεσμούς (γέφυρες) $Si-O-Si$ και απελευθερώνουν διαλυτό $Si(OH)_4$ [39], όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 23**.



Εικόνα 23. Μηχανισμός αποικοδόμησης της υδρογέλης Laponite®: (α) Το νερό εισχωρεί μεταξύ των φύλλων Laponite® μέσω διάχυσης (β) Πραγματοποιείται διαδοχική αντίδραση υδρόλυσης και συμπύκνωσης με τον δεσμό Μετάλλου-Οξυγόνου, παράγοντας ιόντα OH⁻ (γ) Τα ιόντα OH⁻ προσβάλλουν το πλέγμα δεσμών Si-O-Si, σχάζοντας αυτούς τους δεσμούς προκαλώντας απελευθέρωση του Si(OH)₄. Η εικόνα λήφθηκε από την [21].

Τα συστήματα μεταφοράς με βάση το Laponite®, λόγω της σύστασής τους και των προϊόντων αποικοδόμησης τους, θεωρούνται βιολογικώς ενεργά. Μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική και την ενζυμική δραστηριότητα, τα ιοντικά κανάλια, μεταβολικές διεργασίες και μονοπάτια σηματοδότησης. Υπάρχουν αναφορές ότι η απελευθέρωση ιόντων Mg²⁺, Li⁺, Si(OH)₄ συνδέεται με αυξημένη οστεογεννητική κυτταρική λειτουργία. Ειδικότερα, τα ιόντα Mg²⁺ συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ρύθμισης της οστεογένεσης. Παράλληλα, τα ιόντα Li⁺ συσχετίζονται με την ενεργοποίηση του οστεογεννητικού γονιδιώματος. Τέλος, η αποδέσμευση πυριτικού οξέος προάγει την σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση [40][44]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, η χρήση υδρογέλης Laponite® αποτελεί ιδανική επιλογή ως σύστημα μεταφοράς αντιοστεοπορωτικών φαρμάκων, διότι φέρει βιοχημικούς παράγοντες που δρουν συνεργιστικά στην αντιμετώπιση των οστικών παθήσεων.

Επίσης, δεν πρέπει να υποβαθμιστεί το γεγονός ότι η αποικοδόμηση και το κυτταροτοξικό προφίλ ενός υλικού ορίζει την έννοια της βιοσυμβατότητας στις βιοεπιστήμες. Τα προϊόντα αποικοδόμησης του Laponite®, όπως εξετάστηκε παραπάνω, μπορούν να επάγουν βιολογικά μονοπάτια, γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η ακριβής κατανόηση του μεταβολισμού τους. Κρίνεται αναγκαία η πραγματοποίηση τοξικολογικών μελετών και περαιτέρω χαρακτηρισμός του υλικού στην αποικοδόμηση τόσο *in vitro* όσο *in vivo*, για να προσδιοριστεί το βιολογικό αντίκτυπο στον οργανισμό και να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της χρήσης του.

1.3.2. Μέθοδος Παρασκευής Υδρογέλης

Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε η χρήση του Αργίλου **Sodium Magnesium Fluorosilicate Laponite® XL-21 XR**. Ένας ενδεικτικός χημικός τύπος για τη συγκεκριμένη ένωση είναι $F_{18}Mg_{16}Na_{10}O_{66}Si_{27}$ ($M_r = 2775 \text{ g/mol}$). Η συγκεκριμένη κατηγορία Laponite® αποτελεί βελτιστοποιημένη μορφή που διατηρεί της απόδοση του υλικού ακόμα και σε συστήματα με $pH = 5.5$ ή χαμηλότερο (φυσιολογικό pH δέρματος). Για την παρασκευή σταθερών υδρογελών σε απιονισμένο νερό θα πρέπει να εμπεριέχει τουλάχιστον 2 % w/w του υλικού. Η πυκνότητα του υλικού ανέρχεται στα 0.9 g/cm^3 . Όπως προαναφέρθηκε στον **Πίνακα 1**, περιέχει χαμηλό ποσοστό βαρέων μετάλλων (συγκεκριμένα, $Pb < 5 \text{ mg/kg}$ και $As < 1 \text{ mg/kg}$). Επιπρόσθετα, έχει αποστειρωθεί από μικροοργανισμούς με ακτίνες X (εκεί οφείλεται η συντομογραφία XR στην εμπορική ονομασία του). Η συγκεκριμένη τάξη Laponite® μπορεί να αναμιχθεί με αιθανόλη (> 60 %) και να σχηματίσει κολλοειδή διαλύματα.

Η παρασκευή των υδρογελών Laponite® επιτυγχάνεται με την μέθοδο της απλής διασποράς σε υδατικό μέσο. Ειδικότερα, υδρογέλες σχηματίζονται με ταχεία ανάδευση του υλικού (Vortex) σε θερμοκρασία $15-25 \text{ }^\circ\text{C}$, για τουλάχιστον 20 λεπτά, σε απιονισμένο νερό. Πρέπει να σημειωθεί ότι, η διασπορά γίνεται πρωταρχικά σε υδατικό μέσο με μειωμένη ιονική ισχύ για να δημιουργηθούν ομογενή κολλοειδή διαλύματα. Σημαντική επίσης είναι η σταδιακή προσθήκη του στερεού στην υδατική φάση για την αποφυγή δημιουργίας κροκκιδωμάτων. Όταν τα σωματίδια του Laponite® XL-21 XR ενυδατωθούν πλήρως και ολοκληρωθεί η διασπορά δίνουν ένα διάφανο, άοσμο, άχρωμο και χαμηλού ιξώδους προ-μίγμα.

Η ρύθμιση της υδρογέλης και η ανάπτυξη του ιξώδους πραγματοποιείται μετά το σχηματισμό του προ-μίγματος, προσθέτοντας τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος. Κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί ότι, το ιξώδες του συγκεκριμένου προ-μίγματος εμφανίζει μεγάλη εξάρτηση από τη θερμοκρασία, το pH και τους ηλεκτρολύτες που είναι παρόντες. Πολλές φορές, ο σχηματισμός ομοιογενών υδρογελών υψηλής περιεκτικότητας Laponite® χωρίς την δημιουργία ζελοποιημένων-πυρήνων (gel-seeds) αποτελεί πρόκληση, λόγω απουσίας της απαραίτητης ποσότητας νερού. Σε αυτή την περίπτωση οι πυρήνες μπορούν να διαλυτοποιηθούν προσθέτοντας στο προ-μίγμα πυροφωσφορικό νάτριο, ή μικρού μοριακού βάρους πολυ-γλυκόλες (π.χ. PEG, PPG). Κατόπιν, το σύστημα αφήνεται να ωριμάσει σε συνθήκες και χρόνο που εξυπηρετούν τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος [45].

1.3.3. Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογέλης Laponite®

Η σύσταση του Laponite® καθιστά εφικτή την επιφανειακή εισαγωγή πρόσθετων λειτουργικών ομάδων (grafting) με στόχο τη βελτιστοποίηση της απόδοσης του υλικού και τη ρύθμιση των ιδιοτήτων του. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε με φυσικό τρόπο (μη-ομοιοπολική τροποποίηση), είτε με χημικό τρόπο (ομοιοπολική τροποποίηση).

Φυσική Τροποποίηση:

Η φυσική τροποποίηση της υδρογέλης Laponite® επιτυγχάνεται εισάγοντας πολικά μόρια ή ιόντα, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες ή με τα θετικά φορτισμένα άκρα του νανοκρυστάλλου. Σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελεί ο σχηματισμός σταθερών υδρογελών με ισχυρές μηχανικές ιδιότητες που ταυτόχρονα εμφανίζουν ικανότητα αυτο-αναγέννησης (self-healing). Συνεπώς, στην περίπτωση καταστροφής του δικτύου της υδρογέλης, αυτή μπορεί να επανέλθει στην πρωταρχική της μορφή, λόγω της αντιστρεπτότητας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έναντι των ομοιοπολικών [23].

Χημική τροποποίηση:

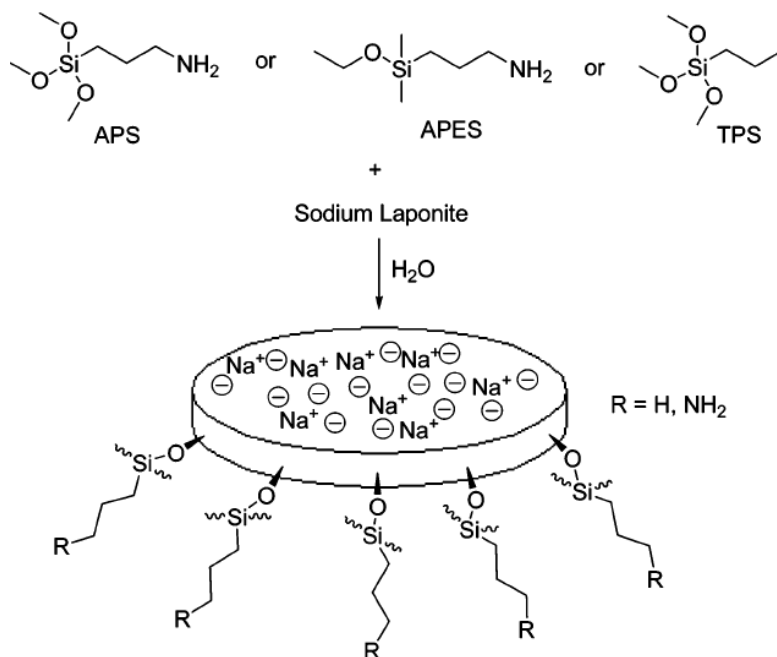
Κάθε νανοδισκίο Laponite® περιέχει περίπου 200 ενεργοποιημένες περιοχές σιλοξανίου (11 mequiv / 100 g ορυκτού) [35], καθιστώντας το ιδανικό υπόστρωμα για αλληλεπίδραση με κάποιο οργανοσιλάνιο (σιλανοποίηση). Τα οργανοσιλάνια, αποτελούν ενώσεις τύπου $R_xSi(OR')_y$ ($x + y = 4$), όπου το R αντιπροσωπεύει το οργανικό μέρος και OR' μία ομάδα η οποία μπορεί να υδρολυθεί (συνήθως $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$) [49]. Στον **Πίνακα 2** αναπαριστώνται μερικά παραδείγματα οργανοσιλανίων που χρησιμοποιούνται ευρέως.

Πίνακας 2. Επιλεγμένα παραδείγματα οργανοσιλανίων που χρησιμοποιήθηκαν ως παράγοντες διασταύρωσης σιλανίων, όπως λήφθηκαν από την παραπομπή [45].

abbreviation	name	chemical struture
APMDES	aminopropyl methyldiethoxysilane	$H_2N(CH_2)_3(CH_3)Si(OC_2H_5)_2$
APMDMOS	(3-acryloxypropyl)methyldimethoxysilane	$CH_2=CHCOO(CH_2)_3(CH_3)Si(OCH_3)_2$
APTES (APTS, APTEOS, APrTEOS)	3-aminopropyltriethoxysilane	$H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$
APTMS (APTMOS, APrTMOS)	3-aminopropyltrimethoxysilane	$H_2N(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$
APTMS (APTMOS)	(3-acryloxypropyl)trimethoxysilane	$CH_2=CHCOO(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$
APTMS (APTMOS)	aminophenyltrimethoxysilane	$H_2NPhSi(OCH_3)_3$
TESPT	bis(triethoxysilylpropyl)tetrasulfane	$(C_2H_5O)_3Si(CH_2)_3S_4(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$
DDS	dimethyldichlorosilane	$(CH_3)_2SiCl_2$
GPS (GPTS, GOTMS, GPTMOS, KH560)	3-glycidoxypropyltrimethoxysilane, 3-glycidylxypropyltrimethoxysilane	$CH_2(O)CHCH_2O(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$
ICPTES	3-isocyanatopropyltriethoxysilane	$OCN(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$
MMS	methacryloxymethyltriethoxysilane	$CH_2=C(CH_3)COOCH_2Si(OC_2H_5)_3$
MPS (MPTMS, MPTS, MAMSE, MATMS, MSMA, TPM, MEMO, KH570)	methacrylic acid 3-(trimethoxysilyl) propyl ester, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane	$CH_2=C(CH_3)COO(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$
MPTES	methacryloxypropyltriethoxysilane	$CH_2=C(CH_3)COO(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$
MPTS	mercaptopropyl triethoxysilane	$SH(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$
MTES	methyltriethoxysilane	$CH_3Si(OC_2H_5)_3$
PTMS	phenyltriethoxysilane	$PhSi(OCH_3)_3$
VTES	vinyltriethoxysilane	$CH_2=CHSi(OC_2H_5)_3$
VTS	vinyltrimethoxysilane	$CH_2=CHSi(OCH_3)_3$

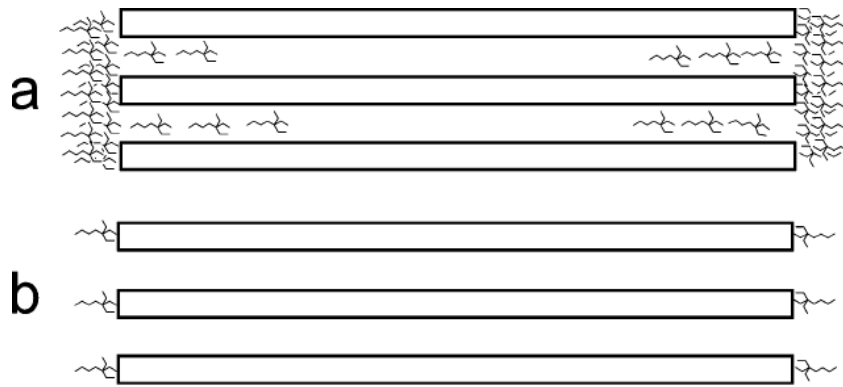
Αξιοποιώντας τον ομοιοπολικό δεσμό σιλοξανίου (Si-O-Si), μπορούν να εισαχθούν επιφανειακά στους ναοκρυστάλλους πρόσθετες λειτουργικές ομάδες (όπως αμινομάδα, καρβοξυλομάδα) ή αδρανείς κορεσμένες ανθρακικές αλυσίδες, μεταβάλλοντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Το οργανοσιλάνιο μπορεί να δράσει και ως οργανική «γέφυρα» μεταξύ γειτονικών σωματιδίων Laponite[®] και να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις διασταύρωσης που θα αλλάξουν τη μορφολογία και το πορώδες του. Κατ' αυτό τον τρόπο μπορούν να αναπτυχθούν υβριδικά Ανόργανα-Οργανικά υλικά, που εξυπηρετούν τη βελτιστοποίηση της απόδοσης του συστήματος για συγκεκριμένες εφαρμογές.

Στην περίπτωση που το οργανοσιλάνιο φέρει λειτουργικές ομάδες, η ηλεκτροθετικότητα του Si καθιστά την ένωση δραστικότερη σε ανόργανες αντιδράσεις έναντι των οργανικών αντιδράσεων που μπορούν να πραγματοποιηθούν από τις συμπληρωματικές ομάδες [49]. Το οργανοσιλάνιο μπορεί να αλληλεπιδράσει με την επιφάνεια του Laponite[®] με ομοιοπολικό ή ιοντικό δεσμό ή μέσω φυσικής προσρόφησης. Για να μπορέσει να αλληλεπιδράσει με ομοιοπολικό τρόπο με την υδρογέλη (Εικόνα 24), πρέπει πρώτα να υδρολυθούν οι -αιθοξυ και -μεθοξυ εστερικές ομάδες που φέρει. Συνήθως, τα οργανοσιλάνια αντιδρούν πολύ γρήγορα με το νερό δίνοντας το αντίστοιχο ενεργοποιημένο προϊόν που φέρει τελικές ομάδες σιλανόλης, -Si-OH. Το ενεργοποιημένο σιλάνιο είναι ασταθές και έχει την τάση να συμπυκνώνεται ταχέως, σχηματίζοντας το αντίστοιχο σιλοξάνιο με κάποιο υπόστρωμα (που φέρει -OH ομάδες όπως M-OH ή Si-OH) ή με τον εαυτό του [49].

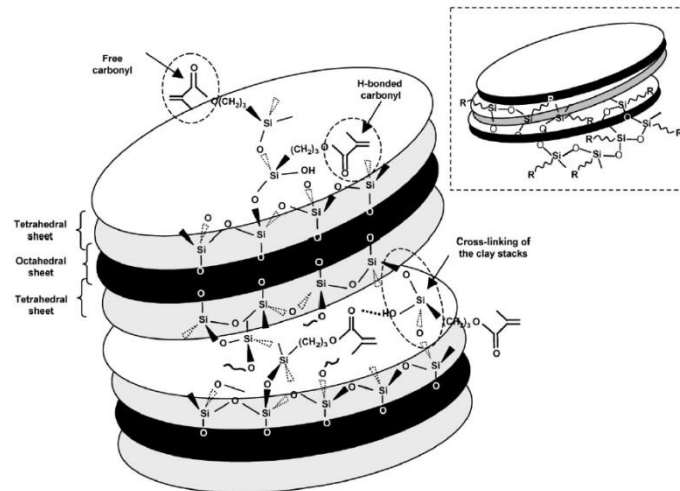


Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση ομοιοπολικής τροποποίησης των νανοδισκίων Laponite[®] μέσω σχηματισμού δεσμού σιλοξανίου με τις εκτεθειμένες ομάδες Si-OH. Η ομοιοπολική τροποποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με οργανοσιλάνια που φέρουν αμινομάδα (APS, APES) ή απλή κορεσμένη ανθρακική αλυσίδα (TPS). Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [35].

Η ομοιοπολική τροποποίηση μπορεί να επιτευχθεί με μονοδοντικό, διδοντικό ή τριδοντικό τρόπο. Ανάλογα με τον τρόπο αλληλεπίδρασης, μπορεί να προσδώσει εντελώς διαφορετικά χαρακτηριστικά στο σύστημα. Ειδικότερα, όταν χρησιμοποιείται μονοαλκοξυσιλάνιο, που περιέχει μόνο μία διαθέσιμη ομάδα, αυτό μπορεί να συμπυκνωθεί με μία αποκλειστικά εκτεθειμένη ομάδα σιλανόλης του ορυκτού, περιορίζοντας έτσι τις αντιδράσεις ολιγομερισμού. Ο ολιγομερισμός των αλκοξυσιλανίων επάγει τον περιορισμό της διαθεσιμότητας των αμινομάδων. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι στο μονοδοντικό τρόπο αλληλεπίδρασης τα σωματίδια Laponite[®] εξακολουθούν να μπορούν να υποστούν διασπορά σε υδατικό μέσο μετά την τροποποίησή τους (**Εικόνα 25**). Αντίθετα, στην περίπτωση της τριδοντικής τροποποίησης τα τριαλκοξυσιλάνια μπορούν να φέρουν κοντά και να ενώσουν τα γειτονικά φύλλα του ορυκτού, δημιουργώντας μεγαλύτερα συσσωματώματα, όπως γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 26**. Κατ' αυτό τον τρόπο αναπτύσσεται στερεοχημική παρεμπόδιση, και τα μόρια του υδατικού μέσου δε μπορούν να εισχωρήσουν εντός της μήτρας, έτσι ώστε το υλικό να ενυδατωθεί. Συνεπώς, μειώνεται η ικανότητα διασποράς του υλικού σε υδατικό μέσο και επιβραδύνεται η ταχύτητα αντιδράσεων ιονανταλλαγής [35][48].

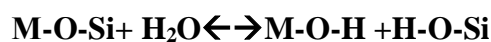


Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση αλληλεπίδρασης του ορυκτού με διαφορετικού είδους αλκοξυσιλάνια. (α) Όταν χρησιμοποιούνται τριαλκοξυσιλάνια, λόγω ολιγομερισμού επιβάλλουν τη χωρική προσέγγιση των σωματιδίων του Laponite®, δημιουργώντας στερεοχημική παρεμπόδιση. (β) Στην περίπτωση των μονοαλκοξυσιλανίων, δε δημιουργείται στερεοχημική παρεμπόδιση. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [35].



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση τριδοντικής ομοιοπολικής τροποποίησης του Laponite® με το τριαλκοξυσιλάνιο γ-MPDES. Ο ολιγομερισμός του γ-MPDES προκαλεί τη χωρική προσέγγιση των φύλλων του υλικού, δημιουργώντας στερεοχημική παρεμπόδιση. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [47].

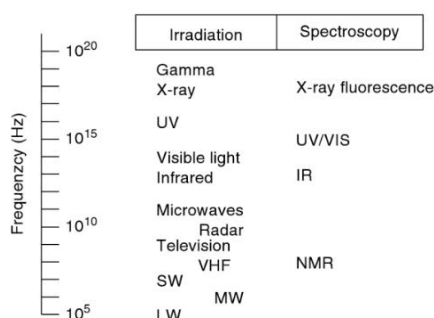
Ο δεσμός σιλοξανίου έχει υψηλό χαρακτήρα ιονικού δεσμού, και είναι ευαίσθητος στην ύπαρξη υγρασίας στο σύστημα. Ως φυσικό επακόλουθο, οι δεσμοί που σχηματίζονται μπορούν να σπάσουν αντιστρεπτά και το σύστημα να φτάσει σε μία δυναμική ισορροπία που αναγράφεται παρακάτω. Η κατεύθυνση της χημικής ισορροπίας που θα υπερισχύσει, εξαρτάται από τη συγκέντρωση του οργανοσιλανίου, του διαθέσιμου νερού (clay's interface moisture), του ανόργανου υποστρώματος, καθώς και από τις σταθερές ισορροπίας [50].



1.4. Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR)

Εισαγωγή

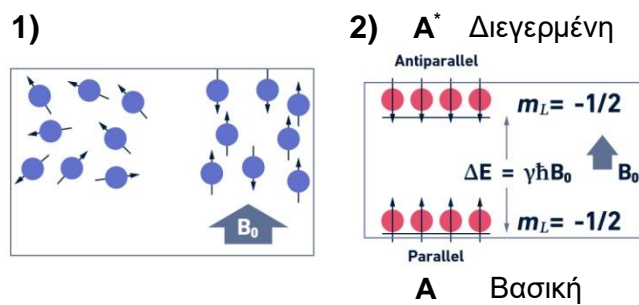
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί μία από τις σημαντικότερες φασματοσκοπικές αναλυτικές τεχνικές, διότι είναι μη καταστρεπτική και αρκετά ευαίσθητη. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο των πυρήνων, όπου παρουσία μαγνητικού πεδίου απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ενέργειας που εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του πυρήνα). Βασίζεται στην μαγνητική διέγερση πυρήνων, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας (ραδιοσυχνότητες κλίμακας 10^5 - 10^8 Hz). Προϋπόθεση για να είναι ορατοί οι πυρήνες στο NMR είναι να διαθέτουν περιττό ατομικό ή μαζικό αριθμό, έτσι ώστε να διαθέτουν συνολικό spin διαφορετικό του μηδενός ($I \neq 0$).



Εικόνα 27. Διαγραμματική αναπαράσταση των ενεργειακών επιπέδων διαφορετικών φασματοσκοπικών μεθόδων. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [51].

Οι πυρήνες αποτελούν φορτισμένα στοιχειώδη σωματίδια που λόγω της ιδιοπεριστροφής τους, παράγουν τοπικά μαγνητικό πεδίο. Ως φυσικό επακόλουθο, μπορούν να χαρακτηριστούν ως στοιχειώδεις μαγνήτες. Η κβαντική ενεργειακή στάθμη του πυρηνικού spin, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, είναι εκφυλισμένη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση οι πυρήνες λαμβάνουν όλους του πιθανούς προσανατολισμούς και δεν παρατηρείται μαγνήτιση του δείγματος. Αντίθετα, όταν εφαρμόζεται εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_0) οι πυρήνες προσανατολίζονται σε σχέση με το B_0 , ο εκφυλισμός αίρεται και τα ενεργειακά επίπεδα σχάζονται σε $2I+1$ επίπεδα. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι πυρήνες ^1H , ^{13}C , ^{29}Si και ^{31}P όπου έχουν ολικό μαγνητικό spin $1/2$, συνεπώς η

εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σχάζει την αρχική ενεργειακή στάθμη της θερμοδυναμικής ισορροπίας σε δύο, την βασική (A) που λαμβάνει παράλληλη διαμόρφωση ($m_l = + 1/2$) και την διεγερμένη (A*) με αντιπαράλληλη ($m_l = - 1/2$) διαμόρφωση ως προς το B_0 . Οι διαμορφώσεις των διανυσμάτων των σπιν απουσία και παρουσία μαγνητικού πεδίου καθώς και η σχέση των ενεργειακών επιπέδων γίνεται εμφανές στην **Εικόνα 28**.



Εικόνα 28. (1) Σχηματική αναπαράσταση διαμόρφωσης των πυρήνων απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 και παρουσία αυτού. (2) Αναπαράσταση αίρεσης των ενεργειακών επιπέδων των πυρήνων με συνολικό σπιν $1/2$, παρουσία μαγνητικού πεδίου B_0 . Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [52].

Η κατανομή του πληθυσμού στις δυο πιθανές διαμορφώσεις ακολουθεί την στατιστική προσέγγιση Boltzmann, όπου εντοπίζεται περίσσεια πληθυσμού στην βασική κατάσταση. Συνεπώς, μπορούν να πραγματοποιηθούν μεταβάσεις μεταξύ της βασικής και της διεγερμένης κατάστασης όταν οι πυρήνες απορροφήσουν κατάλληλο ποσό ενέργειας. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ακτινοβολία πηγής, το δείγμα θα πρέπει να διεγερθεί από συχνότητα ίση με την ενεργειακή διαφορά των δύο στάθμεων. Η προαναφερόμενη ακτινοβολία ονομάζεται συχνότητα Larmor και υποβάλλει τον πυρήνα σε συντονισμό. Όπως γίνεται εμφανές από την παρακάτω σχέση η συχνότητα διέγερσης των σπιν εξαρτάται ευθέως ανάλογα από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και τον γυρομαγνητικό λόγο του εκάστων πυρήνα.

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = h\nu$$

γ : γυρομαγνητικός λόγος

\hbar : Η σταθερά του Planck διαιρεμένη με τον παράγοντα 2π ($\frac{h}{2\pi}$)

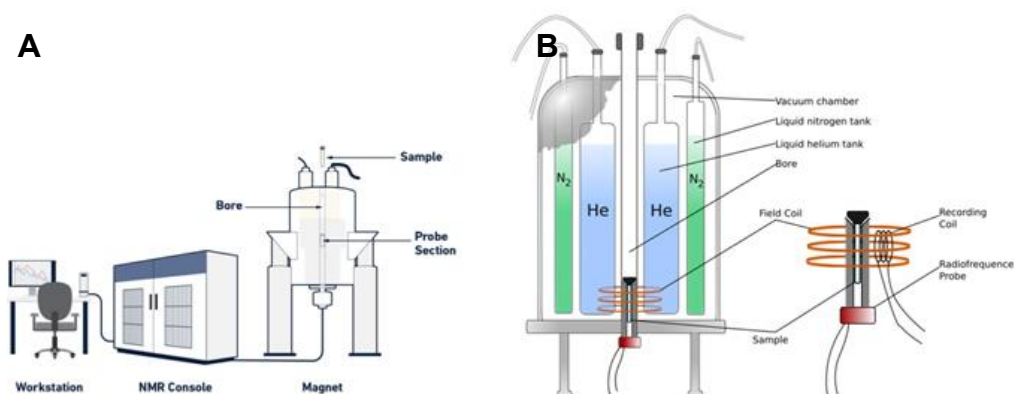
B_0 : Εξωτερικό μαγνητικό πεδίο

h: Σταθερά του Planck

v: Συχνότητα Larmor

Οργανολογία

Ο φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελείται από τα εξής βασικά μέρη (**Εικόνα 29**): σωληνοειδή μαγνήτη, σύστημα ψύξης, αισθητήρας (probe), πομπό ραδιοσυχνοτήτων, προενισχυτή, δέκτη και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο μαγνήτη δημιουργείται σταθερό ομογενές πεδίο (B_0) με στόχο την ευθυγράμμιση των πυρηνικών spin των ατόμων. Η χρήση συστήματος ψύξης κρίνεται αναγκαία, καθώς ο σωληνοειδής μαγνήτης αποτελείται από υπεραγώγιμο υλικό. Συγκεκριμένα, το σύστημα ψύξης περιλαμβάνει εσωτερικό περίβλημα που το διαρρέει υγρό ήλιο, ένα εξωτερικό περίβλημα ψύξης που εμπεριέχει υγρό άζωτο και πολλές στρώσεις μονωτικού υλικού. Μέσα στον υπεραγώγιμο μαγνήτη υπάρχει ένας κυλινδρικός θάλαμος (probe) όπου μπορεί να εισαχθεί το δείγμα και να εκτεθεί στο μαγνητικό πεδίο. Στο probe υπάρχουν επίσης μαγνητικά πηνία που έχουν ως στόχο είτε την διέγερση του δείγματος με εκπομπή ραδιοσυχνοτήτων ή την λήψη του σήματος αποδιέγερσης. Η αποδιέγερση του δείγματος παράγει ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο ενισχύεται και μεταβιβάζεται στο δέκτη και κατόπιν μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα μέσω μετασχηματιστή. Στην συνέχεια μέσω μαθηματικής επεξεργασίας κατά Fourier μετατρέπεται από κυματοειδές σήμα ως προς το χρόνο σε φάσμα έντασης συναρτήσεως της συχνότητας. Τέλος, μέσω κατάλληλου λογισμικού διορθώνεται η φάση, η γραμμή της βάσης του φάσματος και βαθμονομείται (εφόσον αυτό είναι εφικτό), για την ορθή εξαγωγή συμπερασμάτων.



Εικόνα 29. (A) Σχηματική αναπαράσταση βασικών τμημάτων ενός φασματογράφου NMR, (B) Σχηματική αναπαράσταση του probe. Οι εικόνες λήφθηκαν από την παραπομπή [52].

Φάσματα

Στον άξονα χ του φάσματος που λαμβάνεται αναπαριστώνται κορυφές με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις ενώ στον άξονα y αντιπροσωπεύει την ένταση του σήματος και για κάποιους πυρήνες είναι ευθέως ανάλογο του πλήθους. Η χημική μετατόπιση δ εκφράζεται σε μονάδες ppm (parts per million) σε σχέση με σημείο αναφοράς που συνήθως ορίζεται αυθαίρετα η κορυφή απορρόφησης του τετραμέθυλο σιλανίου (TMS) ως $\delta = 0$ ppm. Η χημική μετατόπιση αποτελεί αδιάστατο μέγεθος και είναι ανεξάρτητο του οργάνου που χρησιμοποιείται. Ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας (Hz) του προς μελέτη πυρήνα ως προς τη συχνότητα (Hz) του φασματογράφου NMR πολλαπλασιαζόμενο επί 10^6 .

$$\delta = \frac{\omega_{TMS} \cdot \omega_I}{\gamma_I \cdot B_0} \cdot 10^6$$

Εντός μαγνητικού πεδίου συγκεκριμένης έντασης (B_0), θα αναμενόταν όλοι οι πυρήνες ενός δεδομένου ατόμου να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Αντίθετα, κάθε πυρήνας αντιλαμβάνεται διαφορετικά το μαγνητικό πεδίο (B_{eff}) λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος. Συνεπώς, η διαφοροποίηση του B_{eff} επάγει την μεταβολή των συνθηκών συντονισμού, άρα λαμβάνονται διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις για πυρήνες με διαφορετικό χημικό περιβάλλον.

Στη φασματοσκοπία NMR οι κορυφές εμφανίζουν πολλαπλότητα, λόγω σύζευξης των spin (*spin-spin coupling*) μεταξύ ενεργών πυρήνων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Η πολλαπλότητα που θα εμφανίσει η εκάστοτε κορυφή εξαρτάται από το πλήθος και το συνολικό spin του γειτονικού πυρήνα που αλληλεπιδρά. Στην περίπτωση που μελετώνται πυρήνες με συνολικό spin $1/2$, η κορυφή σχάζεται σύμφωνα με τον κανόνα πολλαπλότητας σε $N+1$ κορυφές (που αντιστοιχούν σε $N+1$ καταστάσεις spin των γειτονικών ομάδων των spin). Η προαναφερόμενη σχάζση από τη σταθερά σύζευξης J , η οποία μετριέται σε μονάδες συχνότητας (Hz) και ορίζεται ως η απόσταση των υποδεέστερων κορυφών που συνιστούν μια πολλαπλή κορυφή.

Γενικότερα, όσο πιο μεγάλη η ένταση του εξωτερικού πεδίου B_0 τόσο καλύτερη είναι η ευκρίνεια του φάσματος. Για δεδομένη τιμή έντασης του B_0 , η ευαισθησία της ανάλυσης εξαρτάται από τον γυρομαγνητικό λόγο του προς μελέτη πυρήνα. Όσο μεγαλύτερος ο γυρομαγνητικός λόγος, τόσο μεγαλύτερη ευαισθησία επιτυγχάνεται. Επιπρόσθετα, η ευκολία παρατήρησης του πυρήνα (receptivity), εξαρτάται από το γινόμενο της ευαισθησίας επί την

αφθονία του. Στον **Πίνακα 3** γίνονται εμφανής μερικοί από τους συχνότερους προς μελέτη πυρήνες στις φαρμακευτικές ενώσεις, το συνολικό τους spin, η φυσική τους αφθονία και την συχνότητα που συντονίζονται σε 300 MHz φασματογράφο ($B_0 = 7.05$ Tesla).

Πίνακας 3. Αναφορά των σημαντικότερων πυρήνων που μελετώνται στις φαρμακευτικές ενώσεις και καταγραφή του συνολικού spin, της φυσικής αφθονίας και της συχνότητας που εμφανίζονται, όταν εφαρμόζεται $B_0 = 7.05$ T. Ο πίνακας λήφθηκε από την παραπομπή [51].

Isotope	Spin quantum no. I	Natural abundance (%)	NMR frequency (MHz) at 7.05 T
^1H	1/2	99.98	300
^{11}B	$3 \times 1/2$	80.42	96.25
^{13}C	1/2	1.11	75.43
^{14}N	1	99.63	21.67
^{15}N	1/2	0.37	30.40
^{17}O	$5 \times 1/2$	0.037	40.67
^{19}F	1/2	100	282.23
^{29}Si	1/2	4.7	59.6
^{31}P	1/2	100	121.44

Στη συγκεκριμένη εργασία, η ποσοτικοποίηση της αποδέσμευσης του φαρμάκου από την υδρογέλη στην υπερκείμενη φάση και η αναπαράσταση του κινητικού προφίλ της ως συνάρτηση της % αποδέσμευσης ως προς το χρόνο, πραγματοποιήθηκε μέσω ^1H qNMR ή ^{31}P qNMR. Είναι γνωστό ότι στις προαναφερόμενες μεθόδους ποσοτικοποίησης το σήμα των κορυφών είναι ευθέως ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που αντιπροσωπεύει. Η ποσοτικοποίηση του φαρμάκου επιτεύχθηκε με την χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος, και ισχύει η παρακάτω αναλογία:

$$\frac{I_{\text{αναλύτη}}}{N_{\text{αναλύτη}}} = \frac{I_{\text{reff}}}{N_{\text{reff}}}$$

I: Ένταση σήματος (Ολοκλήρωμα)

N: Αριθμός πυρήνων που αντιπροσωπεύει η κορυφή

2. Στόχος Εργασίας

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματεύεται το σχεδιασμό αποκρίσιμων υδρογελών Laponite® XL-21 XR, που περιέχουν το αντιστεοπορωτικό φάρμακο Etidronic acid, με στόχο την ελεγχόμενη αποδέσμευσή του. Ο Άργιλος Laponite®, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αποτελεί βιοσυμβατό υλικό με εξαιρετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η σύστασή του και η υψηλή θιξοτροπική συμπεριφορά του παρουσιάζουν ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, για την μελέτη του συστήματος με στόχο την εφαρμογή του σε ενέσιμα διφωσφονικά φάρμακα. Κατ' αυτό τον τρόπο μπορούν να αναπτυχθούν συστήματα για πιο στοχευμένη θεραπεία των οστικών παθήσεων.

Παρακάτω μελετάται η χημική σταθερότητα της υδρογέλης όταν εκτίθεται σε υδατικό μέσο που επικρατούν συγκεκριμένες συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ιόντων Mg^{2+} και διαλυτού $Si(OH)_4$ που διαρρέουν από την υδρογέλη. Επίσης, είναι σημαντική η μεταβολή της τιμής του pH της υπερκείμενης φάσης όπου θα πραγματοποιηθεί η αποδέσμευση της φαρμακευτικής ένωσης, με στόχο να προσδιοριστεί η αναγκαιότητα χρήσης ρυθμιστικού διαλύματος.

Ακολουθεί μελέτη του κινητικού προφίλ αποδέσμευσης του Etidronic acid από την υδρογέλη Laponite® XL-21 XR και πώς αυτό μεταβάλλεται τροποποιώντας διαφορετικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η απόκριση του συστήματος σε τιμή **pH = 1.3** που προσεγγίζει τις συνθήκες στο ανθρώπινο στομάχι, αλλά και σε τιμή **pH = 7.4** που αντιπροσωπεύει τις συνθήκες που επικρατούν στο πλάσμα του αίματος. Κατόπιν, διερευνάται η επιρροή της θερμοκρασίας, με μελέτες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (**T = 25 °C**) και θερμοκρασία σώματος (**T = 36.6 °C**). Ακολούθως, γίνεται ενδελεχής μελέτη του πώς η διαφορετική σύσταση (διαφορετική ιονική ισχύς) του μέσου αποδέσμευσης μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα **Phosphate, Tris-HCl** και διάλυμα που προσεγγίζει την ιοντική σύσταση και pH του πλάσματος (**SBF**). Μελετώνται η **διαφορετική συγκέντρωση φαρμάκου** και η **έκθεση σε διαφορετικού όγκου μέσου απελευθέρωσης**. Επιπρόσθετα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί βαθύτερη κατανόηση στον τρόπο αλληλεπίδρασης του Etidronic acid με το δίκτυο της υδρογέλης, εκτελούνται **πειράματα ανταγωνισμού με EDTA** (Αιθυλοδιαμινο τετραοξικό οξύ) ως μέρος του συστήματος της υδρογέλης και ως μέρος του συστήματος του μέσου που θα αποδεσμευτεί.

Τέλος, επιχειρείται να πραγματοποιηθεί επιφανειακή τροποποίηση της υδρογέλης με τα αντιδραστήρια σύζευξης σιλανόλης (silane grafting agents) **APTES** (3-aminopropyltriethoxy silane) και **TESPSA** (3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride). Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα προαναφερόμενα οργανοσιλάνια ήταν η αξιολόγηση της παρουσίας θετικά (**APTES**) ή αρνητικά (**TESPSA**) φορτισμένων ομάδων. Ανάλογα με το αν αυτές αναπτύσσουν ελκτικές ή απωστικές αλληλεπιδράσεις με το φάρμακο, θα επηρεαστεί η αποδέσμευσή του. Η δοκιμή ομοιοπολικής τροποποίησης εξετάζεται με τους εξής τρεις διαφορετικούς τρόπους: (α) την εισαγωγή τους πριν το σχηματισμό του δικτύου της υδρογέλης, (β) μέσω one-pot αντίδρασης (γ) μέσω φυσικής προσρόφησης σε προσχηματισμένο δίκτυο υδρογέλης.

Στόχος λοιπόν της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη έξυπνων συστημάτων υδρογέλης Laponite® XL-21 XR, που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα και αποδεσμεύουν με ελεγχόμενο τρόπο το αντιοστεοπορωτικό φάρμακο Etidronic acid. Επίσης, επιχειρείται η τροποποίηση του υλικού με την προσθήκη φορτισμένων λειτουργικών ομάδων, που θα επηρεάσουν με επιθυμητό τρόπο τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συστήματος και κατ' επέκταση το κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης του φαρμάκου.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. Χημικά Αντιδραστήρια και Όργανα

Τα παρακάτω αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν όπως λήφθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Σε όλα τα υδατικά συστήματα έγινε χρήση απιονισμένου νερού από εργαστηριακή ιονανταλλακτική στήλη ρητίνης, με εξαίρεση τα πειράματα επιφανειακής τροποποίησης με την μέθοδο της φυσικής προσρόφησης όπου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό καθαρότητας HPLC (ROTISOLV[®], CASNo. 7732-18-5). Για την ρύθμιση των υδρογελών, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα συγκεκριμένης συγκέντρωσης NaOH και HCl.

Laponite[®] XL-21 XR (BYK), **Etidronic Acid Dequest 2010** (Italmatch, CAS No: 2809-21-4), **H₃PO₃** (Sigma Aldrich, CAS No: 13598-36-2), **H₃PO₄ 85 %** (Scharlab, CAS No: 7664-38-2), **NaH₂PO₄·H₂O** (Sigma Aldrich, CAS No: 10049-21-5), **KH₂PO₄** (Sigma Aldrich, CAS No: 7778-77-0), **Na₂HPO₄·7H₂O** (Sigma Aldrich, CAS No: 7782-85-6), **Tris(hydroxymethyl) aminomethane** (Sigma Aldrich, CAS No: 77-86-1), **Na₂SO₄** (Merck, CAS No: 7757-82-6), **CaCl₂·2H₂O** (Sigma Aldrich, CAS No: 10043-52-4), **MgCl₂·6H₂O** (Sigma Aldrich, CAS No: 7791-18-6), **NaHCO₃** (Sigma Aldrich, CAS No: 144-55-8), **NaCl** (Sigma Aldrich, CAS No: 7647-14-5), **KCl** (Sigma Aldrich, CAS No: 7447-40-7), **Na₂EDTA 98 % καθαρότητα** (Alfa Aesar, CAS No: 200-573-9), **Eriochrome black T** (Alfa Aesar, CAS No: 1787-61-7), **NH₄Cl** (Sigma Aldrich, CAS No: 12125-02-9), **H₂C₂O₄·2H₂O** (Sigma Aldrich, CAS No: 205-634-3), **(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O** (Merck, CAS No: 12054-85-2), **4-amino-3-hydroxynaphtalene-1-sulfonicacid** (Fluorochem, CAS No: 116-63-2), **sodium bisulfate** (Sigma Aldrich, CAS No: 7631-90-5), **3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride** (Fluorochem and TCI, CAS No: 93642-68-3), **(3-aminopropyl)triethoxy silane** (Alfa Aesar, CAS No: 919-30-2), **Τολουόλιο** (Multisolvent[®], CAS No: 108-88-3), **molecular sieves 0.45 mm**, **MgSO₄ άνυδρο** (Sigma Aldrich, CAS No: 7487-88-9), **αέριο N₂**, **D₂O- 0.05 % TMSP** (Eurisotop), **CDCl₃/ DMSO-d₅ (4:1)- 0.03 % TMS** (Sigma-Aldrich), **CDCl₃-0.03 % TMS** (Sigma-Aldrich), **Methanol D4** (Eurisotop), **Acetone-d₆** (Eurisotop), **NaOD** (Eurisotop), **Benzene-d₆** (Eurisotop), **Phosphonoacetic Acid 99.6 % καθαρότητα** (Alfa Aesar, CAS No: 4408-78-0), **Ethanol > 98 %** (Sigma Aldrich, CAS No: 64-17-5), **Acetone** (Sigma Aldrich, CAS No: 67-64-1), **NaOH** (Sigma-Aldrich, CAS No: 1310-73-2), **HCl_(aq) 37 %** (Scharlau, CAS No: 7647-01-0).

- Το πεχάμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH των υδρογελών και της υπερκείμενης φάσης ήταν της εταιρείας HANNA Instruments, HI 2002 pH/Temperature Bench Meter with digital probe 115/230 VAC.
- Στα πειράματα επιφανειακής τροποποίησης των υδρογελών μέσω προσρόφησης, η ρύθμιση των υδρογελών και των υπερκείμενων φάσεων πραγματοποιήθηκε με πεχάμετρο της εταιρείας Greisinger, συγκεκριμένα το μοντέλο GMH 3500 series με ηλεκτρόδιο Hamilton Minitrode.
- Τα φάσματα Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (ATR-IR) συλλέχθηκαν σε ένα οπτικό φασματόμετρο Thermo-Electron NICOLET 6700 FTIR. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν σε εύρος $4000-400\text{ cm}^{-1}$, με ανάλυση 4 cm^{-1} και είχαν συσσωρευτεί 64 σαρώσεις.
- Για την θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA) χρησιμοποιήθηκε αναλυτής PyrisDiamondTG/DTA από την εταιρεία Perkin Elmer. Μελετήθηκαν 5-6 mg δείγματος σε θερμοκρασίες 0-550 °C με ρυθμό 10 °C/min.
- Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη (XPRD), συλλέχθηκαν σε περιθλασίμετρο PANalyticalX'PertPro, σε διαμόρφωση ανάκλασης Bragg-Brentano, με τη χρήση ενός πρωτεύοντα μονοχρωμάτορα $\text{Ge}^{(111)}$ (Cu $K_{\alpha 1}$) και ανιχνευτή X'Celerator. Τα διαγράμματα XPRD αναπροσαρμόστηκαν αυτόματα, με τη χρήση του προγράμματος HighScorePlus.
- Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην θερμοκρασία σώματος χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο της εταιρείας Witeg, με digital fuzzy control system
- Για τα πειράματα παρασκευής υδρογελών με το σιλανοποιημένο Laponite®, χρησιμοποιήθηκε για την ομοιογενοποίηση τους, υδατόλουτρο υπερήχων της εταιρείας ELMASONIC S1 SH 220V-240V.
- Για τα πειράματα μελέτης διαρροής διαλυτών πυριτικών ειδών από την υδρογέλη χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-VIS της εταιρείας HACH και συγκεκριμένα το μοντέλο HACHDR 1900. Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των πυριτικών ειδών (μονοπυριτικό, διπυριτικό οξύ) με την μέθοδο «silicomolybdate (molybdenum blue)», χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα 651 με τίτλο «SilicaL.R» όπου μετράει στα 800 nm με όριο ανίχνευσης 0.01-1.600 ppm.
- Τα φάσματα NMR (^1H , ^{13}C , ^{31}P) συλλέχθηκαν στα εξής φασματοφωτόμετρα: BRUKER DPX-300 MHz, BRUKER Avance III 600 MHz with BBO cryo-probe, BRUKER Avance III HD 500 MHz with BBO prodigy cryo-probe, BRUKER Avance

III HD 500 MHz with BBFOPLUS smart-probe.

- Για τα πειράματα μελέτης διαρροής ιόντων Mg^{2+} χρησιμοποιήθηκε προχοΐδα τιτλοδότησης 50 mL με βαθμονόμηση 0.1 και σφάλμα ± 0.05 .
- Πιπέτα Gilson (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L).
- Πιπέτα Eppendorf Multipette X stream (Αυτόματο δειγματολήπτη 1-25 mL), όπου χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή πρότυπου διαλύματος για ποσοτικοποίηση μέσω ^{31}P qNMR.
- Αναλυτικός ζυγοί: Ακρίβειας Τεσσάρων και τριών δεκαδικών ψηφίων (KERNEW), Microbalances AX26 and XPE26/M (Mettler-Toledo), Electronic semi-microbalances XPE205DR/M (Mettler-Toledo).
- Μαγνητικός αναδευτήρας πολλαπλών θέσεων MS-MP8 της εταιρείας Witeg.

3.2. Πειραματική Πορεία

Παρακάτω, αναγράφονται λεπτομερώς οι πειραματικές μέθοδοι που διεξάχθηκαν. Τα σημαντικότερα στάδια των πειραμάτων εμπεριέχουν την παρασκευή της υδρογέλης, την παρασκευή της υπερκείμενης φάσης και τέλος την ανάλυση της υπερκείμενης φάσης ως προς την απελευθέρωση της φαρμακευτικής ένωσης ή τη μελέτη αποικοδόμησης του συστήματος.

3.2.1. Παρασκευή υδρογελών Laronite[®] παρουσία του φαρμάκου Etidronic acid

Η παρασκευή των υδρογελών Laronite[®] παρουσία του φαρμάκου Etidronic acid, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της απλής διασποράς σε συνθήκες ταχείας ανάδευσης. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκε ποσότητα του στερεού Laronite[®] (0.3 g) και προστέθηκε σταδιακά σε προζυγισμένη ποσότητα απιονισμένου νερού όπου βρισκόταν σε ποτήρια ζέσεως των 100 mL. Ο συνολικός όγκος της υδρογέλης ήταν σταθερός (10 mL). Η ακαριαία προσθήκη του Laronite[®] κρίνεται αναγκαίο να αποφεύγεται, διότι οδηγεί στο σχηματισμό συσσωματωμάτων και προκαλεί τη σύνθεση ανομοιογενούς συστήματος. Αφού έχει προστεθεί το Laronite[®], το σύστημα αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για τουλάχιστον 20 λεπτά, προκειμένου να προσχηματιστεί το δίκτυο της υδρογέλης, πριν την προσθήκη του φαρμάκου. Κατόπιν, ακολουθεί η προσθήκη υπολογισμένης ποσότητας φαρμάκου στο διάλυμα ενώ βρίσκεται ακόμα υπό ισχυρή ανάδευση. Τέλος, πραγματοποιείται η ρύθμιση της υδρογέλης στο επιθυμητό pH με την χρήση διαλύματος NaOH 8 M ή HCl 1 M. Η ρύθμιση

πρέπει να γίνει άμεσα, διότι η πήξη του συστήματος εκκινείται με την προσθήκη του φαρμάκου. Αυτό συμβαίνει, διότι υποβάλει το υλικό σε όξινη ενεργοποίηση και ως πολική ένωση ευνοεί την αυτοδιοργάνωση του δικτύου. Ο χρόνος ωρίμανσης για τις υδρογέλες ορίστηκε ως μία ημέρα, πριν την υποβολή τους σε μελέτες ελεγχόμενης αποδέσμευσης ή μελέτες χημική σταθερότητας.

3.2.2. Μελέτη μεταβολής της τιμής pH της υπερκείμενης φάσης όταν βρίσκεται σε επαφή με την υδρογέλη

Παρασκευάστηκαν υδρογέλες 3 % w/w Laponite® XL-21 XR (διασπορά 0.3 g Laponite σε 8.986 g απιονισμένου νερού) με τιμή pH = 7 παρουσία 714 μ L Etidronic Acid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL). Οι υδρογέλες αφέθηκαν να ωριμάσουν για 24 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικές υπερκείμενες φάσεις των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε τιμές pH = 1.3 (στομάχι) και pH = 7.4 (πλάσμα αίματος) με την χρήση stock διαλυμάτων HCl και NaOH. Ακολούθως, τοποθετήθηκε προσεκτικά η υπερκείμενη φάση στο ποτήρι ζέσεως που είχε σχηματιστεί η υδρογέλη, με γυάλινη πιπέτα. Η προσθήκη της υπερκείμενης φάσης έγινε σταδιακά και με αργό ρυθμό, προκειμένου να μην καταστραφεί η επιφάνεια της υδρογέλης από την πίεση της εκροής. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του pH της υπερκείμενης φάσης από κάθε σύστημα, ανά 24 ώρες μέχρι την 4^η μέρα και κατόπιν την 6^η, 8^η και 10^η ημέρα από την στιγμή προσθήκης της υπερκείμενης φάσης.

3.2.3. Μελέτη διαρροής δισθενών ιόντων Μαγνησίου από το δίκτυο της υδρογέλης

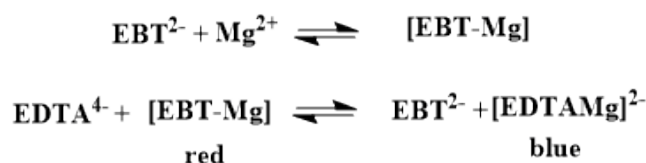
Παρασκευάστηκαν υδρογέλες 3 % w/w Laponite XL-21 XR με τιμή pH = 7 παρουσία 714 μ L Etidronic Acid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL) και απουσία του φαρμάκου (Control), το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάστηκαν τρεις διαφορετικές υπερκείμενες φάσεις των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε τιμές pH = 1.3 (στομάχι), pH = 6.8 (λεπτό έντερο) και pH = 7.4 (πλάσμα αίματος) με την χρήση stock διαλυμάτων HCl και NaOH. Ακολούθως, τοποθετήθηκε προσεκτικά η υπερκείμενη φάση στο ποτήρι ζέσεως που είχε σχηματιστεί η υδρογέλη, με γυάλινη πιπέτα. Η προσθήκη της υπερκείμενης φάσης έγινε σταδιακά και με αργό ρυθμό, προκειμένου να μην καταστραφεί η επιφάνεια της υδρογέλης από την πίεση της εκροής. Μετέπειτα, πραγματοποιήθηκε

δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} μέσω συμπλοκομετρικής τιτλοδότησης με EDTA και δείκτη EBT σύμφωνα με την βιβλιογραφία [54].

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα για την τιτλοδότηση: **(α)** 0.001M EDTA (ζυγίστηκαν 0.19 g Na_2EDTA και διαλυτοποιήθηκαν σε 500 mL απιονισμένου νερού), **(β)** Ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl/NH_4OH pH = 10.70 (14,004 g NH_4Cl , διαλυτοποιήθηκαν σε 65 mL απιονισμένο νερό, προστέθηκαν 114mL πυκνή αμμωνία και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 200 mL), **(γ)** Διάλυμα δείκτη (1 % w/v EBT σε 10 mL αιθανόλη).

Πληρώθηκε προχοΐδα 50 mL με τον τιτλοδότη 0.001 M EDTA. Το προς ανάλυση διάλυμα τοποθετούνταν σε κωνική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα και περιελάμβανε: (α) 1 mL δείγμα από τις εκάστοτε υπερκείμενες φάσεις, (β) 7 mL απιονισμένου νερού, (γ) 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl/NH_4OH και (δ) 3 σταγόνες από το διάλυμα του δείκτη. Η δειγματοληψία από κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκε ανά 24 ώρες από την στιγμή προσθήκης της υπερκείμενης φάσης για συνολικό διάστημα μελέτης 4 ημερών. Πριν από την τιτλοδότηση των προς ανάλυση δειγμάτων, τιτλοδοτούταν τυφλό δείγμα όπου περιείχε όλα τα συστατικά εκτός του δείγματος.

Η μέθοδος αξιοποιεί την ικανότητα του χηλικού υποκαταστάτη EDTA να δεσμεύει τα ελεύθερα ιόντα Mg^{2+} . Συγκεκριμένα, όταν προστίθεται ο δείκτης EBT στο προς ανάλυση δείγμα, συμπλοκοποιεί τα ιόντα Mg^{2+} , χρωματίζοντας το διάλυμα βαθύ κόκκινο. Με τη σταδιακή προσθήκη του τιτλοδότη, όταν δεσμευτούν όλα τα διαθέσιμα ιόντα Mg^{2+} , ο δείκτης υπάρχει στην ελεύθερη μορφή του, αλλάζοντας το χρώμα του διαλύματος σε μπλε. Το σημείο που παρατηρείται η αλλαγή χρώματος ονομάζεται τελικό σημείο και ο όγκος του EDTA που καταναλώθηκε σημειώνεται για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} σε ppm (καθώς αντιδρούν σε αναλογία 1:1). Παρακάτω περιγράφονται οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης που πραγματοποιούνται σε pH = 10.



3.2.4. Μελέτη διαρροής διαλυτών πυριτικών από το δίκτυο της υδρογέλης

- **Μελέτη διαρροής διαλυτών πυριτικών (μονοπυριτικά, διπυριτικά)**

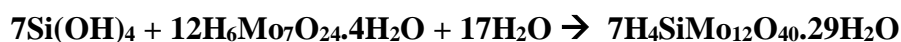
Παρασκευάστηκαν υδρογέλες 3 % w/w Laponite XL-21 XR με τιμή pH = 7 παρουσία 714 μL Etidronic acid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL) και απουσία του φαρμάκου (Control), το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάστηκαν 2 διαφορετικές υπερκείμενες φάσεις των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε τιμές pH = 1.3 (στομάχι), και pH = 7.4 (πλάσμα αίματος) με την χρήση stock διαλυμάτων HCl και NaOH. Ακολούθως, τοποθετήθηκε προσεκτικά η υπερκείμενη φάση στο ποτήρι ζέσεως που είχε σχηματιστεί η υδρογέλη, με γυάλινη πιπέτα. Μετέπειτα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των διαλυτών ειδών πυριτικού οξέος (μονομερή, διμερή) που διαρρέουν από την υδρογέλη μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου του μολυβδαινοπυριτικού οξέος σύμφωνα με την βιβλιογραφία [54]. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο HACHDR 1900 και επιλέχθηκε το πρόγραμμα Silica L.R, όπου μετρούσε την απορρόφηση του αναλύτη στα 800 nm με όρια ανίχνευσης 0.01 ppm-1.600 ppm και σφάλμα $\pm 5\%$.

Για την πραγματοποίηση της παραπάνω μεθόδου παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: **(α)** Διάλυμα Μολυβδαινικού Αμμωνίου (διατηρήθηκε στο ψυγείο), προετοιμάστηκε διαλύοντας 10 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε 100 mL απιονισμένο νερό, όπου είχαν προστεθεί προηγουμένως περίπου 2.5 g στερεού NaOH υπό συνεχή ανάδευση, ακολούθησε ρύθμιση της τιμής του pH = 7.7 – 7.8 (για να αποφευχθεί η καταβύθισή του), **(β)** Διάλυμα HCl 1:1 (διατηρήθηκε στο ψυγείο), παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας ίσες ποσότητες πυκνού HCl (37 % w/v) και απιονισμένου νερού, **(γ)** Διάλυμα οξαλικού οξέος, προετοιμάστηκε διαλύοντας 8.75 g στερεού ένυδρου οξαλικού οξέος σε 100 mL απιονισμένου νερού, **(δ)** Το διάλυμα του αναγωγικού παράγοντα, παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας τα διαλύματα **(i)** και **(ii)**, τα οποία προετοιμάστηκαν ακολούθως: **(i)**. Διαλύοντας 0.25 g 4-amino-3-hydroxynaphtalene-1-sulfonicacid και 0.5 g sodiumsulfite σε 25 mL απιονισμένο νερό και **(ii)**. διάλυση 15 g sodium bisulfate σε 75 mL απιονισμένο νερό. Η χρήση γυάλινων σκευών αποφθέχθηκε για την αποφυγή πιθανής διαρροής πυριτικών ειδών από τα ίδια τα σκεύη.

Για τον προσδιορισμό των διαλυτών ειδών πυριτικού οξέος, λήφθηκε 1 mL δείγμα από τα διαφορετικά συστήματα στις 2, 24, 48 και 168 ώρες μετά την προσθήκη της υπερκείμενης φάσης. Από το 1mL δείγμα, 100 μL μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα quartz οπτικής διαδρομής 1 cm, όπου αραιώθηκαν με την προσθήκη απιονισμένου νερού στα 25 mL. Ακολούθως,

προστέθηκε 1 mL διαλύματος Μολυβδαινικού Αμμωνίου και 0.5 mL διαλύματος HCl 1:1, το μείγμα ανακινήθηκε καλά και αφέθηκε σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αν υπήρχαν διαλυτά πυριτικά είδη (μονοπυριτικά ή διπυριτικά) ή φωσφορικά, το διάλυμα χρωματιζόταν κίτρινο λόγω αντίδρασης του μολυβδαινικού αμμωνίου προς το σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων. Η προσθήκη του υδροχλωρικού οξέως ήταν απαραίτητη για να διατηρηθούν ισχυρά όξινες συνθήκες έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε στοιχειομετρική αναλογία. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση ύπαρξης ολιγομερών, στο συγκεκριμένο στάδιο δεν συμμετέχουν στην αντίδραση και δεν συμβάλλουν στην ένταση του κίτρινου χρώματος. Μετέπειτα, προστέθηκε 1 mL διαλύματος οξαλικού οξέως, ανακινήθηκε καλά και αφέθηκε σε ηρεμία για 2 λεπτά. Κατά αυτό τον τρόπο καταστρέφονταν τα πιθανά σύμπλοκα φωσφορικού μολυβδαινίου, τα οποία απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος και αποτρέπονταν πιθανές χρωματικές αλληλεπικαλύψεις που θα οδηγούσαν σε λανθασμένα αποτελέσματα (θετικό σφάλμα). Κατόπιν, στο διάλυμα προστέθηκε 1 mL από το διάλυμα του αναγωγικού παράγοντα, ανακινήθηκε καλά και αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά. Στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αναπτύχθηκε μπλε χρώμα στα δείγματα που περιείχαν διαλυτά πυριτικά, λόγω αναγωγής του συμπλόκου πυριτικού μολυβδαινίου που έχει μπλε χρώμα. Το φωτόμετρο ρυθμίστηκε στην μηδενική απορρόφηση χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό (τυφλό δείγμα). Μετά το πέρας των 5 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 800nm, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε “ppm SiO₂”. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των διαλυτών πυριτικώνειδών στο αρχικό δείγμα, εφαρμόστηκε κατάλληλος παράγοντας αραίωσης ($V_{\text{τελικό}}/V_{\text{δείγματος}} = 28.5/0.1$).

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος του μολυβδαινοπυριτικού οξέως (Silicomolybdic Acid-SMA) στηρίζεται στην ικανότητα του πυριτικού οξέως να σχηματίζει σύμπλοκο με 12 άτομα μολυβδαινίου (H₄SiMo₁₂O₄₀), παρουσία μολυβδαινικού αμμωνίου σε όξινες συνθήκες. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου των μολυβδαινοπυριτικών βασίζεται στη μέτρηση της έντασης του μπλε χρώματος του ανοιγμένου συμπλόκου που εμφανίζεται στο διάλυμα υπό μελέτη, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των διαλυτών πυριτικών ειδών που βρίσκονται στο διάλυμα. Πιο αναλυτικά, κατά την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σε όξινες συνθήκες λαμβάνει χώρα η αντίδραση των ιόντων MoO₄²⁻ (ή των πολυπυριτικών ιόντων Mo₇O₂₄⁶⁻ και Mo₈O₂₆⁴⁻) [55][56] με το πυριτικό οξύ και κατόπιν ανάγεται, σύμφωνα με την παρακάτωαντιδράση.



- **Μελέτη ολικής συγκέντρωσης πυριτικών**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ολιγομερή πυριτικών ή το κολλοειδές διοξείδιο του πυριτίου δεν ανιχνεύονται με την παραπάνω μέθοδο. Το πυριτικό οξύ είναι μία ιδιόμορφη ένωση που μπορεί να ολιγομεριστεί ή ακόμα και να πολυμεριστεί αν οι συνθήκες το ευνοούν (εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία του διαλύματος και την συγκέντρωσή του). Προκειμένου να προσδιοριστεί η ολική συγκέντρωση των πυριτικών, το εναπομένον δείγμα (0.9 mL) ρυθμίστηκε με την προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου σε τιμές $\text{pH} > 10$ (προσδιορίστηκε με πεχαμετρικό χαρτί). Κατά αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε η διάσπαση των ολιγομερών σε διαλυτά πυριτικά είδη. Είναι γνωστό ήδη από τη βιβλιογραφία ότι η διαλυτότητα του πολυμερούς/κολλοειδούς διοξειδίου του πυριτίου αυξάνεται σε αλκαλικό περιβάλλον. Μετέπειτα, λήφθηκαν αντίστοιχα 100 μL από το αλκαλικό δείγμα και ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος ανάλυσης που προαναφέρθηκε (μέθοδος του μολυβδαινοπυριτικού οξέος).

3.2.5. Παρασκευή διαφορετικής σύστασης υπερκείμενων φάσεων ως μέσο όπου θα αποδεσμευτεί το ETID.

- **0.25 M Phosphate buffer (acidic)**

Ζυγίστηκαν 0.429 g NaH_2PO_4 όπου διαλύθηκαν σε περίπου 50 mL απιονισμένο νερό. Κατόπιν προστέθηκαν περίπου 2 mL πυκνού H_3PO_4 με πιπέτα ακριβείας. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 1.32$ προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες πυκνού H_3PO_4 ή stock διαλύματος NaOH . Κατόπιν το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- **0.5 M Phosphate buffer (acidic)**

Ζυγίστηκαν 0.857 g NaH_2PO_4 όπου διαλύθηκαν σε περίπου 50 mL απιονισμένο νερό. Κατόπιν προστέθηκαν 2.954 mL πυκνού H_3PO_4 με πιπέτα ακριβείας. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 1.30$ προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες πυκνού H_3PO_4 ή stock διαλύματος NaOH . Κατόπιν το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- **1 M Phosphate buffer (acidic)**

Ζυγίστηκαν 1.714 g NaH_2PO_4 όπου διαλύθηκαν σε περίπου 50 mL απιονισμένο νερό. Κατόπιν προστέθηκαν 5.908 mL πυκνού H_3PO_4 με πιπέτα ακριβείας. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 1.33$ προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες πυκνού H_3PO_4 ή stock διαλύματος NaOH . Κατόπιν, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- **0.5 M Phosphate buffer (neutral)**

Ζυγίστηκαν 1.696 g NaH_2PO_4 όπου διαλύθηκαν σε περίπου 20 mL απιονισμένο νερό. Επιπρόσθετα, ζυγίστηκαν 6.710 g Na_2HPO_4 όπου διαλύθηκαν σε περίπου 50 mL απιονισμένο νερό. Τα δύο διαλύματα αναμειχθηκαν και ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 7.41$ προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες πυκνού H_3PO_4 ή stock διαλύματος NaOH . Κατόπιν, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- **0.5 M Tris-HCl (neutral)**

Ζυγίστηκαν 3.028 g Tris-OH ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) όπου διαλύθηκαν σε περίπου 30 mL απιονισμένο νερό. Κατόπιν, προστέθηκαν 1.5 mL πυκνού HCl με πιπέτα ακριβείας. Το διάλυμα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 7.34$ προσθέτοντας κατάλληλες ποσότητες πυκνού HCl . Κατόπιν, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- **Simulated Body Fluid solution (SBF)**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία Simulated body fluids ονομάζονται τα υδατικά συστήματα που προσεγγίζουν την ιονική σύσταση και την τιμή pH βιολογικών υγρών. Στον **Πίνακα 4** αναπαριστάται η σύσταση της συγκέντρωσης των ιόντων που είναι παρόντα στο πλάσμα του αίματος, για το διάλυμα SBF που παρασκευάστηκε.

Πίνακας 4. Ιονική σύσταση του πλάσματος του αίματος εκφρασμένη σε mM και του διαλύματος που την προσομοιάζει (SBF), όπως λήφθηκε από την παραπομπή [57].

	Concentration (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Blood plasma	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	148.0	1.0	0.5

Για την παρασκευή του SBF παρασκευάστηκαν τα εξής stockδιαλύματα: **(α)** Διαλύθηκαν 1.9691 g NaCl σε 10.005 g απιονισμένο νερό (3.3678 M), **(β)** Διαλύθηκαν 0.0885 g NaHCO₃ σε 10.008 g απιονισμένο νερό (0.1053 M), **(γ)** Διαλύθηκαν 0.0931 g KCl σε 10.005 g απιονισμένο νερό (0.1248 M), **(δ)** Διαλύθηκαν 0.0668 g Na₂HPO₄·7H₂O σε 10.005 g απιονισμένο νερό (0.0249 M), **(ε)** Διαλύθηκαν 0.0764 g MgCl₂·6H₂O σε 10.004 g απιονισμένο νερό (0.0375 M), **(ζ)** Διαλύθηκαν 0.0926 g CaCl₂·2H₂O σε 10.003 g απιονισμένο νερό (0.0625 M), **(η)** Διαλύθηκαν 0.0174 g Na₂SO₄ σε 10.001 g απιονισμένο νερό (0.0122 M).

Για την παρασκευή υπερκείμενης φάσης SBF των 100 mL, σε περίπου 40 mL απιονισμένο νερό προσθέτοντας 4 mL από κάθε ένα από τα προαναφερόμενα stock διαλύματα (α-η). Κατόπιν, ρυθμίστηκε σε pH = 7.44 προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα διαλύματος HCl 1 M ή Tris-OH 50 mM (διαλύθηκαν 0,6057 g Tris-OH σε 100 mL απιονισμένο νερό). Προκειμένου να υπολογιστεί η ακριβής ποσότητα ιόντων χλωρίου που υπήρχαν στο διάλυμα σημειώθηκε ότι χρησιμοποιήθηκαν 86 μL HCl 1 M για την ρύθμιση του συγκεκριμένου διαλύματος σε φυσιολογικό pH. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η παρασκευή και ρύθμιση της συγκεκριμένης υπερκείμενης φάσης πραγματοποιούνταν λίγο πριν την αφετηρία των μελετών αποδέσμευσης του φαρμάκου για το λόγο ότι σε αντίθετη περίπτωση παρατηρούταν καθίζηση ιζήματος.

3.2.6. Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκου

- Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Αφού ολοκληρωθεί ο χρόνος ωρίμανσης της κάθε υδρογέλης, προστίθενται προσεκτικά στην επιφάνειά της 50 mL υπερκείμενης φάσης συγκεκριμένης σύστασης και τιμής pH (ανάλογα τις ανάγκες του εκάστων πειράματος). Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή (t = 0) αποτελεί την

αφετηρία της ελεγχόμενης αποδέσμευσης του φαρμάκου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση ανά μία ώρα για συνολικά 8 ώρες. Επειδή τα συστήματα δεν ήταν υπό ανάδευση, κρίθηκε αναγκαίο πριν την λήψη δείγματος το σύστημα να αναδεύεται προσεκτικά με το *tip* της πιπέτας Gilson λίγο πριν τη δειγματοληψία (κατά αυτό τον τρόπο περιοριζόταν το σφάλμα λόγω μεταβολής όγκου). Η δειγματοληψία συνεχίστηκε με συχνότητα ανά 1 ημέρα και μετέπειτα ανά 3 ημέρες, ανάλογα με το πότε η ποσότητα του φαρμάκου που αποδεσμευόταν προσέγγιζε το πλατώ.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε κατάλληλα σωληνάρια διαμέτρου 5 mm (NMR tubes), προστέθηκε κατάλληλος δευτεριωμένος διαλύτης με εσωτερικό πρότυπο και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του φαρμάκου για κάθε χρονική στιγμή μέσω της ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR (qNMR). Σε κάθε tube προστέθηκαν 150 μL εσωτερικού προτύπου TMSP και πραγματοποιήθηκε η λήψη φάσματος ^1H NMR εκτελώντας το πρόγραμμα zg30 με λήψη 32 scans, που διαρκούσε 3 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε η διόρθωση του φάσματος (διόρθωση φάσης, γραμμής βάσης και βαθμονομήθηκε σύμφωνα με την κορυφή του TMSP σε $\delta = 0$ ppm) και η ολοκλήρωση των κορυφών που αντιστοιχούσαν στο φάρμακο και στο TMSP. Το ολοκλήρωμα του προτύπου (D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSP) μέσω υπολογισμών ορίστηκε ίσο με 4.3371 μmole , όπως περιγράφεται παρακάτω λεπτομερώς ο τρόπος προσδιορισμού του. Το φάσμα ^1H NMR του προτύπου εμφανίζει μία απλή κορυφή με χημική μετατόπιση, που ορίζεται αυθαίρετα σε χημική μετατόπιση $\delta = 0$ ppm, η οποία αντιστοιχεί σε 9 άτομα υδρογόνου των τριών μεθυλομάδων που διαθέτει.

Το διάλυμα περιέχει 0.05 % wt 3-(τριμεθυλοσιλανο) προπιονικό-2,2,3,3- d^4 άλας νατρίου (TMSP), οπότε στα 100 g είχε 0.05 g TMSP.

Σύμφωνα με την πυκνότητα του διαλύματος ισχύει ότι:

$$\left. \begin{aligned} d &= 1.107 \text{ g / mL} \\ d = \frac{m}{V} \rightarrow V &= \frac{100 \text{ g}}{1.107 \text{ g/mL}} \rightarrow V = 90.334 \text{ mL} \end{aligned} \right\}$$

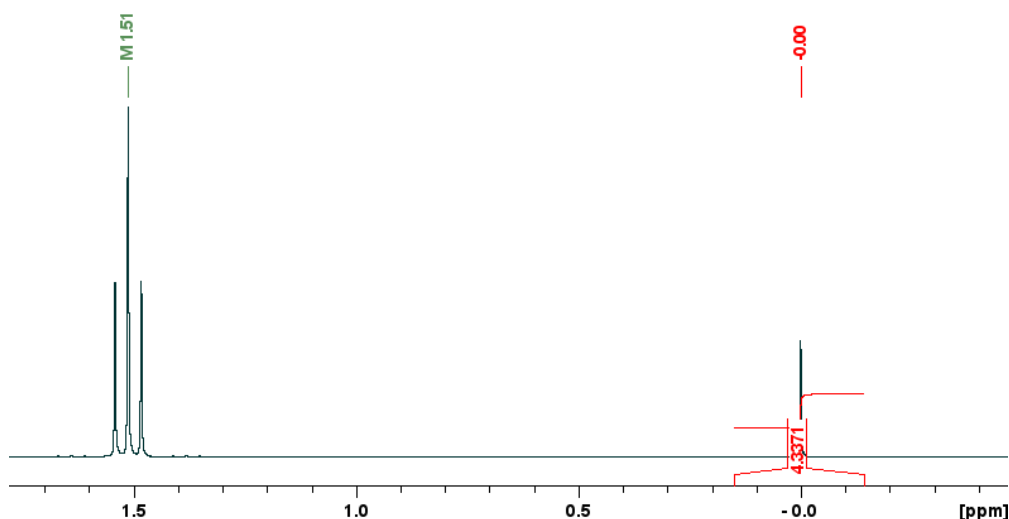
Τα 90.334 mL διαλύματος περιέχουν 0.005 g TMSP, οπότε στα 150 μL που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση θα περιέχονται 0.00008303 g. Το μοριακό βάρος της ένωσης TMSP είναι 172.27 g / mol, άρα:

$$n = \frac{m}{Mr} \rightarrow n = \frac{0.00008303 \text{ g}}{172.27 \text{ g / mol}} \rightarrow n = 0.0000004819 \text{ mol} \text{ ή } 0.48197568 \text{ } \mu\text{mol}$$

Η ένωση αυτή έχει εννιά πρωτόνια στις τρεις μεθυλομάδες που συνεισφέρουν στο ολοκλήρωμα της κορυφής στο φάσμα ^1H NMR, οπότε το ολοκλήρωμα της κορυφής θα ισούται: $9 * (0.48197568 \mu\text{mol}) = 4.3371 \mu\text{mol}$.

Όσον αφορά την κορυφή του ETID η ολοκλήρωση πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Το διφωσφονικό φάρμακο ETID εμφανίζει μία χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στο φάσμα ^1H NMR με χημική μετατόπιση, $\delta = 1.51 \text{ ppm}$, η οποία οφείλεται στα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 30**. Η χημική μετατόπιση μπορεί να αλλάξει ελάχιστα ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Η πολλαπλότητα που εμφανίζει η κορυφή οφείλεται στην ύπαρξη δύο γειτονικών ατόμων φωσφόρου που αποτελούν ενεργούς πυρήνες στο NMR, με ολικό spin $1/2$. Συνεπώς, ισχύει ο κανόνας N+1 και η κορυφή σχάζεται σε μία τριπλή που ακολουθεί της κατανομή κατά Pascal.



Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR του Etidronic acid σε D_2O -0.05 % TMS. Η τριπλή κορυφή αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλομάδας του ETID, ενώ η απλή στα 9 πρωτόνια των 3 μεθυλομάδων του TMS.

- Σε θερμοκρασία σώματος ($T = 36.6 \text{ }^\circ\text{C}$)

Αντίστοιχα, αφού ολοκληρωθεί ο χρόνος ωρίμανσης της κάθε υδρογέλης, προστέθηκε προσεκτικά στην επιφάνειά της 50 mL υπερκείμενης φάσης συγκεκριμένης σύστασης και τιμής pH (ανάλογα τις ανάγκες του εκάστων πειράματος). Η υπερκείμενη φάση είχε επωαστεί προηγουμένως σε υδατόλουτρο για να φτάσει την επιθυμητή θερμοκρασία ($T = 36.6 \text{ }^\circ\text{C}$), μόλις ολοκληρωθεί η προσθήκη της υπερκείμενης φάσης στο ποτήρι ζέσεως που είχε

σχηματιστεί η υδρογέλη, όλο το σύστημα μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο έτσι ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία σταθερή. Ο τρόπος δειγματοληψίας και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φαρμάκου έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω.

3.2.7. Πειράματα ανταγωνισμού παρουσία EDTA

- **EDTA ως συστατικό της υδρογέλης Laronite® XL-21 XR παρουσία ETID**

Σε 8.842 g προζυγισμένου απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, προστέθηκαν 0.3 g Laronite® XL-21 XR και μαγνητικός αναδευτήρας. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 358 μ L Etidronic Acid (stock διάλυμα 30 % w/v, $d = 1.4$ g/mL) και μετέπειτα 500 μ L stock διαλύματος EDTA 1.46 mM (Παρασκευάστηκε με την διάλυση 5.5359 g Na_2EDTA σε 10 mL απιονισμένου νερού). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100 μ L stock διαλύματος NaCl 10 M για την υποβοήθηση της πήξης της υδρογέλης. Τέλος, το σύστημα ρυθμίστηκε σε pH = 7.03 με την προσθήκη 160 μ L stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό, όπου ρυθμίστηκε σε pH = 7.45 και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μ L από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72, 96, 144, 192 και 240 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μ L πρότυπο D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSF, όπου με όμοιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID και του EDTA από την υδρογέλη.

- **EDTA ως συστατικό της υπερκείμενης φάσης που εκτίθεται η υδρογέλη Laronite® XL-21 XR φορτωμένη με ETID**

Αναλογία 1:1

Σε 8.985 g προζυγισμένου απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, προστέθηκαν 0.3 g Laronite® XL-21 XR και μαγνητικός αναδευτήρας. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 715 μ L Etidronic acid (stock διάλυμα 30 % w/v, $d = 1.4$ g/mL) και το σύστημα ρυθμίστηκε σε pH = 7.02 με την προσθήκη 500 μ L stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό και

1000 μL stock διαλύματος EDTA 1.46 mM (Παρασκευάστηκε με την διάλυση 5.5359 g Na_2EDTA σε 10 mL απιονισμένου νερού), όπου ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 7.41$ και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72, 96, 144, 192 και 240 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μL πρότυπο D_2O (99.9 atom % D)- 0.05 wt. % TMSF, όπου με όμοιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID και η απορρόφηση του EDTA από την υδρογέλη.

Scaledown (0.5:0.5)

Σε 9.342 g προζυγισμένου απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, προστέθηκαν 0.3 g Laronite[®] XL-21 XR και μαγνητικός αναδευτήρας. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 358 μL Etidronic acid (stock διάλυμα 30 % w/v, $d = 1.4 \text{ g/mL}$) και το σύστημα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 6.95$ με την προσθήκη 210 μL stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό και 500 μL stock διαλύματος EDTA 1.46 mM (Παρασκευάστηκε με την διάλυση 5.5359 g Na_2EDTA σε 10 mL απιονισμένου νερού), όπου ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 7.41$ και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72, 96, 144, 192 και 240 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μL πρότυπο D_2O (99.9 atom % D)- 0.05 wt. % TMSF, όπου με όμοιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID και η απορρόφηση του EDTA από την υδρογέλη.

- **Παρασκευή συστήματος αναφοράς (Control)**

Σε 9.342 g προζυγισμένου απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, προστέθηκαν 0.3 g Laronite[®] XL-21 XR και μαγνητικός αναδευτήρας. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 358 μL Etidronic acid (stock διάλυμα 30 % w/v, $d = 1.4 \text{ g/mL}$) και το σύστημα ρυθμίστηκε σε $\text{pH} = 7.04$ με την προσθήκη 240 μL stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό

ρυθμισμένο σε pH = 7.45 και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72, 96, 144, 192 και 240 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μL πρότυπο D_2O (99.9 atom % D)-0.05 wt. % TMSP, όπου παρομοίως με παραπάνω, μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID.

3.2.8. Επιφανειακή τροποποίηση υδρογελών Laponite[®] με Οργανοσιλάνια

Σε αυτή την υποενότητα παρουσιάζονται τρεις τρόποι επιφανειακής τροποποίησης της υδρογέλης χρησιμοποιώντας τα οργανοσιλάνια APTES και TESPSA. Αρχικά, δοκιμάστηκε η εισαγωγή των οργανοσιλανίων στο προ-μίγμα του υλικού πριν την ολοκλήρωση της πήξης της υδρογέλης. Δεύτερον, εξετάστηκε η τροποποίηση στην ξηρή μορφή του υλικού και κατόπιν διασπορά του σιλανοποιημένου προϊόντος σε υδατικό μέσο. Τέλος, ερευνήθηκε η φυσική προσρόφηση των οργανοσιλανίων σε ήδη σχηματισμένη υδρογέλη.

Εισαγωγή στο προ-μίγμα της υδρογέλης

Στην συγκεκριμένη μεθοδολογία ακολουθήθηκαν ακριβώς τα ίδια βήματα μέχρι τον σχηματισμό του προ-μίγματος της υδρογέλης. Κατόπιν, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από stock διαλύματα των οργανοσιλανίων APTES και TESPSA. Η χρήση stock διαλυμάτων εξυπηρετούσε τριπλό σκοπό: (α) Κατ' αυτό τον τρόπο τα οργανοσιλάνια είχαν σίγουρα υδρολυθεί και μπορούσαν να σχηματίσουν δεσμούς Si-O-Si, (β) Διευκόλυνε την ογκομετρική μεταφορά τους, διότι τα αρχικά αντιδραστήρια είχαν μεγάλο ιξώδες και (γ) Μείωναν το πειραματικό σφάλμα, διότι από το αραιωμένο stock ογκομετρούταν μεγαλύτερη ποσότητα (μικρότερο σφάλμα).

Τα συστήματα βρισκόταν συνεχώς υπό ισχυρή ανάδευση, η προσθήκη του Etidronic acid πραγματοποιούνταν 10 λεπτά μετά την εισαγωγή των οργανοσιλανίων. Τέλος, μετά από περίπου 2 λεπτά, τα συστήματα ρυθμιζόταν με την χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου 8 M ή HCl 1 M στην επιθυμητή τιμή pH. Ο χρόνος ωρίμανσης για τις υδρογέλες ορίστηκε ως μία

ημέρα σε θερμοκρασία 8 °C (υποβοήθηση πήξης), πριν την υποβολή τους σε μελέτες ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

Συγκεκριμένα, για την εκτέλεση της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων παρασκευάστηκαν τα stock διαλύματα: (**α**) 1.019 g APTES σε 2.990 g απιονισμένο νερό (**β**) 1.234 g TESPSA σε 2.990 g απιονισμένου νερού, προστέθηκε μία πελέτα καυστικού νατρίου και αφέθηκε για 30 λεπτά ανάδευση. Επιπρόσθετα, παρασκευάστηκαν οι εξής υδρογέλες:

- **Control**

Σε 9.242 g απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως (100 mL) με μαγνητικό αναδευτήρα, προστέθηκαν σταδιακά 0.3 g Laponite® XL-21 XR, το σύστημα αφέθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 360 μ L Etidronic Acid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL) και 100 μ L stock διαλύματος NaCl 10 M. Μετέπειτα, η υδρογέλη ρυθμίστηκε σε pH = 6.90 με την προσθήκη 200 μ L stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες στους 8 °C. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε pH = 7.45 και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μ L από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72 και 144 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μ L πρότυπο D₂O (99.9 atom % D) - 0.05 wt. % TMSP, όπου μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID μέσω ¹H NMR.

- **Lap. - 0.15 % TESPSA**

Σε 9.185 g απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως (100 mL) με μαγνητικό αναδευτήρα, προστέθηκαν σταδιακά 0.3 g Laponite® XL-21 XR, το σύστημα αφέθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Ακολούθως, εισάχθηκαν στο κολλοειδές διάλυμα 57 μ L stock διαλύματος TESPSA (Stock διάλυμα β) και αφέθηκαν υπό ισχυρή ανάδευση για 10 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 360 μ L Etidronic Acid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL) και 100 μ L stock διαλύματος NaCl 10 M και αφέθηκαν υπό ισχυρή ανάδευση για 2 λεπτά. Μετέπειτα, η υδρογέλη ρυθμίστηκε σε pH = 6.99 με την προσθήκη 220 μ L stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες στους 8 °C. Παράλληλα,

παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε pH = 7.45 και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μ L από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72 και 96 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μ L πρότυπο D₂O (99.9 atom % D)-0.05 wt. % TMSp, για να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση μέσω ¹H NMR. Κατά αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID και η πιθανή διαρροή του TESPSA.

- **Lap.-0.12 % APTES**

Σε 9.193 g απιονισμένου νερού που βρισκόταν σε ποτήρι ζέσεως (100 mL) με μαγνητικό αναδευτήρα, προστέθηκαν σταδιακά 0.3 g Laponite[®] XL-21 XR, το σύστημα αφέθηκε σε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά. Ακολούθως εισάχθηκαν στο κολλοειδές διάλυμα 49 μ L stock διαλύματος APTES (Stock διάλυμα α) και αφέθηκαν υπό ισχυρή ανάδευση για 10 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 360 μ L EtidronicAcid (stock διάλυμα 30 % w/v, d = 1.4 g/mL) και 100 μ L stock διαλύματος NaCl 10 M και αφέθηκαν υπό ισχυρή ανάδευση για 2 λεπτά. Μετέπειτα, η υδρογέλη ρυθμίστηκε σε pH = 7.04 με την προσθήκη 220 μ L stock διαλύματος NaOH 8 M. Το σύστημα αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες στους 8 °C. Παράλληλα, παρασκευάστηκε υπερκείμενη φάση των 50 mL από απιονισμένο νερό ρυθμισμένο σε pH = 7.45 και τοποθετήθηκε προσεκτικά στο πάνω μέρος της σχηματισμένης υδρογέλης. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 350 μ L από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 8 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 24, 48, 72 και 96 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 150 μ L πρότυπο D₂O (99.9 atom % D)-0.05 wt.% TMSp, για να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση μέσω ¹H NMR. Κατά αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID και η πιθανή διαρροή του APTES.

Οργανική τροποποίηση Laponite[®] μέσω one-pot αντίδρασης

Παρακάτω αναγράφεται λεπτομερώς η πορεία που πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή των τροποποιημένων αργίλων Lap-APTES και Lap-TESPSA σύμφωνα με την μεθοδολογία της βιβλιογραφίας [53].

1) Σύνθεση Laponite[®]-APTES

Πραγματοποιήθηκε ξήρανση περίπου 100 ml τολουολίου με επώαση του διαλύτη για 24 ώρες σε μοριακά κόσκινα (molecular sieves). Παράλληλα, περίπου 2 mL APTES επεξεργάστηκαν με ποσότητα αφυδατικού μέσου MgSO₄, αντίστοιχα για 24 ώρες. Κατόπιν, ζυγίστηκαν περίπου 2 g Laponite[®] XL-21 XR και ξηράθηκαν σε φούρνο στους 120 °C για 1 ώρα. Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν το ξηρό τολουόλιο, το οργανοσιλάνιο (αφού πρώτα είχε διαχωριστεί από το αφυδατικό μέσο, μέσω απλής διήθησης) και το Laponite[®] (κατευθείαν μετά από την αφαίρεση του από το φούρνο για να μην απορροφήσει υγρασία από το περιβάλλον). Ακολούθως, εισήχθη μαγνητικός αναδευτήρας, το σύστημα σφραγίστηκε γρήγορα και τοποθετήθηκε σε σιλικονέλαιο όπου στήθηκε η διάταξη της σύνθεσης με κάθετο ψυκτήρα (**Εικόνα 31**). Πραγματοποιήθηκε απαέρωση του συστήματος με αέριο άζωτο για 15 λεπτά. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση και παράλληλα θερμάνθηκε σταδιακά έως ότου να φτάσει σε συνθήκες βρασμού (reflux). Η αντίδραση αφέθηκε να πραγματοποιηθεί για 24 ώρες, από την χρονική στιγμή που ξεκίνησε ο βρασμός, με σταθερή συμπίκνωση του διαλύτη. Όταν αφαιρέθηκε η δίλιμη φιάλη από τη διάταξη, το προϊόν είχε μορφή θολού gel. Η απομάκρυνση του διαλύτη επιτεύχθηκε, αρχικά με απλή διήθηση και κατόπιν με ξήρανση στο φούρνο στους 120 °C, μετά την οποία λήφθηκε το τελικό προϊόν σε στερεή μορφή. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με απιονισμένο νερό, το οποίο απομακρύνθηκε μέσω διήθησης υπό κενό. Το κolloειδές στερεό, που λήφθηκε μετά τις εκπλύσεις, ξηράθηκε στο φούρνο στους 80 °C για 13 ώρες. Μετέπειτα, ζυγίστηκε και χαρακτηρίστηκε προκειμένου να εξακριβωθεί αν πραγματοποιήθηκε η σιλανοποίηση. Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω TGA, XRD και μέσω καταστροφής του υλικού με NaOD και λήψη φάσματος ¹H NMR. Τέλος, λειοτριβήθηκε σε γουδί και επιχειρήθηκε να παρασκευαστεί υδρογέλη με την μέθοδο της απλής διασποράς με μαγνητικό αναδευτήρα και με υδατόλουτρο υπερήχων.

Στην περίπτωση χρήσης υπερήχων τα συστήματα, αφού είχαν υποστεί απλή διασπορά σε υδατικό μέσο (όπως ακριβώς και στην Ενότητα 3.2.1), βυθίζονταν στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί ομοιογενοποίηση του κolloειδές διαλύματος.



Εικόνα 31. Πειραματική διάταξη οργανικής τροποποίησης του αργίλου Laponite[®] μέσω one-pot αντίδρασης με τα οργανοσιλάνια APTES και TESPSA. Τα βασικά μέρη ήταν: θερμαντική, λουτρό σιλικονέλαιου, δίλιμη σφαιρική, επίθεμα septum, μπαλόني αέριου N₂, και κάθετος ψυκτήρας.

2) Σύνθεση Laponite[®]-TESPSA

Πραγματοποιήθηκε ξήρανση περίπου 50 mL τολουολίου με επώαση του διαλύτη για 96 ώρες σε molecular sieves. Κατόπιν, ζυγίστηκαν περίπου 1 g Laponite[®] XL-21 XR και ξηράνθηκε σε φούρνο στους 120 °C για 24 ώρες. Το οργανοσιλάνιο TESPSA χρησιμοποιήθηκε αυτούσιο, διότι λόγω του μεγάλου ιζώδες που εμφανίζει δεν μπορεί να διηθηθεί στην περίπτωση προσθήκης αφυδατικού μέσου. Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν το ξηρό τολουόλιο, το οργανοσιλάνιο και το Laponite[®] (κατευθείαν μετά από την αφαίρεση του από το φούρνο για να μην απορροφηθεί υγρασία από την ατμόσφαιρα). Ακολούθως, εισήχθη μαγνητικός αναδευτήρας, το σύστημα σφραγίστηκε γρήγορα και τοποθετήθηκε σε σιλικονέλαιο σε μία διάταξη σύνθεσης με κάθετο ψυκτήρα (**Εικόνα 31**). Πραγματοποιήθηκε απαέρωση του συστήματος με αέριο άζωτο για 15 λεπτά. Το σύστημα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση και παράλληλα θερμάνθηκε σταδιακά έως ότου φτάσει σε συνθήκες βρασμού (reflux). Η αντίδραση αφέθηκε να πραγματοποιηθεί για 24 ώρες, από την χρονική στιγμή που ξεκίνησε ο βρασμός, με σταθερή συμύκνωση του διαλύτη. Όταν αφαιρέθηκε η δίλιμη από την διάταξη το προϊόν είχε μορφή ροζ θολού gel. Η απομάκρυνση του διαλύτη επιτεύχθηκε αρχικά με απλή διήθηση και κατόπιν με ξήρανση στο φούρνο στους 100 °C για 90 λεπτά,

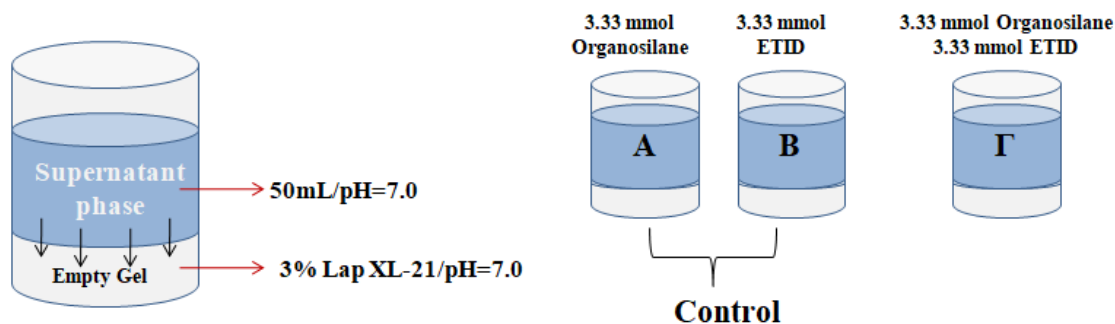
όπου λήφθηκε το τελικό προϊόν σε στερεή μορφή. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με απιονισμένο νερό, το οποίο απομακρύνθηκε με διήθηση υπό κενό. Το κολλοειδές στερεό που λήφθηκε μετά τις εκπλύσεις, ξηράνθηκε στο φούρνο στους 80 °C για 13 ώρες. Μετέπειτα, ζυγίστηκε και χαρακτηρίστηκε προκειμένου να εξακριβωθεί αν πραγματοποιήθηκε η σιλανοποίηση. Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω TGA, XRD και μέσω καταστροφής του υλικού με NaOD και λήψη φάσματος ^1H NMR. Τέλος, λειοτριβήθηκε σε γουδί για να επιχειρηθεί να παρασκευαστεί υδρογέλη με την μέθοδο της απλής διασποράς με μαγνητικό αναδευτήρα και υδατόλουτρο υπερήχων όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Φυσική προσρόφηση των οργανοσιλανίων

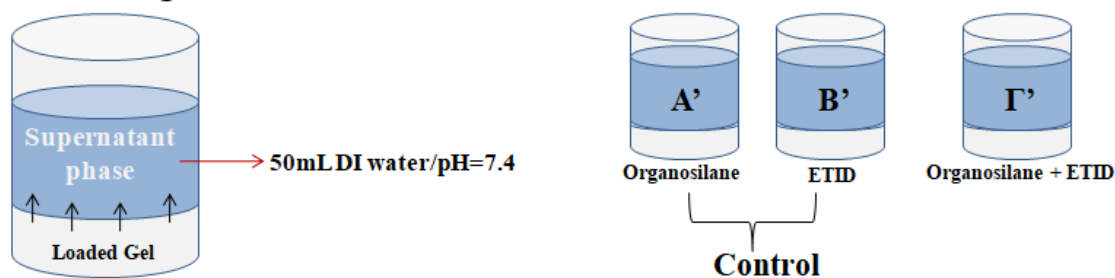
Τα κυριότερα μέρη τροποποίησης της υδρογέλης μέσω φυσικής προσρόφησης περιελάμβαναν: **(α)** Την προσρόφηση των επιθυμητών συστατικών (ETID, Οργανοσιλάνιο) από υπερκείμενη φάση που βρισκόταν πάνω από την άδεια προσχηματισμένη υδρογέλη (3 % Laponite[®] XL-21 XR), **(β)** την αποδέσμευση της φαρμακευτικής ένωσης και την πιθανή διαρροή του οργανοσιλανίου. Ειδικότερα, παρασκευάστηκαν τρεις υδρογέλες 3 % Laponite[®] XL-21 XR (Ρυθμίστηκαν σε pH = 7 με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl 1 M) και υποβλήθηκαν σε τρεις υπερκείμενες φάσεις (i, ii, iii) των 50 mL (pH = 7) διαφορετικής σύστασης που περιείχαν: (i) 3.33 mmol του Οργανοσιλανίου (APTES ή TESPSA), (ii) 3.33 mmol ETID και (iii) 3.33 mmol του Οργανοσιλανίου και 3.33 mmol ETID. Μελετήθηκε η απορρόφηση των συστατικών με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες από την στιγμή της προσθήκης της υπερκείμενης φάσης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και με την προσθήκη κατάλληλου προτύπου σε D₂O διαλύτη (Phosphonoacetic Acid ή TMSP), προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους μέσω ^1H ή ^{31}P qNMR, ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων. Σε όλα τα συστήματα η υδρογέλη απορροφούσε την μέγιστη ποσότητα των συστατικών εντός 24 ωρών. Τα συστήματα ήταν εκτεθειμένα για συνολικά 144 ώρες προκειμένου να δοθεί κατάλληλος χρόνος για να πραγματοποιηθεί σιλανοποίηση της επιφάνειας του Laponite[®]. Στις 144 ώρες, η υπερκείμενη φάση αφαιρούταν και οι υδρογέλες αφήνονταν σε ηρεμία για 24 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάστηκε δεύτερη υπερκείμενη φάση των 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε

pH = 7.4, η οποία τοποθετήθηκε προσεκτικά πάνω από τις υδρογέλες. Μελετήθηκε η απελευθέρωση του ETID και η διαρροή των οργανοσιλανίων με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες από την στιγμή της προσθήκης της δεύτερης υπερκείμενης φάσης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και με την προσθήκη κατάλληλου προτύπου σε D_2O διαλύτη (Phosphonoacetic acid ή TMS P), προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους μέσω ^1H ή ^{31}P qNMR, ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων. Στην **Εικόνα 32** αναπαριστώνται σε μορφή σχεδιαγράμματος τα σημαντικότερα μέρη της συγκεκριμένης πειραματικής μεθόδου και στην **Εικόνα 33** το χρονοδιάγραμμα που ακολουθήθηκε, για καλύτερη κατανόηση.

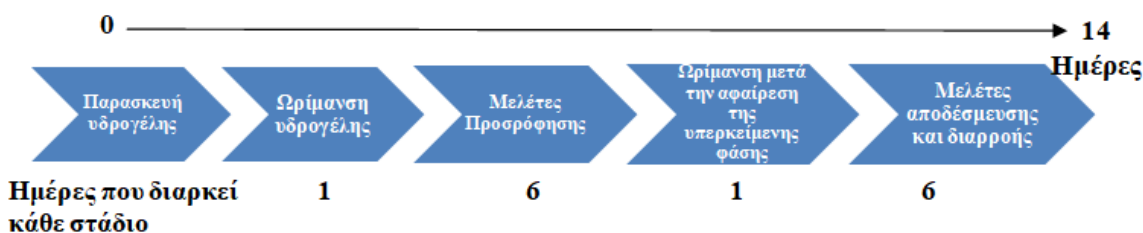
1st : Absorbance of the components



2nd : Leaching/Release



Εικόνα 32. Σχηματική αναπαράσταση της μεθοδολογίας για την επιφανειακή τροποποίηση του Laponite[®] μέσω προσρόφησης των οργανοσιλανίων σε προσχηματισμένη υδρογέλη. Στο πρώτο στάδιο λάμβανε χώρα η απορρόφηση των συστατικών, ενώ στο δεύτερο η αποδέσμευση του ETID και η πιθανή διαρροή του οργανοσιλανίου.



Εικόνα 33. Χρονοδιάγραμμα περάτωσης της σειράς πειραμάτων τροποποίησης της υδρογέλης μέσω φυσικής προσρόφησης.

- Τροποποίηση υδρογέλης 3 % Laponite[®] XL-21 XR με το οργανοσιλάνιο APTES

Για την υλοποίηση της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων παρασκευάστηκαν οι εξής υδρογέλες όπως αναπαριστώνται τα συστατικά τους στον **Πίνακα 5**. Σε κάθε σύστημα (A, B και Γ) πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις (1 και 2). Κάθε υδρογέλη αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες.

Πίνακας 5. Συστατικά υδρογελών που παρασκευάστηκαν για την σειρά πειραμάτων επιφανειακής τροποποίησης Laponite[®] μέσω φυσικής προσρόφησης χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο APTES.

Σύστημα	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2
H ₂ O (g)	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7
Laponite [®] XL-21 XR (g)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
HCl 1 M (μL)	60	70	80	80	80	80
pH	7.17	7.00	7.18	7.07	7.14	7.05

Κατόπιν παρασκευάστηκαν τα εξής stockδιαλύματα: (A) 2.38 mL APTES 97 % w/w σε περίπου 100 mL απιονισμένου νερού, ρυθμίστηκε σε pH = 7.02 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL, (B) Διαλύθηκαν 2.453 mL ETID (60 % w/w) σε 100 mL απιονισμένο νερό, ρυθμίστηκε σε pH = 7.16 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL, (Γ) Αντίδραση 2.38 mL APTES 97 % w/w με περίπου 100 mL απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 2.453 mL ETID (60 % w/w), το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH = 7.10 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL. Με την χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου μετρήθηκαν δύο φορές 50 mL από κάθε stock διάλυμα και προστέθηκαν στα αντίστοιχα συστήματα υδρογελών προσεκτικά με την χρήση γυάλινης

πιπέτας. Στον **Πίνακα 6** αναπαριστώνται συγκεντρωτικά τα συστατικά κάθε υπερκείμενης φάσης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε σύστημα.

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά δεδομένα σύστασης των υπερκείμενων φάσεων που προστέθηκαν στα πειράματα απορρόφησης με το οργανοσίλάνιο APTES.

	Control (APTES)		Control(ETID)		APTES+ETID	
Σύστημα	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2
V (mL)	50	50	50	50	50	50
Stock Διάλυμα	A		B		Γ	
APTES (mmol)	3.33		-		3.33	
ETID (mmol)	-		3.33		3.33	
pH	7.02		7.16		7.10	

Η μελέτη της συγκέντρωσης των συστατικών στην υπερκείμενη φάση πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και την προστέθηκαν 350 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D-0.05 wt. % TMSp, κατόπιν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR. Με το πέρας της μελέτης προσρόφησης, αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση με την χρήση γυάλινης πιπέτας. Το σύστημα αφέθηκε σε ηρεμία χωρίς καμία υπερκείμενη φάση για 24 ώρες. Παράλληλα, ρυθμίστηκαν 300 mL απιονισμένου νερού σε pH = 7.33 και με την χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου (100 mL), μοιράστηκαν 50 mL σε κάθε σύστημα (A1, A2, B1, B2, Γ1, Γ2).

Σε αυτό το σημείο ξεκίνησαν οι μελέτες αποδέσμευσης του φαρμάκου και η διαρροή του APTES από τις υδρογέλες. Η μελέτη της συγκέντρωσης των συστατικών στην υπερκείμενη φάση πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και την προστέθηκαν 350 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D-0.05 wt. % TMSp, κατόπιν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR.

- **Τροποποίηση υδρογέλης 3 % Laponite® XL-21 XR με το οργανοσιλάνιο TESPSA**

Για την υλοποίηση της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων παρασκευάστηκαν οι εξής υδρογέλες όπως αναπαριστώνται τα συστατικά τους στον **Πίνακα 7**. Σε κάθε σύστημα (Α, Β, Γ) πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (1 και 2). Κάθε υδρογέλη αφέθηκε να ωριμάσει για 24 ώρες.

Πίνακας 7. Συστατικά υδρογελών που παρασκευάστηκαν για την σειρά πειραμάτων επιφανειακής τροποποίησης Laponite® μέσω φυσικής προσρόφησης χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο TESPSA.

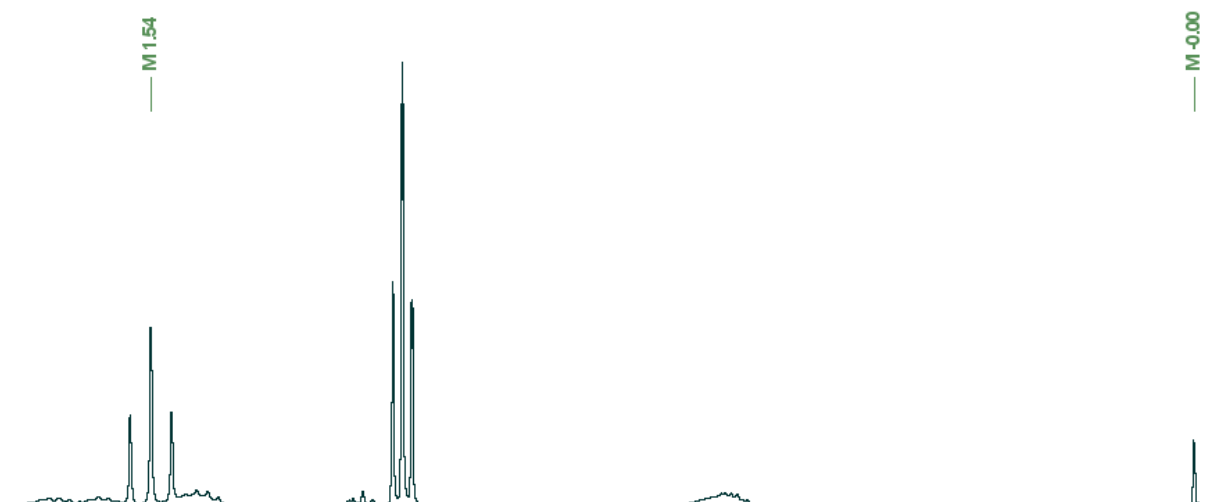
Σύστημα	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2
H ₂ O (g)	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7
Laponite® XL-21 XR (g)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
HCl 1 M (μL)	80	85	80	80	90	90
pH	6.99	6.99	7.18	7.07	7.03	7.06

Κατόπιν, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: **(Α)** Προστέθηκαν 9.28 mL από stock διάλυμα TESPSA (ζυγίστηκαν 5.461 g TESPSA 93 % w/w και αντέδρασαν με 25 mL νερό και προστέθηκαν 6 πελέτες NaOH) σε 100 mL απιονισμένου νερού, ρυθμίστηκε σε pH = 7.09 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL, **(Β)** Διαλύθηκαν 2.453 mL ETID (60 % w/w) σε 100 mL απιονισμένο νερό, ρυθμίστηκε σε pH = 7.16 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL, **(Γ)** Προστέθηκαν 9.28 mL από stock διάλυμα TESPSA (ίδιο stock με το διάλυμα Α) σε περίπου 100 mL απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 2.453 mL ETID (60 % w/w), το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH = 7.11 και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 mL. Με την χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου μετρήθηκαν δύο φορές 50 mL από κάθε διάλυμα (Α, Β ή Γ) και προστέθηκαν στα αντίστοιχα συστήματα υδρογελών προσεκτικά με την χρήση γυάλινης πιπέτας. Στον **Πίνακα 8** αναπαριστώνται συγκεντρωτικά τα συστατικά κάθε υπερκείμενης φάσης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε σύστημα.

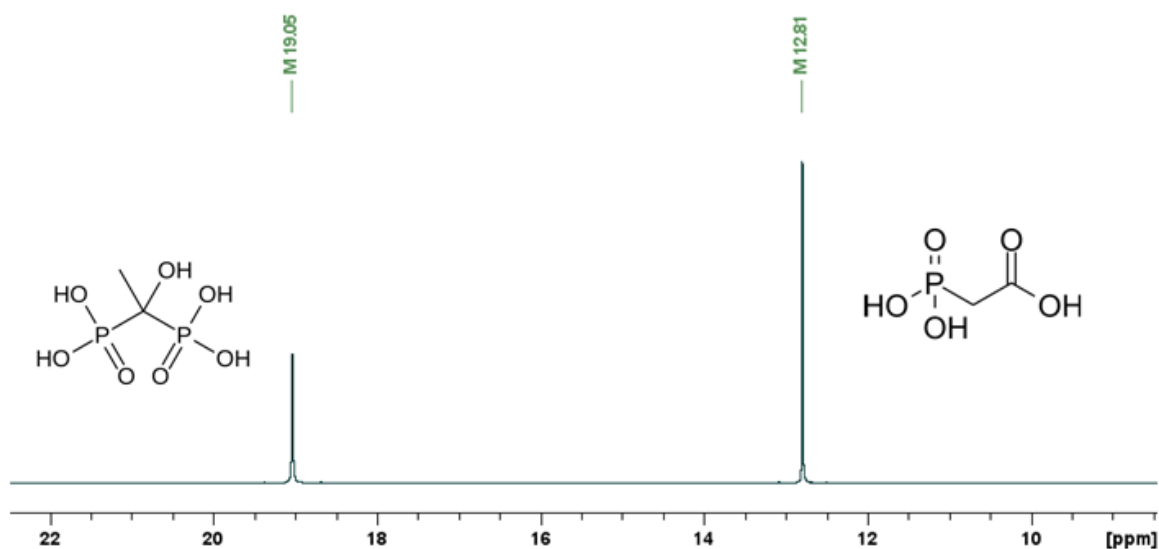
Πίνακας 8. Συγκεντρωτικά δεδομένα σύστασης των υπερκειμένων φάσεων που προστέθηκαν στα πειράματα απορρόφησης με το οργανοσιλάνιο TESPSA.

	Control (TESPSA)		Control(ETID)		TESPSA +ETID	
Σύστημα	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2
V (mL)	50	50	50	50	50	50
Stock Διάλυμα	A		B		Γ	
TESPSA (mmol)	3.33		-		3.33	
ETID (mmol)	-		3.33		3.33	
pH	7.09		7.16		7.11	

Η μελέτη της συγκέντρωσης των συστατικών στην υπερκείμενη φάση πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και προστέθηκαν 350 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSP για τα συστήματα A και B. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR. Για το σύστημα Γ λόγω αλληλοεπικάλυψης του σήματος του ETID από το TESPSA όπως γίνεται εμφανές στο φάσμα που απεικονίζεται στην **Εικόνα 34**, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του ETID μέσω ^{31}P NMR. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε stock πρότυπου διαλύματος διαλύοντας 280.098 mg PES 99.6 % καθαρότητας σε 14 mL D_2O 99.6 % D (D_2O - 1.993 % PES). Σε κάθε δείγμα στα NMR tubes προστέθηκαν 350 μL D_2O - 1.993 % PES. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^{31}P NMR χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα zgig30 με αποσύζευξη των πυρήνων πρωτονίου και με NS = 32, λαμβάνοντας φάσματα όπως φαίνονται στην **Εικόνα 35**. Κατόπιν, στα ίδια δείγματα προστέθηκε δεύτερο πρότυπο με στόχο της ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του TESPSA στην υπερκείμενη φάση. Ειδικότερα, προστέθηκαν 350 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSP πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR.



Εικόνα 34. Φάσμα ¹H NMR του συστήματος Γ, το οποίο περιείχε TESPSA και ETID στην υπερκείμενη φάση. Η τριπλή κορυφή στα 1.54 ppm αντιστοιχεί στην μεθυλομάδα του ETID, η οποία αλληλεπικαλύπτεται από άλλα σήματα, συνεπώς δεν μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση με ¹H NMR.



Εικόνα 35. Φάσμα ³¹P NMR του ETID ($\delta = 19.05$ ppm, που αντιστοιχεί στις δύο φωσφονικές ομάδες που διαθέτει), παρουσία εσωτερικού προτύπου PES ($\delta = 12.81$ ppm, που αντιστοιχεί στη φωσφονική ομάδα του).

Με το πέρας της μελέτης προσρόφησης, αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση με την χρήση γυάλινης πιπέτας. Το σύστημα αφέθηκε σε ηρεμία χωρίς υπερκείμενη φάση για 24 ώρες. Παράλληλα, ρυθμίστηκαν 300 mL απιονισμένου νερού σε pH = 7.38 και με την χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου (100 mL), μοιράστηκαν 50 mL σε κάθε σύστημα (A1, A2, B1, B2, Γ1, Γ2).

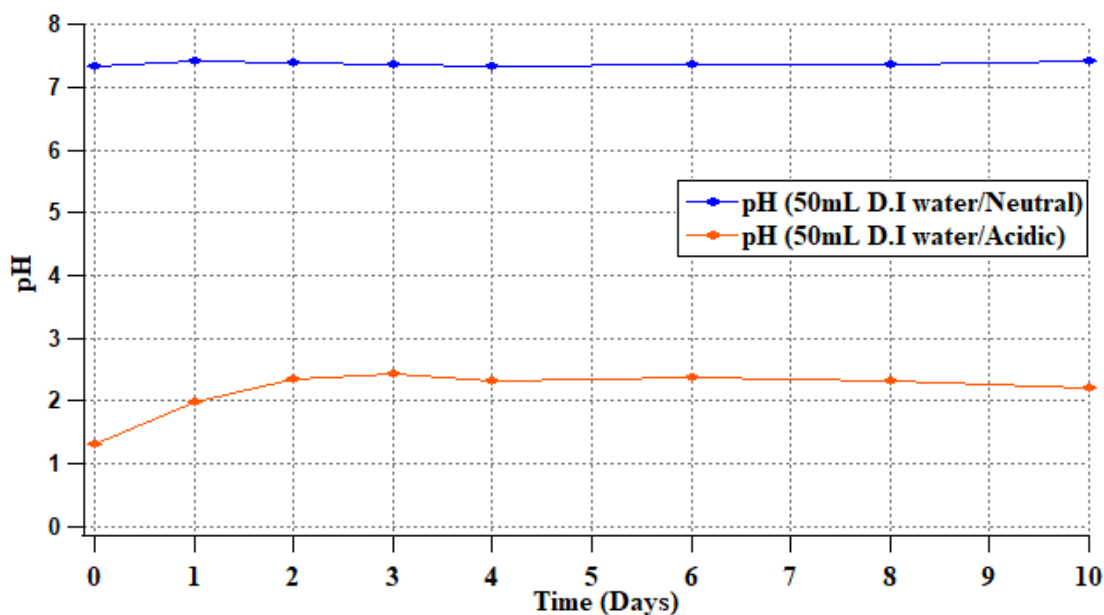
Σε αυτό το σημείο ξεκίνησαν οι μελέτες αποδέσμευσης του φαρμάκου και η διαρροή του TESPSA από τις υδρογέλες. Η μελέτη της συγκέντρωσης των συστατικών στην υπερκείμενη φάση πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση για τις πρώτες 7 ώρες, ανά μία ώρα και κατόπιν στις 7.5, 24, 48, 72 και 144 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε NMR tubes και για τα συστήματα Α και Β προστέθηκαν 150 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSP, κατόπιν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR. Για την ποσοτικοποίηση του ETID μέσω ^{31}P NMR για το σύστημα Γ παρασκευάστηκε stock πρότυπου διαλύματος διαλύοντας 70.132 mg PES 99.6 % καθαρότητας σε 14 mL D_2O 99.6 % D (D_2O - 0.499 % PES). Σε κάθε δείγμα στα NMR tubes προστέθηκαν 150 μL D_2O - 0.499 % PES. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^{31}P NMR χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα zgig30 με αποσύζευξη των πυρήνων πρωτονίου και με $\text{NS} = 32$. Μετέπειτα, στα ίδια δείγματα προστέθηκε δεύτερο πρότυπο, με στόχο της ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του TESPSA στην υπερκείμενη φάση. Ειδικότερα, προστέθηκαν 150 μL πρότυπο D_2O 99.9 atom % D- 0.05 wt. % TMSP πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μέσω ^1H NMR.

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1. Μελέτες χημικής σταθερότητας των υδρογελών Laponite® XL-21 XR όταν εκτίθενται σε υδατικό μέσο.

4.1.1. Μελέτες μεταβολής τιμής pH της υπερκείμενης φάσης

Στο **Διάγραμμα 1** αναπαριστώνται σε μορφή γραφήματος οι μετρήσεις pH που λήφθηκαν από τις υπερκείμενες φάσεις συναρτήσει του χρόνου (εκφρασμένο σε ημέρες). Τα σημεία αναφέρονται στο μέσο όρο των μετρήσεων δύο συστημάτων για κάθε υπερκείμενη φάση. Συγκεκριμένα, δύο υδρογέλες 3 % Laponite® XL-21 XR-300 mg ETID (pH = 7) υποβλήθηκαν σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (50 mL) ρυθμισμένη σε pH = 7.33 (μπλε σημεία) και δύο υδρογέλες 3 % Laponite® XL-21 XR-300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση των 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένη σε pH = 1.32 (πορτοκαλί σημεία). Στα συστήματα που μελετήθηκε η μεταβολή του pH της υπερκείμενης φάσης σε ουδέτερες συνθήκες (pH = 7.33) διατηρήθηκε σχετικά σταθερό. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στις τιμές pH της υδρογέλης και της υπερκείμενης φάσης. Αντίθετα, στα συστήματα που μελετήθηκε η μεταβολή του pH της υπερκείμενης φάσης σε όξινες συνθήκες (pH = 1.32), παρατηρήθηκε μικρή μεταβολή που σταθεροποιήθηκε σε περίπου τιμή pH = 2.3 την 3^η ημέρα. Η μεταβολή αυτή μπορεί να οφείλεται στην μερική αποικοδόμηση της υδρογέλης, και κατ' επέκταση στην αλληλεπίδραση των δύο φάσεων στη διεπιφάνειά τους, με φυσικό επακόλουθο να επηρεάζεται το pH της υπερκείμενης φάσης. Επιπρόσθετα, μπορεί να οφείλεται στην πρωτονίωση των εκτεθειμένων αμφοτερικών ομάδων Mg-OH, Li-OH και Si-OH. Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα της Εισαγωγής (**1.3. Υδρογέλες Laponite®**), ο άργιλος Laponite® μπορεί να δράσει ως ασθενής βάση λόγω της ύπαρξης των προαναφερθέντων ομάδων. Σε όξινες συνθήκες τα ιόντα H⁺ μπορούν να προσροφηθούν από την υδρογέλη, και κατά συνέπεια να αυξηθεί το pH της υπερκείμενης φάσης.

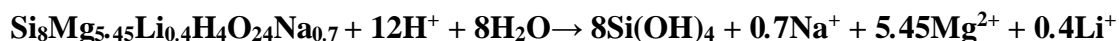


Διάγραμμα 1. Μεταβολή των τιμών pH της υδατικής φάσης στην οποία εκτίθεται η υδρογέλη 3 % Laronite® XL-21 XR-300 mg ETID (pH = 7). (α) Τα μπλε σημεία αναφέρονται σε υπερκείμενη φάση 50 mL με pH = 7.33 (β) Τα πορτοκαλί σημεία αναφέρονται σε υπερκείμενη φάση 50 mL με pH = 1.32.

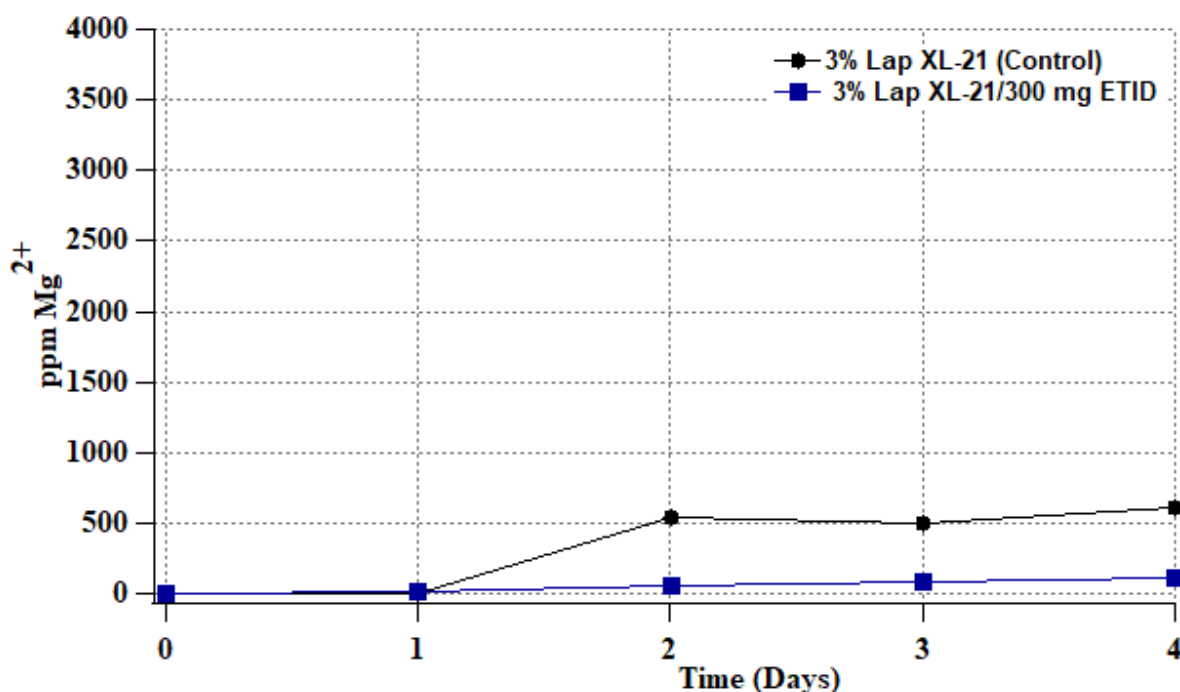
4.1.2. Μελέτες διαρροής ιόντων Mg^{2+} , μέσω τιτλοδότησης με EDTA και δείκτη EBT

Υδρογέλες 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control) και 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID ρυθμισμένες σε pH = 7 υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές υπερκείμενες υδατικές φάσεις, συγκεκριμένα, 50 mL ρυθμισμένες σε pH = 1.17, pH = 6.80 και pH = 7.46. Κατόπιν, τα έξι διαφορετικά συστήματα μελετήθηκαν ως προς τη διαρροή ιόντων Mg^{2+} με συμπλοκομετρική τιτλοδότηση χρησιμοποιώντας τον χηλικό υποκαταστάτη EDTA παρουσία δείκτη Eriochrome Black T (EBT ή ErioT). Ο τιτλοδότης EDTA συμπλοκοποιεί τα ιόντα Mg^{2+} σε αναλογία 1:1, συνεπώς ισχύει η σχέση $n_{EDTA} = n_{Mg}$. Ο όγκος EDTA που χρησιμοποιήθηκε καταγράφηκε και κατόπιν υπολογίστηκε για κάθε σύστημα η συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} εκφρασμένη σε ppm. Ο τρόπος υπολογισμού περιγράφεται αναλυτικά στο τμήμα των Παραρτημάτων (Ενότητα 7.1.2). Στο **Διάγραμμα 2** αναπαριστάται η συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} που προσδιορίστηκε σε υπερκείμενη φάση με pH = 1.17 σε συνάρτηση με τον χρόνο εκφρασμένο σε ημέρες. Ειδικότερα, τα σημεία με μαύρο χρώμα αναφέρονται στο Control (Υδρογέλη απουσία ETID) ενώ με μπλε χρώμα η υδρογέλη που περιείχε 300 mg ETID. Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι οι υδρογέλες παρέμεναν σταθερές τις πρώτες 24 ώρες, ενώ στο διάστημα μεταξύ της 1^{ης} και 2^{ης} ημέρας παρατηρήθηκε διαρροή ιόντων Mg^{2+} . Η ποσότητα που διαρρέει από τις υδρογέλες φαίνεται να φτάνει σε πλατώ από

την 2^η ημέρα και για τα δύο συστήματα. Η διαρροή ιόντων Mg²⁺ όταν η υδρογέλη εκτίθεται σε όξινο περιβάλλον ήταν αναμενόμενη, διότι όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.3.1 υπόκειται όξινη υδρόλυση σύμφωνα με την αντίδραση:



Εξετάζοντας τις υδρογέλες απουσία και παρουσία του ETID, φαίνεται ότι η ύπαρξη του φαρμάκου ενισχύει την σταθερότητα της υδρογέλης ως προς την όξινη υδρόλυση της. Συγκεκριμένα, προσδιορίζοντας την συνολική θεωρητική ποσότητα των ιόντων Mg²⁺ που περιέχονται σε 0.3 g Laronite[®] XL-21 XR σε συνολικό όγκο υδρογέλης 10 mL (οι θεωρητικοί υπολογισμοί περιγράφονται λεπτομερώς στα Παραρτήματα στην Ενότητα 7.1.2) υπολογίστηκε ότι στην περίπτωση της άδειας υδρογέλης παρατηρήθηκε περίπου 14.6 % διαρροή, ενώ παρουσία ETID 2.5 %. Το ποσοστό διαρροής των ιόντων Mg²⁺ αποτελεί ένδειξη βαθμού αποικοδόμησης του συστήματος, συνεπώς τα συστήματα αποικοδομούνται σε πολύ μικρό ποσοστό στο χρονικό διάστημα της μελέτης.



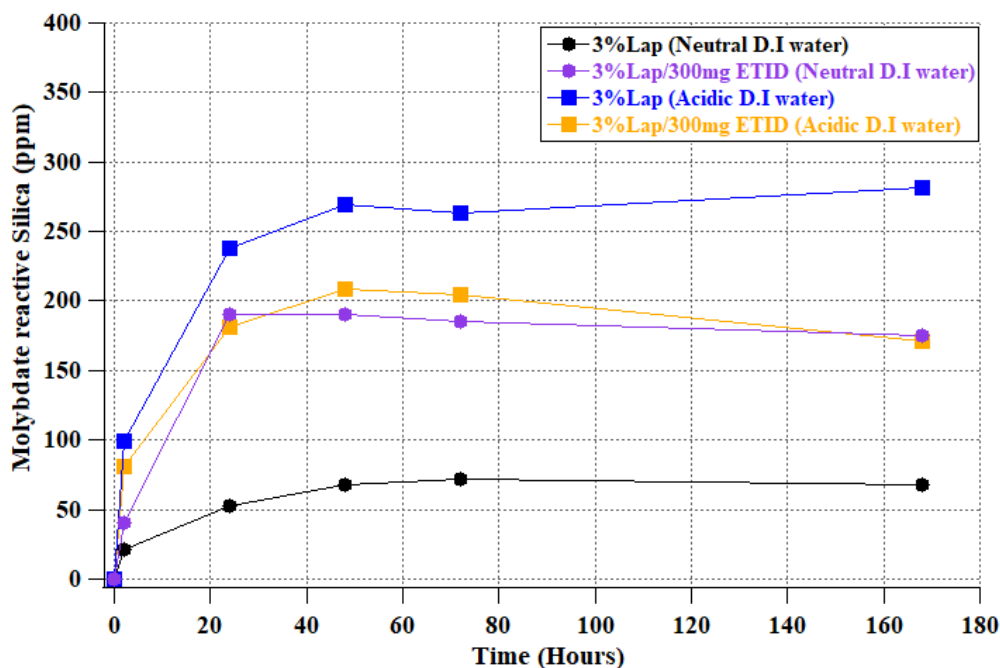
Διάγραμμα 2. Αναπαράσταση της συγκέντρωσης ιόντων Mg²⁺ (ppm) συναρτήσεως του χρόνου (ημέρες) που διαρρέουν από τις υδρογέλες όταν εκτίθενται σε υπερκείμενη υδατική φάση pH = 1.17. Τα σημεία με μαύρο χρώμα αναφέρονται σε υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control),

ενώ με μπλε χρώμα σε υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID (και οι δύο υδρογέλες ήταν ρυθμισμένες σε pH = 7).

Από την άλλη πλευρά, για τις υδρογέλες που εκτέθηκαν σε υδατικές φάσεις pH = 6.8 και pH = 7.46 δεν παρατηρήθηκε διαρροή ιόντων Mg^{2+} , γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία.

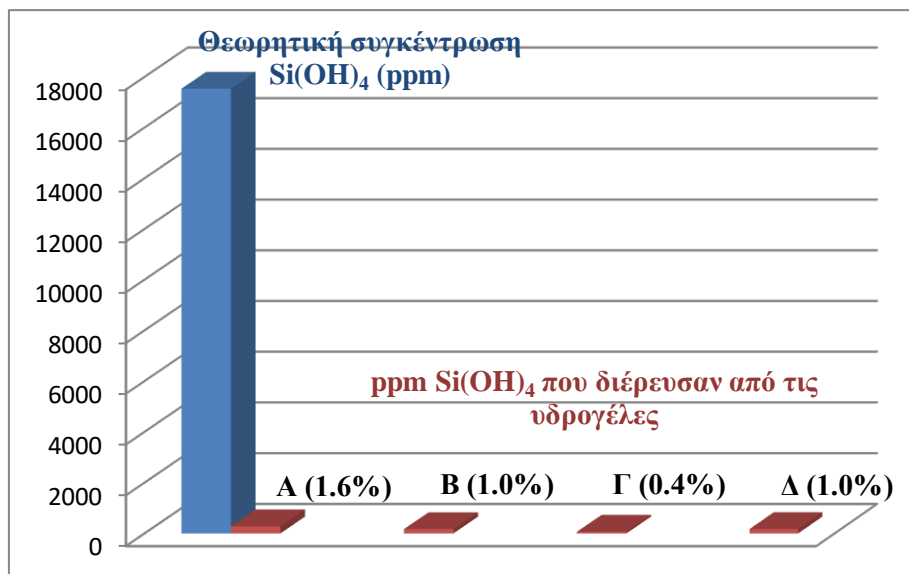
4.1.3. Μελέτες διαρροής διαλυτών ειδών $Si(OH)_4$ με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος.

Στο **Διάγραμμα 3** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα της μελέτης διαρροής των διαλυτών πυριτικών ειδών από τις υδρογέλες στην υπερκείμενη φάση με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος. Συγκεκριμένα, αναπαριστάται η συγκέντρωση των διαλυτών πυριτικών (εκφρασμένα ως ppm SiO_2) σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Τα σημεία με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις για την υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR, ενώ τα σημεία με κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις για την υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID όπου έχουν εκτεθεί σε υπερκείμενη φάση με pH = 1.30. Παράλληλα, τα σημεία με μωβ χρώμα αναφέρονται στην υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID, ενώ τα σημεία με μαύρο χρώμα στην υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR, όπου έχουν εκτεθεί σε υπερκείμενη φάση με pH = 7.33. Σε όλα τα συστήματα φαίνεται ότι η διαρροή βρίσκεται σε εξέλιξη τις πρώτες 24 ώρες και κατόπιν σταθεροποιείται. Παρατηρήθηκε ότι, οι υδρογέλες που περιέχουν ETID ανεξάρτητα από την τιμή pH που έχει η υπερκείμενη φάση που εκτίθενται, απελευθερώνουν περίπου την ίδια ποσότητα πυριτικών, περίπου 150 ppm. Η μέγιστη απελευθέρωση πυριτικών παρατηρήθηκε στην «άδεια» υδρογέλη που υποβλήθηκε σε όξινη συνθήκες. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιείται όξινη υδρόλυση του υλικού. Η διαρροή πυριτικών από την υδρογέλη που δεν περιέχει ETID σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση, παρατηρήθηκε ότι ήταν η μικρότερη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η διαρροή μικρής ποσότητας πυριτικών (περίπου 50 ppm), οφείλεται στη διαδοχική αντίδρασης υδρόλυσης και συμπύκνωσης του δεσμού Mg-O-Si (προς σχηματισμό Mg-OH), όπου παράγει ιόντα OH^- όπου επιτίθενται στο πλέγμα Si-O-Si, σχάζοντας τους δεσμούς σιλοξανίου και απελευθερώνοντας $Si(OH)_4$.



Διάγραμμα 3. Αναπαράσταση συγκέντρωσης διαλυτών ειδών πυριτικού (ppm) που έχουν διαρρεύσει από τις υδρογέλες όταν εκτίθενται σε υδατική υπερκείμενη φάση διαφορετικού pH, συναρτήσει του χρόνου (ώρες). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος. Τα σημεία με μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control) και τα σημεία με κίτρινο χρώμα αφορούν υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID όπου έχουν εκτεθεί σε υπερκείμενη φάση με pH = 1.30. Τα σημεία με μαύροχρώμα αντιστοιχούν σε υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control) και τα σημεία με μωβ χρώμα αφορούν υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID που έχουν εκτεθεί σε υπερκείμενη φάση με pH = 7.33.

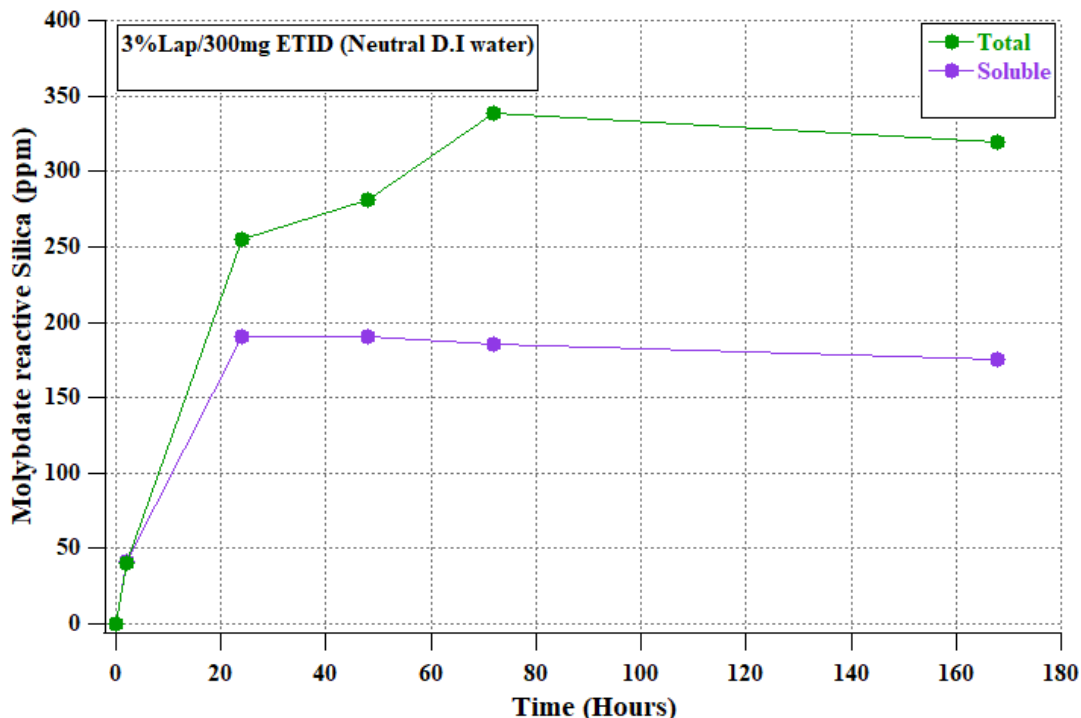
Υπολογίζοντας την θεωρητική ολική ποσότητα πυριτικών που περιέχονται στην ποσότητα Laronite® XL-21 XR που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των υδρογελών (ο τρόπος υπολογισμού περιγράφεται στην **Ενότητα 7.1.3**), παρατηρήθηκε ότι ελάχιστο ποσοστό διαρρέει. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ότι σε 0.3 g Laronite® XL-21 XR (10 mL υδρογέλης) υπάρχουν περίπου 17,538 ppm πυριτικά. Στο **Διάγραμμα 4** αναπαριστάται η ποσοστιαία συνολική διαρροή πυριτικών σε σύγκριση με τον συνολικό θεωρητικό αριθμό που υπολογίστηκε. Ειδικότερα, για την υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR σε όξινο περιβάλλον (Στήλη Α) σημειώθηκε 1.6 % διαρροή και για την υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR σε ουδέτερο περιβάλλον (Στήλη Γ) σημειώθηκε 0.4 %. Για τις υδρογέλες 3 % w/w Lap. XL-21 XR παρουσία 300 mg ETID παρατηρήθηκε περίπου 1 % διαρροή πυριτικών ανεξάρτητα αν η υδατική φάση ήταν όξινη ή ουδέτερη (Στήλη Β και Δ).



Διάγραμμα 4. Σύγκριση συνολικής ποσότητας πυριτικών που διαρρέουν από την υδρογέλη με την θεωρητικά υπολογισμένη συνολική περιεκτικότητα στην ποσότητα του υλικού που χρησιμοποιήθηκε (Α) 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control) και (Β) 3 % w/w Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID σε υπερκείμενη φάση με pH = 1.30. (Γ) 3 % w/w Lap. XL-21 XR (Control) και (Δ) 3 % w/w Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID σε υπερκείμενη φάση με pH = 7.33.

Στις μελέτες ολικής συγκέντρωσης διαλυτών πυριτικών, τα δείγματα ρυθμίστηκαν σε pH > 10 προκειμένου να υδρολυθούν τα ολιγομερισμένα πυριτικά οξέα και να είναι ανιχνεύσιμα με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος. Στο μόνο σύστημα που παρατηρήθηκε ολιγομερισμένο πυριτικό οξύ ήταν στην υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID σε υπερκείμενη φάση με pH = 7.33. Στο **Διάγραμμα 5** αναπαριστάται η συγκέντρωση των διαλυτών πυριτικών (ppm) του συγκεκριμένου συστήματος συναρτήσει του χρόνου. Συγκεκριμένα, τα σημεία με μωβ χρώμα αντιστοιχούν στα ήδη διαλυτά είδη πυριτικών, ενώ με πράσινο χρώμα η ολική συγκέντρωση μετά την αύξηση του pH του δείγματος. Ο ολιγομερισμός του πυριτικού οξέος αποτελεί μία ιδιόμορφη διαδικασία που μπορεί να συμβεί όταν οι συνθήκες το επιτρέπουν. Έχουν γίνει αναφορές [58] ότι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 200 ppm διαλυτού πυριτικού οξέος σε φυσιολογικό pH ευνοείται ο ολιγομερισμός του. Ως φυσικό επακόλουθο, επειδή στο συγκεκριμένο σύστημα παρατηρήθηκε διαρροή πυριτικών ολικής συγκέντρωσης περίπου 340 ppm, μέρος του αυτοσυμπυκνώθηκε και σχημάτισε ολιγομερή τα οποία δεν ήταν ανιχνεύσιμα χωρίς την επαναδιαλυτοποίησή τους. Συγκρίνοντας της ολική ποσότητα που διέρρευσε συγκριτικά με το θεωρητικό ποσό, προσδιορίστηκε ότι απελευθερώθηκε περίπου 1.8 % συνολικά από το δίκτυο της υδρογέλης. Ο λόγος που παρατηρείται αυξημένη διαρροή στις υδρογέλες που

περιέχουν το ETID είναι ότι ως υδρόφιλη ένωση αυξάνει την διάχυση των μορίων του νερού εντός της υδρογέλης, και κατά επέκταση την απόσπαση πυριτικών από το δίκτυο.



Διάγραμμα 5. Μελέτη ολικής συγκέντρωσης πυριτικών μετά από την επαναδιαλυτοποίηση ολιγομερισμένου πυριτικού οξέος στο σύστημα 3 % w/w Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID σε υπερκείμενη φάση με pH = 7.33. Τα σημεία με μωβ χρώμα αναφέρονται στα ήδη διαλυτά είδη πυριτικών που διέρρευσαν, ενώ με πράσινο χρώμα στην ολική ποσότητα πυριτικών, μετά την αύξηση του pH του προς ανάλυση δείγματος.

4.2. Απόκριση της αποδέσμευσης του ETID σε εξωτερικά ερεθίσματα

Με τη βοήθεια του λογισμικού Topspin ολοκληρώθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές των προς ανάλυση ενώσεων (ETID, APTES, EDTA, TESPSA) και του πρότυπου διαλύματος. Η τιμή των ολοκληρωμάτων διαιρέθηκε με το πλήθος των πρωτονίων ή των ατόμων φωσφόρου που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της κορυφής και πραγματοποιήθηκε διόρθωση του όγκου σύμφωνα με την εξίσωση I, για τον υπολογισμό του αναλύτη (μmol) σε κάθε δείγμα. Ο όγκος του κάθε δείγματος όπως ήδη έχει αναφερθεί είναι 350 μL και ο τελικός όγκος ($V_{τελ}$) αποτελεί τον όγκο του διαλύματος που έχει παραμείνει στο ποτήρι ζέσης μετά από κάθε δειγματοληψία.

$$I. \quad \text{Συγκέντρωση αναλύτη δείγματος (}\mu\text{mol)} = \frac{\frac{\text{Ολοκλήρωμα κορυφής}}{\text{Αριθμός πυρήνων H ή P}}}{V \text{ δείγματος}} * V_{τελ}.$$

Τα δεδομένα από τις ολοκληρώσεις των κορυφών στα φάσματα NMR εκφράστηκαν ως « % αποδέσμευση». Η % αποδέσμευση υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω εξίσωση (II)

$$\text{II. \% Αποδέσμευση} = \frac{\text{Συγκέντρωση αναλύτη δείγματος}}{\text{Μέγιστη συγκέντρωση}} * 100 \%$$

Όπου η μέγιστη συγκέντρωση αναλύτη είναι η συγκέντρωση του αναλύτη που τοποθετήθηκε αρχικά στο κάθε σύστημα κατά την παρασκευή του. Τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν σε διαγράμματα-καμπύλες αποδέσμευσης με τη βοήθεια του προγράμματος IGOR τα οποία συσχετίζουν την % αποδέσμευση συναρτήσει του χρόνου. Κατόπιν, σε κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκε προσαρμογή (fitting) των σημείων σε καμπύλες με βάση την εκθετική εξίσωση III. Η συγκεκριμένη εξίσωση χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση όλων των καμπυλών που παρουσιάζονται παρακάτω

$$\text{III. Release (\%)} = A * e^{Bt} + C$$

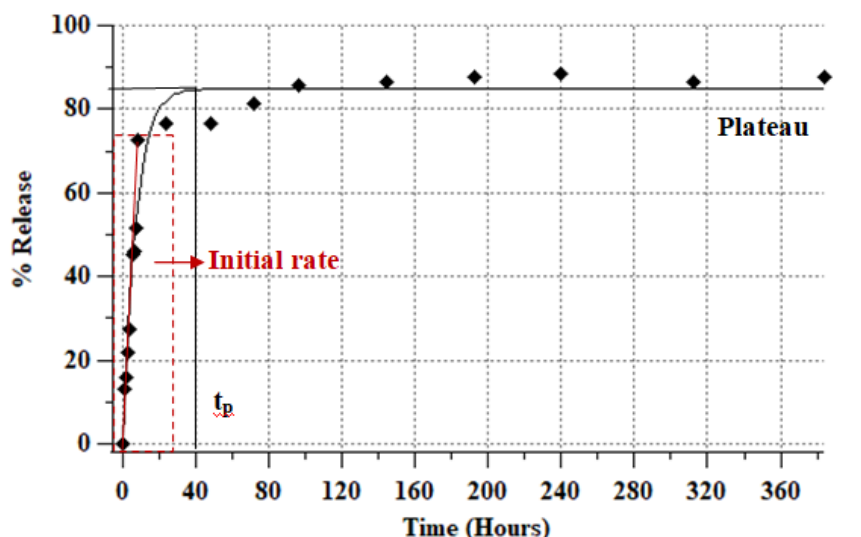
Η εξίσωση αποτελεί απλουστευμένη μορφή κινητικής πρώτης τάξης όπου οι σταθερές A, B και C έχουν την εξής φυσική σημασία:

A: $Y_0 - Y_{\max}$, όπου Y_0 αρχική τιμή απελευθέρωσης αναλύτη

B = σταθερά ρυθμού απελευθέρωσης ETID ή άλλου αναλύτη

C = μέγιστη τιμή απελευθέρωσης ETID ή άλλου αναλύτη (Plateau)

Η % αποδέσμευση στα συστήματα που μελετήθηκαν αυξάνεται λογαριθμικά συναρτήσει του χρόνου μέχρι να φτάσει στη μέγιστη τιμή της και να σταθεροποιηθεί σχηματίζοντας ένα «πλατώ» (plateau). Ο χρόνος (t_p) που απαιτείται για να δημιουργηθεί το «πλατώ» (και να φτάσει το σύστημα σε κατάσταση ισορροπίας) είναι χαρακτηριστικός για κάθε σύστημα αποδέσμευσης, όπως και ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) που χρειάζεται για να αποδεσμευτεί η μισή ποσότητα της μέγιστης τιμής (%). Ο χρόνος t_p και ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) υπολογίστηκαν για κάθε σύστημα από την εξίσωση III. Τέλος, ο αρχικός ρυθμός (ή αρχική ταχύτητα, initial rate) της αποδέσμευσης του φαρμάκου μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση της καμπύλης (στο ευθύγραμμο τμήμα της) και εξαρτάται από τις ιδιότητες του κάθε συστήματος. Οι παραπάνω τιμές υπολογίστηκαν για όλα τα συστήματα αποδέσμευσης που μελετήθηκαν. Στο **Διάγραμμα 6** αναπαριστάται πρότυπη καμπύλη αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλη Laponite® XL-21XR.



Διάγραμμα 6. Καμπύλη της αποδέσμευσης (%) του ETID από την υδρογέλη Laponite® XL-21 XR.

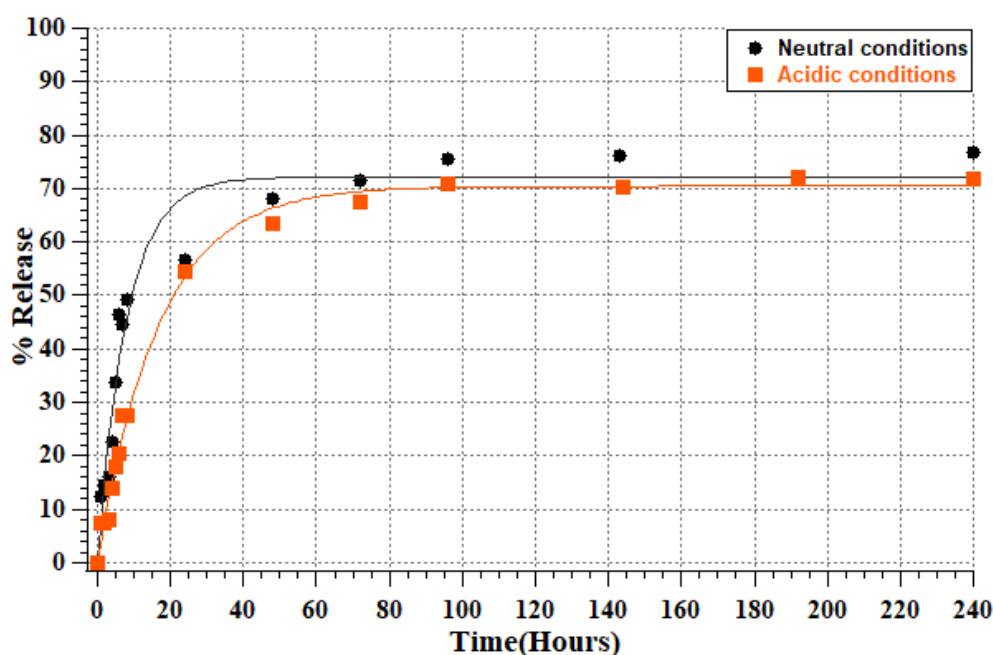
4.2.1. Μεταβολή pH

Στο Διάγραμμα 7 αναπαριστώνται τα αποτελέσματα των μελετών αποδέσμευσης του ETID όταν τα συστήματα των υδρογελών εκτίθενται σε υδατικά συστήματα με διαφορετικό pH. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε το πώς υδρογέλες 3 % w/w Laponite® παρουσία 300 mg ETID αποκρίνονται σε υδατικές υπερκείμενες φάσεις (50 mL) με pH = 1.3 και pH = 7.3. Το διάγραμμα της % αποδέσμευσης του ETID σε συνάρτηση με τον χρόνο προέκυψε από τον μέσο όρο των μετρήσεων δύο υδρογελών σε κάθε υπερκείμενη φάση (όξινη συνθήκη και ουδέτερη). Για το όξινο σύστημα παρατηρήθηκε ότι απελευθερωνόταν συνολικά περίπου το **70 %** της συνολικής ποσότητας που είχε εισαχθεί στην μήτρα της υδρογέλης. Το σύστημα προσδιορίστηκε ότι εμφάνιζε αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης **0.96 μmol/min**, ο χρόνος που απαιτούταν για να φτάσει πλατώ ήταν περίπου **48 ώρες** ενώ ο χρόνος που χρειαζόταν για να αποδεσμεύσει την μισή της μέγιστης ποσότητας ήταν περίπου **12 ώρες**. Το σύστημα αποκρινόταν διαφορετικά σε ουδέτερες συνθήκες, παρόλο που η συνολική ποσότητα του ETID που αποδεσμεύτηκε ήταν παρόμοια (**72 %**). Ειδικότερα, το σύστημα παρατηρήθηκε ότι αποδέσμευε γρηγορότερα το ETID, εμφανίζοντας αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης **1.64 μmol/min**, χρόνο $t_{1/2} = 5.5$ ώρες και $t_p = 17$ ώρες.

Η διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών σταθερών της κινητικής μελέτης αποδέσμευσης του ETID (αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης, $t_{1/2}$ και t_p) πιθανώς οφείλεται στην διαφορετική διαλυτότητα που έχει το ETID σε διαφορετικά pH και στο γεγονός ότι ο κύριος μηχανισμός

αποδέσμευσης της φαρμακευτικής ουσίας είναι μέσω διάχυσης. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία [59], το ETID ως πολυπρωτικό οξύ παρουσιάζει 4 σταθερές διάσπασης οξέος ($pK_{a1} = 1.7$, $pK_{a2} = 2.47$, $pK_{a3} = 7.28$, $pK_{a4} = 10.29$), συνεπώς ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος υπάρχει διαφορετική κατανομή των των αποπρωτονιωμένων μορφών του. Σε ουδέτερες συνθήκες υπερισχύει η διπλά αποπρωτονιωμένη μορφή του ενώ σε όξινες ($pH = 1.3$) η πλήρως πρωτονιωμένη. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ότι στις ουδέτερες συνθήκες μπορεί να σχηματίσει ισχυρότερους δεσμούς ιόντος-διπόλου με το νερό, και κατά επέκταση να παρασύρει το ETID πιο εύκολα εκτός της υδρογέλης. Συνεπώς, θα αποδεσμεύεται με γρηγορότερο ρυθμό συγκριτικά με τις όξινες συνθήκες αποδέσμευσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποδέσμευση του ETID δεν φτάνει στο 100 %, διότι ως πολική ένωση αλληλεπιδρά ισχυρά με τα φορτισμένα φύλλα Laponite[®], συνεπώς τα μόρια του νερού αδυνατούν να παρασύρουν ένα ποσοστό εκτός του δικτύου της υδρογέλης. Επιπλέον, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι το πλατώ εκφράζει και μια κατάσταση ισορροπίας μεταξύ της υδατικής και της φάσης της υδρογέλης, οπότε δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η αποδέσμευση του ETID δεν φτάνει το 100 %. Η συγκεκριμένη παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε όλα τα συστήματα που υποβλήθηκαν σε μελέτες αποδέσμευσης και συμφωνεί με την βιβλιογραφία [60] σχετικά με τις υδρογέλες Laponite[®] ως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών.



Διάγραμμα 7. Αποδέσμευση (%) του ETID από 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID ($pH = 7$) υδρογέλες σε υπερκείμενες φάσεις με $pH = 1.3$ και $pH = 7.3$ συναρτήσει του χρόνου (ώρες).

Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα και τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά την προσαρμογή της εξίσωσης **III** στα πειραματικά δεδομένα, προσδιορίστηκαν οι σταθερές A, B και C δίνοντας τις παρακάτω εξισώσεις που περιγράφουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση του ETID για τα συγκεκριμένα συστήματα:

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 1.3:

$$y(t) = -70.203 * e^{-0.059307t} + 70.441$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.3:

$$y(t) = -72.18 * e^{-0.12531t} + 72.149$$

Στον **Πίνακα 9** αναπαριστώνται συγκεντρωτικά οι χαρακτηριστικές σταθερές για κάθε σύστημα μετά την κινητική τους ανάλυση.

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 7.

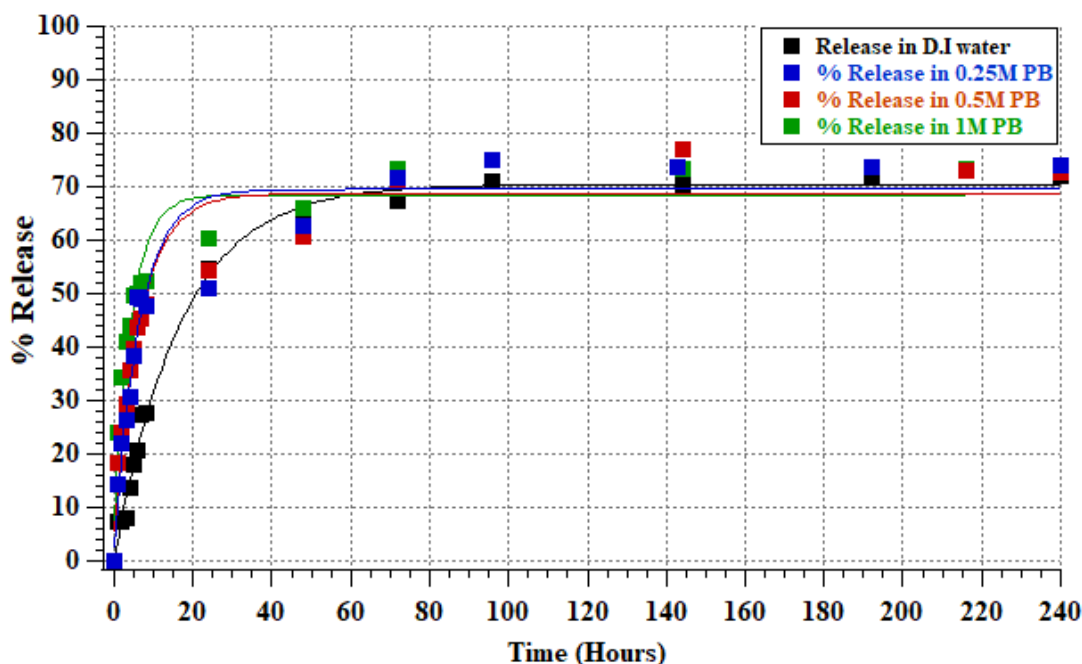
pH υπερκείμενης φάσης	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
1.32	0.96	70	47.7	11.6
7.33	1.64	72	16.6	5.5

4.2.2. Αποδέσμευση σε διαφορετικής ιοντικής σύστασης υπερκείμενη φάση

Η μεταβολή του pH της υπερκείμενης φάσης με την έκθεση της υδρογέλης σε όξινες συνθήκες αποδέσμευσης, έδωσε το έναυσμα για την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος στην υδατική φάση και για τη μελέτη του κινητικού προφίλ του ETID ανάλογα με τη σύσταση της υπερκείμενης φάσης. Στο **Διάγραμμα 8** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενες φάσεις που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (**PB**, 0.25 M ή 0.5 M ή

1 M) ρυθμισμένο σε $\text{pH} = 1.3$. Συγκεκριμένα, αναπαριστάται η % αποδέσμευση σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες) με μπλε χρώμα όταν η υπερκείμενη φάση αποτελούταν από 0.25 M PB, με κόκκινο χρώμα για 0.5 M PB και με πράσινο χρώμα για 1 M PB. Παράλληλα, προκειμένου να συγκριθεί αν υπάρχει μεταβολή του κινητικού προφίλ αποδέσμευσης του ETID παραθέεται ως σύστημα αναφοράς η απελευθέρωση σε απιονισμένο νερό με μαύρο χρώμα.

Τα 3 ρυθμιστικά διαλύματα εμφάνισαν περίπου την ίδια ρυθμιστική ικανότητα και διατήρησαν το pH της υπερκείμενης φάσης σχετικά σταθερό σε τιμή περίπου ίση με 1.9. Το συνολικό ποσό αποδέσμευσης του φαρμάκου παρέμεινε όμοιο, ωστόσο παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στον αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης, στον χρόνο που φτάνει το σύστημα σε πλατώ και στον χρόνο ημιζωής. Συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιήθηκε 0.25 M υπερκείμενη φάση ο αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης αυξήθηκε σε **1.91 $\mu\text{mol}/\text{min}$** ο χρόνος που χρειαζόταν για να φτάσει το σύστημα σε πλατώ ήταν περίπου 12 ώρες και ο χρόνος ημιζωής περίπου 4 ώρες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενη φάση 0.5 M PB με αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης **1.78 $\mu\text{mol}/\text{min}$** , $t_p = 13$ ώρες και $t_{1/2} = 4$ ώρες. Από την άλλη πλευρά όταν χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενη φάση 1 M PB το σύστημα εμφάνισε αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης **2.11 $\mu\text{mol}/\text{min}$** με χρόνο ημιζωής περίπου 3 ώρες και χρειαζόταν περίπου 7 ώρες να φτάσει σε πλατώ. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ύπαρξη φωσφορικών στην υπερκείμενη φάση επιταχύνουν την αποδέσμευση του ETID. Αυτό ίσως οφείλεται στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) που σχηματίζονται μεταξύ των φωσφορικών της υπερκείμενης φάσης και του ETID που διευκολύνει την διάχυση του εκτός της υδρογέλης.



Διάγραμμα 8. Αποδέσμευση (%) του ETID από 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) υδρογέλες σε υπερκείμενη φάση (pH = 1.3 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) που διαφέρουν ως προς την ιοντική σύσταση: (α) με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η αποδέσμευση σε απιονισμένο νερό (β) με μπλε σε 0.25 M PB (γ) με κόκκινο χρώμα σε 0.5 M PB και (δ) με πράσινο σε 1 M. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Μετά από την προσαρμογή της εξίσωσης **III** στα πειραματικά δεδομένα, προσδιορίστηκαν οι σταθερές A, B και C δίνοντας τις παρακάτω εξισώσεις που περιγράφουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση του ETID για τα συγκεκριμένα συστήματα:

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενης φάσης απιονισμένου νερού pH = 1.3:

$$(α) y(t) = -70.203 * e^{-0.059307t} + 70.441$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενης φάσης 0.25 M PB pH = 1.3:

$$(β) y(t) = -66.81 * e^{-0.15461t} + 69.507$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3% Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενης φάσης 0.5M PB pH = 1.3:

$$(γ) y(t) = -62.925 * e^{-0.14958t} + 68.67$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενης φάσης 1 M PB pH = 1.3:

$$(\delta) y(t) = -61.461 * e^{-0.22581t} + 68.46$$

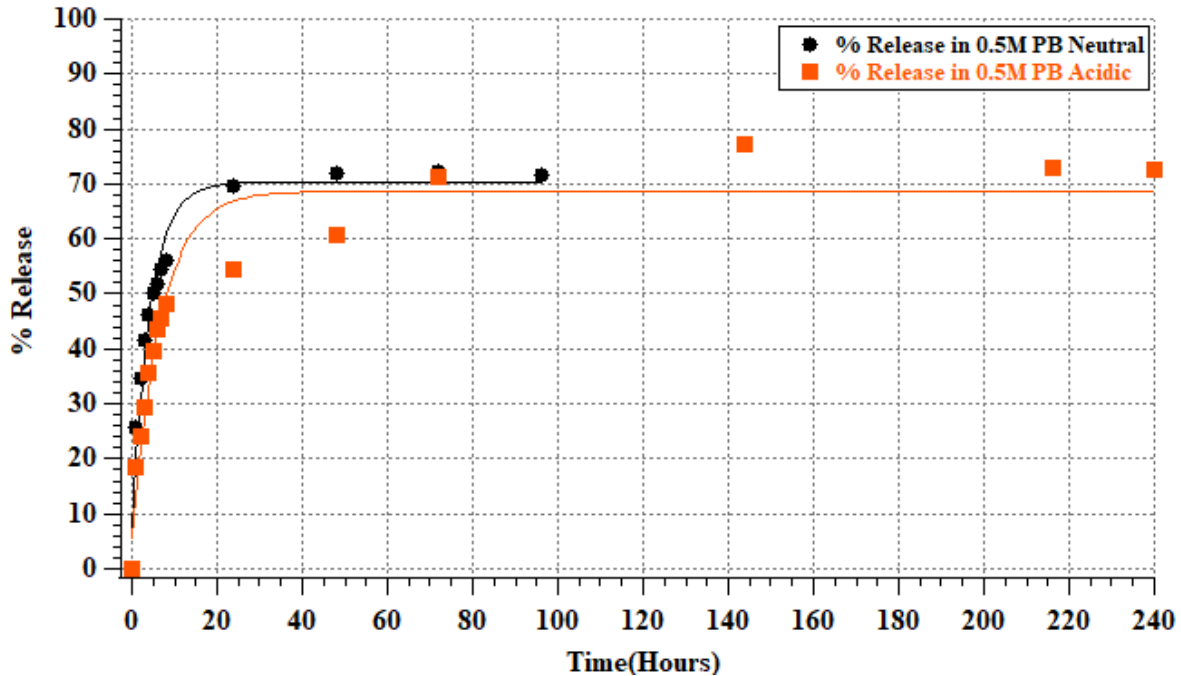
Στον **Πίνακα 10** αναπαριστώνται συγκεντρωτικά οι χαρακτηριστικές σταθερές για κάθε σύστημα μετά από την κινητική τους ανάλυση.

Πίνακας 10. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 8.

Υπερκείμενη φάση	Initial rate ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Plateau BP (%)	t_p (hours)	$t_{1/2}$ (hours)
Απιονισμένο νερό	0.96	70	47.7	11.6
0.25 M PB	1.91	70	12.3	4.2
0.5 M PB	1.78	69	13.3	4.0
1 M PB	2.11	68	7.1	2.6

Κατόπιν, εξετάστηκε αν η αποδέσμευση του ETID σε 0.5 M PB σε όξινης και ουδέτερης συνθήκες, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με την αποδέσμευση σε υδατική φάση απουσία ρυθμιστικού διαλύματος (Διάγραμμα 7). Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενες φάσεις 50 mL που αποτελούνταν από 0.5 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) ρυθμισμένα σε pH = 1.3 ή pH = 7.4. Συγκεκριμένα, αναπαριστάται η % αποδέσμευση συναρτήσει του χρόνου (ώρες) με μαύρο χρώμα για την απελευθέρωση του ETID σε ουδέτερης συνθήκες, και με πορτοκαλί χρώμα σε όξινης συνθήκες. Αντίστοιχα, με την αποδέσμευση σε απιονισμένο νερό απουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων, στις ουδέτερης συνθήκες παρατηρήθηκε γρηγορότερη αρχική αποδέσμευση αλλά η διαφοροποίηση τους ήταν μικρότερη. Συγκεκριμένα, στις ουδέτερης συνθήκες αποδέσμευσης παρουσία 0.5 M PB το σύστημα εμφάνισε αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης **1.91 $\mu\text{mol}/\text{min}$** , χρόνο ημιζωής περίπου 2.5 ώρες και χρειάστηκε περίπου 7 ώρες να φτάσει σε πλατώ. Από την άλλη πλευρά, στην υπερκείμενη φάση 0.5 M PB σε όξινης συνθήκες προσδιορίστηκε αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης **1.78 $\mu\text{mol}/\text{min}$** , χρόνο ημιζωής περίπου 4 ώρες και χρειάστηκε περίπου 13 ώρες να φτάσει σε πλατώ. Το συνολικό ποσοστό του ETID

που αποδεσμεύτηκε από τις υδρογέλες ήταν παραπλήσιο της αποδέσμευσης του σε υδατική φάση απουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων.



Διάγραμμα 9. Αποδέσμευση (%) του ETID από 3% Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) υδρογέλες σε 50 mL υπερκείμενη φάση 0.5M PB pH = 1.3 (πορτοκαλί σημεία) και pH = 7.4 (μαύρα σημεία). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα και διεξάχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενης φάσης 0.5 M PB pH = 1.3:

$$y(t) = -62.925 * e^{-0.14958t} + 68.67$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση 0.5 M PB pH = 7.4:

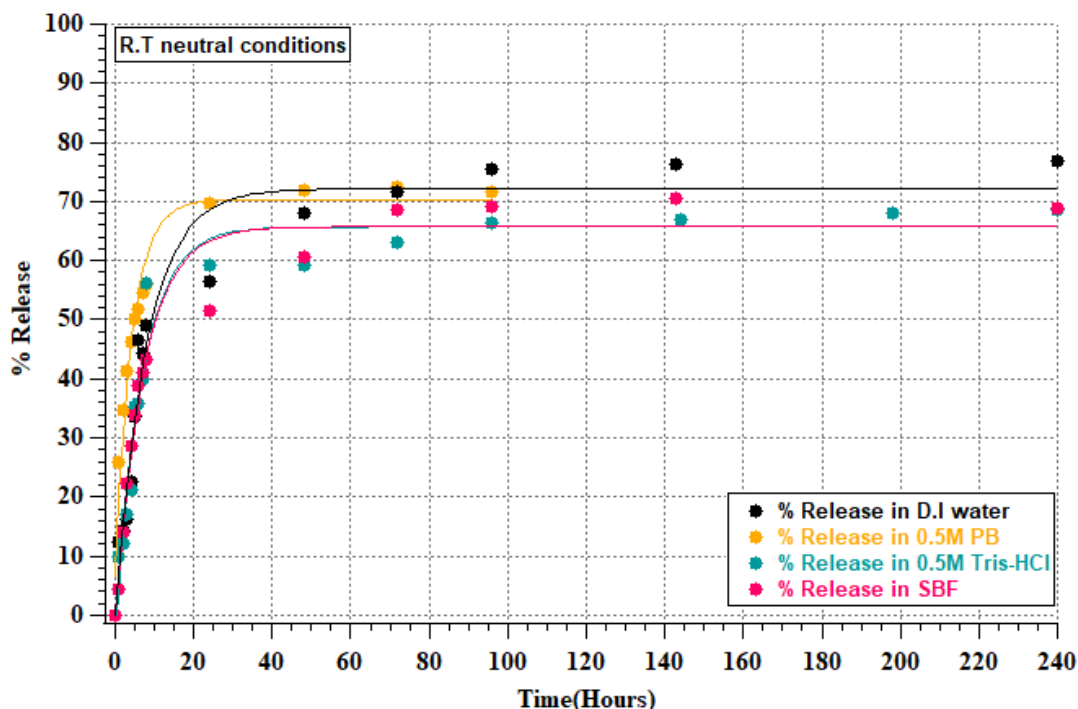
$$y(t) = -63.581 * e^{-0.23433t} + 70.308$$

Πίνακας 11. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 9.

pH Υπερκείμενης φάσης (0.5 M PB)	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
1.3	1.78	69	13.3	4.0
7.4	1.91	70	6.6	2.5

Η παρατήρηση αύξησης του αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης του ETID, όταν η υδρογέλη εκτέθηκε σε 50 mL υπερκείμενη φάση από 0.5 M PB (pH = 7.4), έδωσε το έναυσμα για την μελέτη της μεταβολής του κινητικού προφίλ του ETID σε διαφορετικής σύστασης υδατικές φάσεις (ουδέτερες συνθήκες). Στο **Διάγραμμα 10** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα των μελετών αποδέσμευσης, όταν υδρογέλες 3 % w/w Laponite[®] /300 mg ETID (pH = 7) εκτέθηκαν σε υπερκείμενες φάσεις (50 mL) που αποτελούταν από: (α) 0.5 M PB (κίτρινο χρώμα), (β) 0.5 M Tris-HCl (γαλάζιο χρώμα), (γ) Διάλυμα που προσομοιάζει την ιοντική σύσταση του πλάσματος του αίματος (**SBF** με ροζ χρώμα). Επιπρόσθετα, περιλαμβάνονται (με μαύρο χρώμα) τα αποτελέσματα της αποδέσμευσης σε απιονισμένο νερό, ως σύστημα αναφοράς.

Σε όλα τα διαφορετικά υδατικά συστήματα που εκτέθηκαν οι υδρογέλες παρατηρήθηκε ελάχιστα αυξημένος αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης (**Πίνακας 12**), συγκριτικά με την αποδέσμευση σε απιονισμένο νερό. Η τιμή της % αποδέσμευσης του πλατώ για την μελέτη σε 0.5 M PB ήταν παραπλήσια με το σύστημα αναφοράς, ενώ εμφάνισε μειωμένο χρόνο ημιζωής (2.5 ώρες) και χρόνο που χρειαζόταν το σύστημα για να φτάσει σε πλατώ (περίπου 7 ώρες). Από την άλλη πλευρά, η αποδέσμευση σε 0.5 M Tris-HCl και σε SBF εμφάνισε ελάχιστη μείωση στην συνολική τιμή % αποδέσμευσης, όπου το σύστημα έφτανε σε πλατώ (66 %). Παράλληλα, για τα συγκεκριμένα δύο συστήματα (0.5 M Tris-HCl και SBF) ο χρόνος ημιζωής και ο χρόνος που χρειαζόταν το σύστημα να φτάσει σε πλατώ ήταν παραπλήσιος με το σύστημα αναφοράς.



Διάγραμμα 10. Αποδέσμευση (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) στις εξής υπερκείμενες φάσεις (50 mL, ουδέτερες συνθήκες): (α) Απιονισμένο νερό (μαύρο χρώμα), (β) 0.5 M PB (κίτρινο χρώμα), (γ) 0.5 M Tris-HCl (γαλάζιο χρώμα) και (δ) SBF (ροζ χρώμα). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα και διεξάχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού pH = 7.3:

$$(\alpha) y(t) = -72.18 * e^{-0.12531t} + 72.149$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση 0.5 M PB pH = 7.4:

$$(\beta) y(t) = -63.581 * e^{-0.23433t} + 70.308$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση 0.5 M Tris-HCl pH = 7.3

$$(\gamma) y(t) = -67.997 * e^{-0.14502t} + 65.708$$

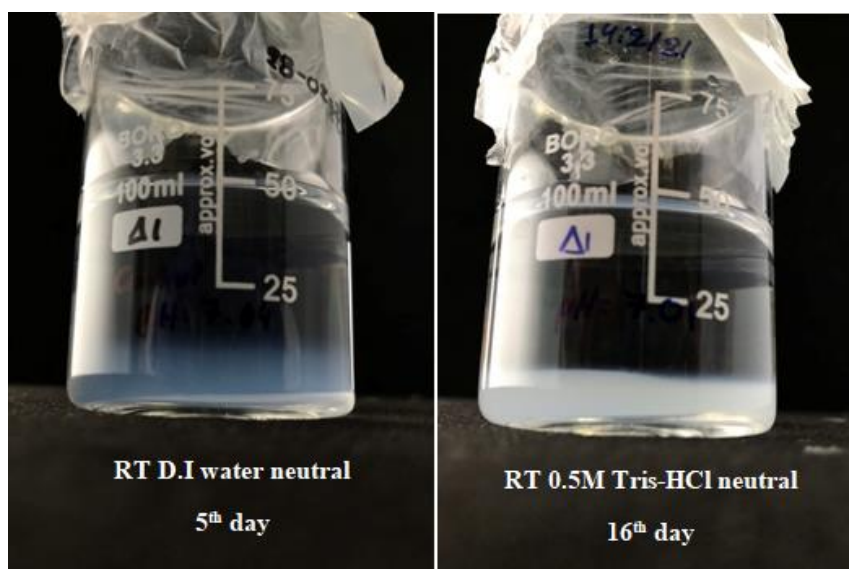
Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση SBF με pH = 7.5:

$$(\delta) y(t) = -66.785 * e^{-0.13826t} + 65.736$$

Πίνακας 12. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 10.

Υπερκείμενη φάση	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
Απιονισμένο νερό	1.64	72	16.6	5.5
0.5M PB	1.91	70	6.6	2.5
0.5M Tris-HCl	1.78	66	13.1	5.0
SBF	2.16	66	14.2	5.1

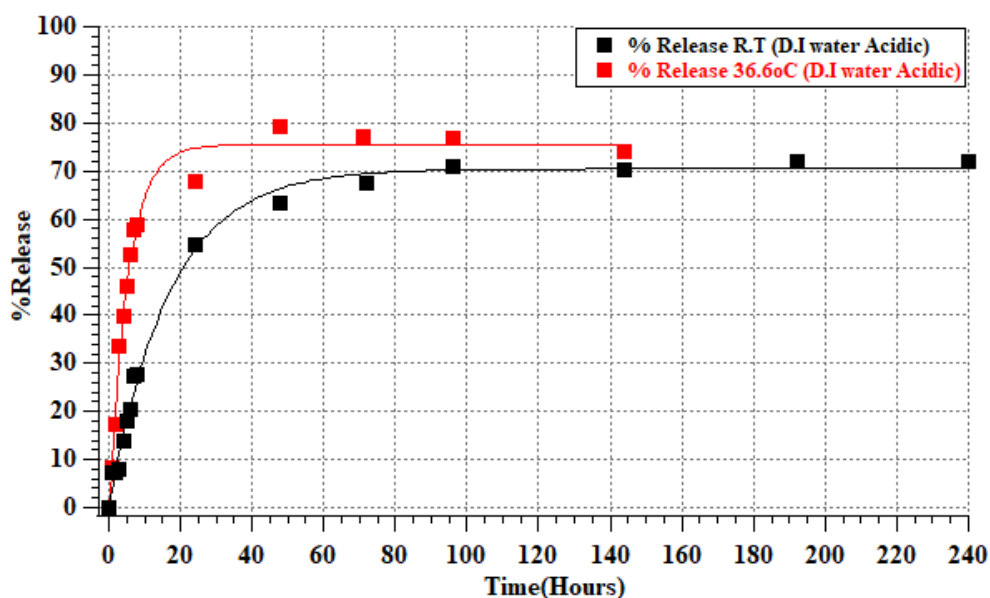
Σε όλα τα συστήματα που πραγματοποιήθηκαν μελέτες αποδέσμευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ή SBF, η υδρογέλη στο τέλος των μελετών, παρέμενε σταθερή και οι φάσεις ήταν διακριτές. Σε αντίθεση με την αποδέσμευση σε απιονισμένο νερό σε ουδέτερες συνθήκες, όπου η υδρογέλη διογκωνόταν και στο πέρας των πειραμάτων συγχωνευόταν με την υδατική φάση. Στην **Εικόνα 36** φαίνεται η διόγκωση της υδρογέλης από την 5^η ημέρα των μελετών αποδέσμευσης σε απιονισμένο νερό, ενώ η υδρογέλης που υποβλήθηκε σε 0.5 M Tris-HCl παρέμεινε σταθερή μέχρι και την 16^η ημέρα που τερματίστηκε το πείραμα.



Εικόνα 36. Διόγκωση υδρογέλης 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) όταν εκτίθεται σε απιονισμένο νερό (σε pH 7.4), κάτι που δεν παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται 0.5 M Tris-HCl ως υπερκείμενη φάση. Η υδρογέλη διατήρησε τον όγκο της μέχρι και 16 ημέρες.

4.2.3. Μεταβολή θερμοκρασίας

Στο συγκεκριμένο τμήμα εξετάστηκε το πώς αποκρίνεται το σύστημα της υδρογέλης-ETID όταν αυξάνεται η θερμοκρασία από θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT) σε θερμοκρασία σώματος (36.6 °C). Στο **Διάγραμμα 11** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) σε υδατικές φάσεις απιονισμένου νερού ρυθμισμένου σε pH = 1.3 σε RT (μαύρο χρώμα) και T = 36.6 °C (κόκκινο χρώμα). Η αποδέσμευση σε θερμοκρασία T = 36.6 °C ήταν ταχύτερη, παρουσιάζοντας σχεδόν τριπλάσιο αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης (**2.94 μmol/min**), αυξήθηκε κατά 5 % η συνολική ποσότητα αποδέσμευσης του ETID (75 %), το σύστημα χρειάστηκε περίπου έξι φορές λιγότερο χρόνο για να φτάσει πλατώ (8 ώρες) και ο χρόνος ημιζωής του υποτριπλασιάστηκε (περίπου 4 ώρες). Κάτι που ήταν αναμενόμενο, καθώς ο κύριος μηχανισμός απελευθέρωσης του φαρμάκου από την υδρογέλη είναι μέσω διάχυσης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνεται η κινητική ενέργεια του συστήματος τα μόρια του νερού διαχέονται γρηγορότερα εντός της μήτρας της υδρογέλης και παρασύρουν ταχύτερα το φάρμακο εκτός της υδρογέλης.



Διάγραμμα 11. Κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR/300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού ρυθμισμένη σε pH = 1.3 σε RT (μαύρα σημεία) και T = 36.6 °C (κόκκινα σημεία). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 1.3 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (R.T.):

$$y(t) = -70.203 * e^{-0.059307t} + 70.441$$

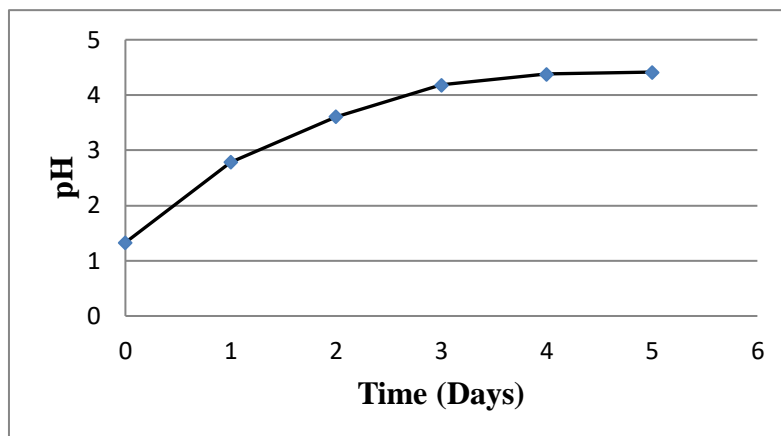
Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 1.3 σε T = 36.6 °C:

$$y(t) = -78.675 * e^{-0.19577t} + 75.442$$

Πίνακας 13. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 11.

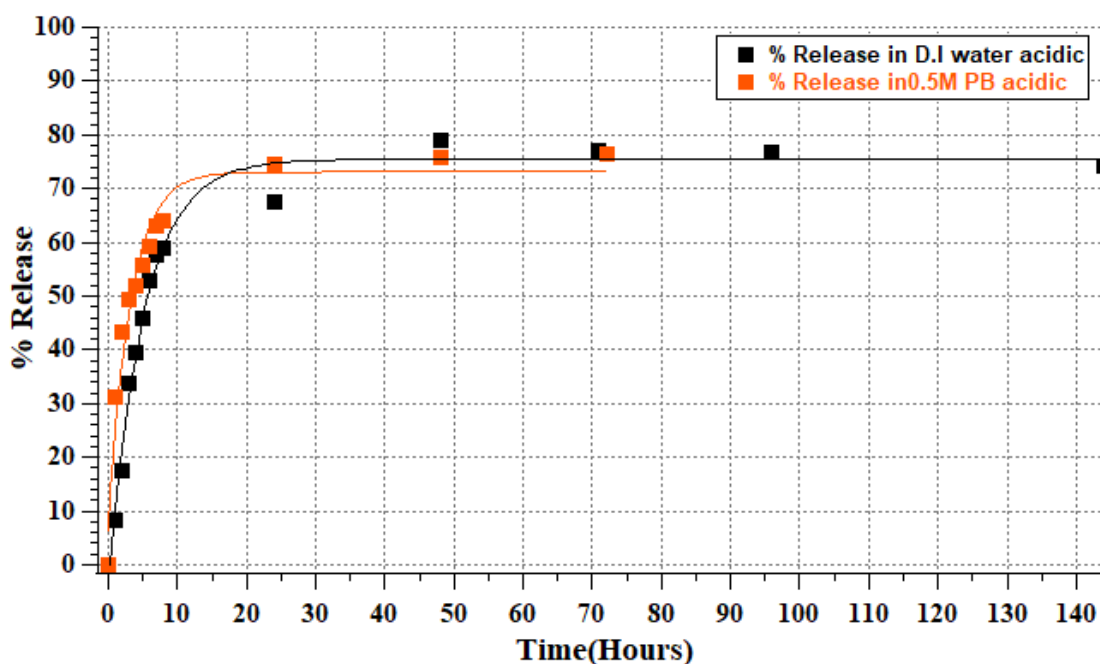
T (°C)	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
R.T.	0.96	70	47.7	11.6
36.6	2.94	75	8.1	3.8

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε T = 36.6 °C, παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβολή του pH της υπερκείμενης φάσης όπως αναπαριστάται στο **Διάγραμμα 12**. Επιπρόσθετα, στο τέλος των μελετών, παρατηρήθηκε κροκίδωση και ανομοιογένεια εντός των υδρογελών. Γεγονός που υποδηλώνει την μείωση του pH των υδρογελών, που επηρεάζει τον τρόπο αλληλεπίδρασης των σωματιδίων Laponite[®] και κατά επέκταση την μορφολογία της υδρογέλης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [64] σε όξινες συνθήκες (pH < 7) η υδρογέλη αποσταθεροποιείται και αντιδρά με οξέα, δίνοντας ασταθές άμορφο προϊόν. Όπως παρατηρήθηκε στις μελέτες χημικής σταθερότητας της υδρογέλης σε όξινη υπερκείμενη φάση πραγματοποιείται απελευθέρωση ιόντων Mg²⁺ από τα νανοσωματίδια, που επάγουν την αύξηση των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων προάγοντας τη συσσωμάτωσή τους.



Διάγραμμα 12. Μεταβολή του pH της υπερκείμενης υδατικής φάσης απιονισμένου νερού (ρυθμισμένη σε pH = 1.3) στις μελέτες αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε T = 36.6 °C.

Προκειμένου λοιπόν να εξακριβωθεί το ότι η αύξηση της ταχύτητας αποδέσμευσης οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας και όχι στην αύξηση του pH, μελετήθηκε η αποδέσμευση του ETID σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M PB. Στο **Διάγραμμα 13** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) σε 0.5 M BP (pH = 1.3) υπερκείμενη φάση και T = 36.6 °C (πορτοκαλί χρώμα) και απουσία ρυθμιστικού (μαύρο χρώμα). Προσδιορίστηκε παραπλήσια τιμή αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης (**2.97 $\mu\text{mol}/\text{min}$**) συγκριτικά με το σύστημα αναφοράς, κάτι που υποδηλώνει ότι η επιτάχυνση της απελευθέρωσης οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας και όχι στη μεταβολή του pH του συστήματος αναφοράς. Στο **Διάγραμμα 14** φαίνεται ότι η μεταβολή του pH ήταν πολύ μικρότερη, παρόλα αυτά η αποδέσμευση ήταν γρηγορότερη. Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας του χαρακτηριστικούς χρόνους του κινητικού προφίλ των δύο συστημάτων, παρατηρήθηκε υποδιπλασιασμός του χρόνου ημιζωής (2 ώρες) και του απαραίτητου χρόνου για να φτάσει σε πλατώ (4 ώρες). Αυτό συμφωνεί με τα αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 0.5 M BP σε όξινη συνθήκη, όπου οι χαρακτηριστικοί χρόνοι κινητικής ανάλυσης ήταν μικρότεροι απουσία ρυθμιστικού διαλύματος.



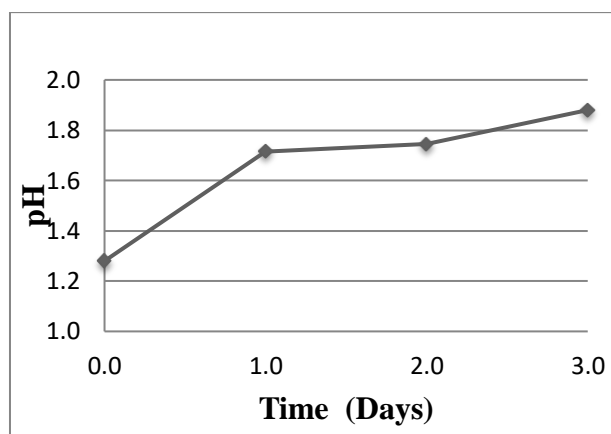
Διάγραμμα 13. Κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε όξινη υπερκείμενη φάση (pH = 1.3) 0.5 M PB (πορτοκαλί σημεία) και απουσία ρυθμιστικού (Control, μαύρα σημεία) σε T = 36.6 °C. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση 0.5 M PB (pH = 1.3) σε T = 36.6 °C:

$$y(t) = -66.611 * e^{-0.31384t} + 73.093$$

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 13.

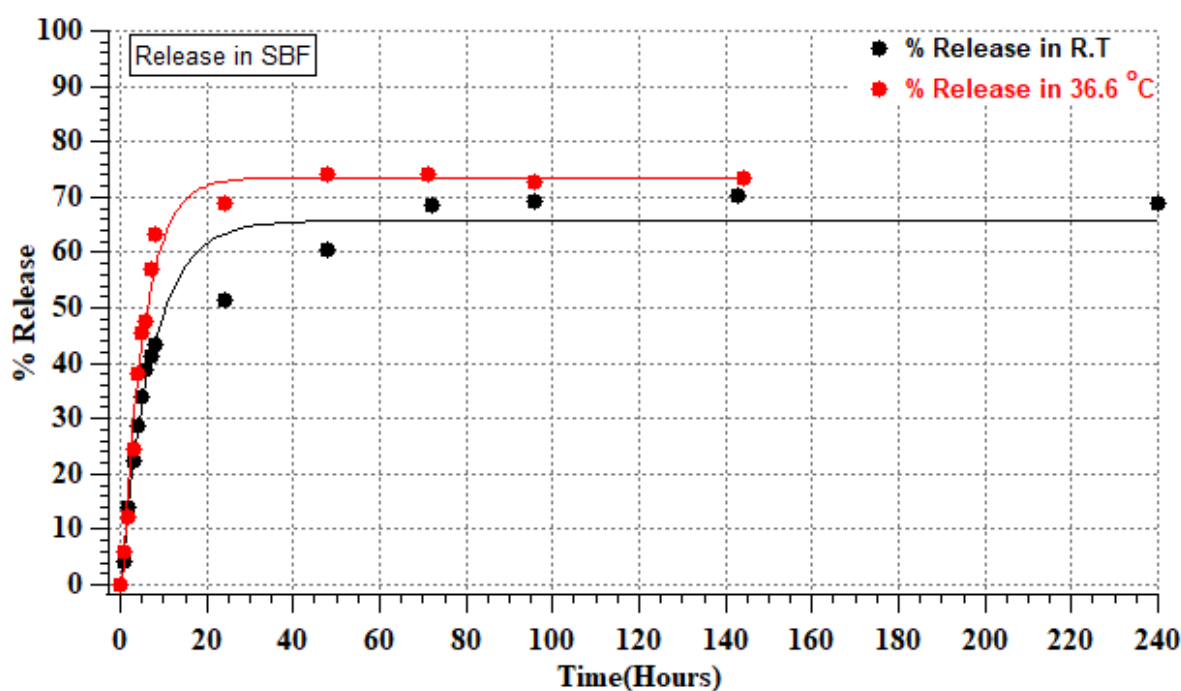
Υπερκείμενη φάση	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
D.I water	2.94	75	8.1	3.8
0.5M BP	2.97	73	4	1.9



Διάγραμμα 14. Μεταβολή του pH της υπερκείμενης υδατικής φάσης 0.5 M PB (ρυθμισμένη σε pH = 1.28) στις μελέτες αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε T = 36.6 °C.

Στην μελέτες αποδέσμευσης του ETID σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M PB, δεν παρατηρήθηκε συσσωμάτωση των σωματιδίων της υδρογέλης. Στη βιβλιογραφία [64] έχουν γίνει αναφορές για το ότι η ύπαρξη πυροφωσφορικού στο σύστημα εμποδίζει την συσσωμάτωση του υλικού λόγω ανάπτυξης στερικών απωστικών αλληλεπιδράσεων που οδηγεί στην απομάκρυνση των σωματιδίων. Το πυροφωσφορικό στην πλήρως αποπρωτονιωμένη μορφή του μπορεί να σχηματίσει 4 δεσμούς υδρογόνου με τα νανοσωματίδια, που επάγει την μείωση των απωστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων επιφανειών και παράλληλη προστασία των θετικά φορτισμένων άκρων. Το σύστημα της υδρογέλης με την υπερκείμενη φάση αποτελεί ένα δυναμικό σύστημα, και η υδρογέλη επιτρέπει την είσοδο και έξοδο χημικών ειδών. Τα φωσφορικά αποτελούν προϊόντα διάσπασης του πυροφωσφορικού, η προσρόφηση τους στην μήτρα της υδρογέλης πιθανώς προκαλεί το ίδιο φαινόμενο σταθεροποιώντας την και κατά επέκταση εμποδίζοντας την συσσωμάτωση των σωματιδίων του υλικού. Παράλληλα ως ευκίνητα φορτισμένα ιόντα μπορούν να αποσβέσουν το μερικό θετικό φορτίο των πλευρών των νανοδισκίων. Στην περίπτωση που το αρνητικά φορτισμένο ETID αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τις θετικά φορτισμένες άκρες, η μερική εξουδετέρωση του θετικού φορτίου θα οδηγούσε ασθενέστερη αλληλεπίδραση με το φάρμακο. Για αυτόν το λόγο, πιθανώς οφείλεται και ο αυξημένος ρυθμός αποδέσμευσης του ETID παρουσία φωσφορικών στην υπερκείμενη φάση. Ως φυσικό επακόλουθο, διευκολύνεται η απελευθέρωση του φαρμάκου.

Αντίστοιχα, εξετάστηκε το αν επιταχύνεται η αποδέσμευση του ETID από τις υδρογέλες Laponite® XL-21 XR σε ουδέτερες συνθήκες, όταν αυξάνεται η θερμοκρασία. Η μελέτη επιρροής της αύξησης της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διαλύματα SBF για τον λόγο ότι, σε χαμηλής ιονικής ισχύς υπερκείμενη φάση (απιονισμένο νερό) συγχωνεύονταν πλήρως οι δύο φάσεις (με γρηγορότερα ρυθμό από τα πειράματα σε θερμοκρασία δωματίου). Στο **Διάγραμμα 15** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® /300 mg ETID (pH = 7) σε υδατικό διάλυμα SBF (pH = 7.4) σε T = 36.6 °C (κόκκινη καμπύλη) και σε T = 20 °C (μαύρη καμπύλη, Control). Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αύξηση του αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης (**2.67 $\mu\text{mol}/\text{min}$**) και περίπου 8 % αύξηση του συνολικού ποσοστού αποδέσμευσης του ETID (74 %) συγκριτικά με το σύστημα αναφοράς. Παράλληλα, προσδιορίστηκε ότι το σύστημα χρειάστηκε περίπου υποδιπλάσιο χρόνο να φτάσει σε πλατώ (8 ώρες) και ο χρόνος ημιζωής του ήταν περίπου 4 ώρες.



Διάγραμμα 15. Κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7.4) SBF σε T = 36.6 °C (κόκκινη καμπύλη) και T = 20 °C (Control, μαύρα σημεία).

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση SBF pH = 7.49 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C):

$$y(t) = -66.785 \cdot e^{-0.13826t} + 65.736$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση SBF pH = 7.44 σε T = 36.6 °C:

$$y(t) = -79.815 \cdot e^{-0.19577t} + 73.543$$

Πίνακας 15. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 15.

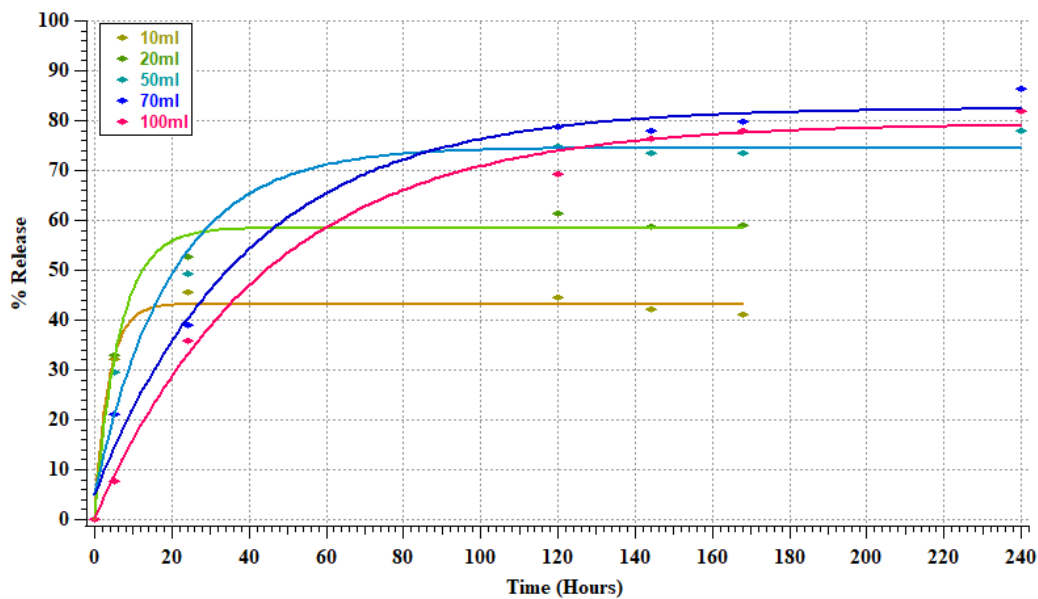
T (°C)	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
20.0	2.16	66	14.2	5.1
36.6	2.67	74	7.9	4.0

4.2.4. Μεταβολή Όγκου υπερκείμενης φάσης

Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε το πώς επηρεάζεται η συνολική τιμή της αποδέσμευσης (%) του ETID σε διαφορετικού όγκου υπερκείμενη φάση. Στο **Διάγραμμα 16** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laronite®/ 300 mg ETID (pH = 7) σε υδατικό διάλυμα 0.5 M PB (pH = 1.3) συνολικού όγκου (α) 10 mL (κίτρινη καμπύλη), (β) 20 mL (πράσινη καμπύλη), (γ) 50 mL (γαλάζια καμπύλη), (δ) 70 mL (μπλε καμπύλη) και (ε) 100 mL (ροζ καμπύλη). Παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της αποδέσμευσης της συνολικής % ποσότητας ETID, όσο αυξανόταν ο όγκος όπως αναπαριστάται στο **Διάγραμμα 17**. Η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται λόγω ωσμωτικής πίεσης, που προκαλεί τα μόρια του διαλύτη της υπερκείμενης φάσης να εισχωρήσουν στο δίκτυο της υδρογέλης και να παρασύρουν το ETID εκτός, έως ότου το σύστημα των δύο φάσεων φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος της υπερκείμενης φάσης τόσο μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου μπορεί να μεταφερθεί μέχρι το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι παρατηρήθηκε στα 100 mL (79 %) μικρότερη συνολική % αποδέσμευση του ETID συγκριτικά με τα 70 mL (83 %), αντίστροφα από το αναμενόμενο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του ETID, πραγματοποιούσαν δειγματοληψία 350 μL από την υπερκείμενη φάση. Στην περίπτωση των 100 mL το διάλυμα είναι αρκετά αραιό και η ποσοτικοποίηση του με το πρωτόκολλο που

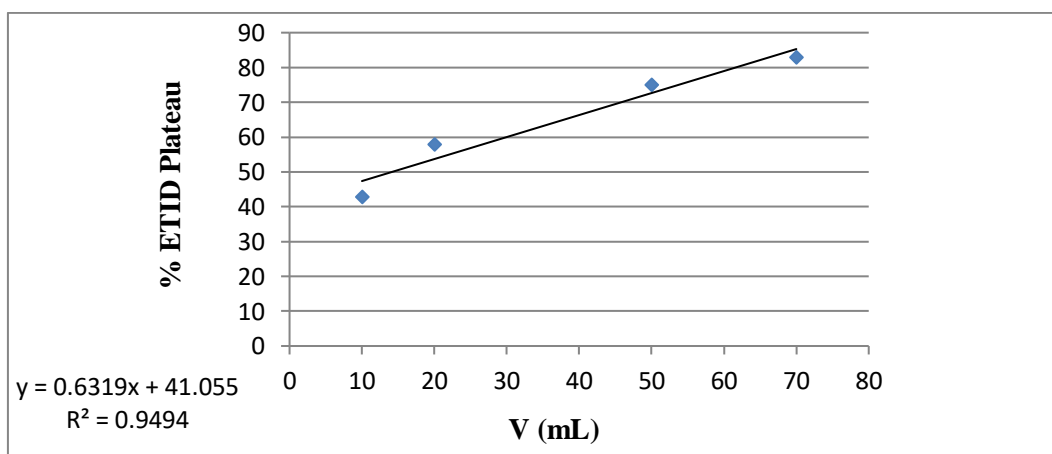
ακολουθήθηκε στις περισσότερες μελέτες αποδέσμευσης ενέχει μεγαλύτερο πειραματικό σφάλμα.



Διάγραμμα 16. Κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Iap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε όξινη υπερκείμενη φάση (pH = 1.3) που αποτελείται από 0.5 M PB διαφορετικού όγκου. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 16. Συνολική % αποδέσμευση του ETID (% Plateau BP) σε συνάρτηση με τον όγκο της υπερκείμενης φάσης.

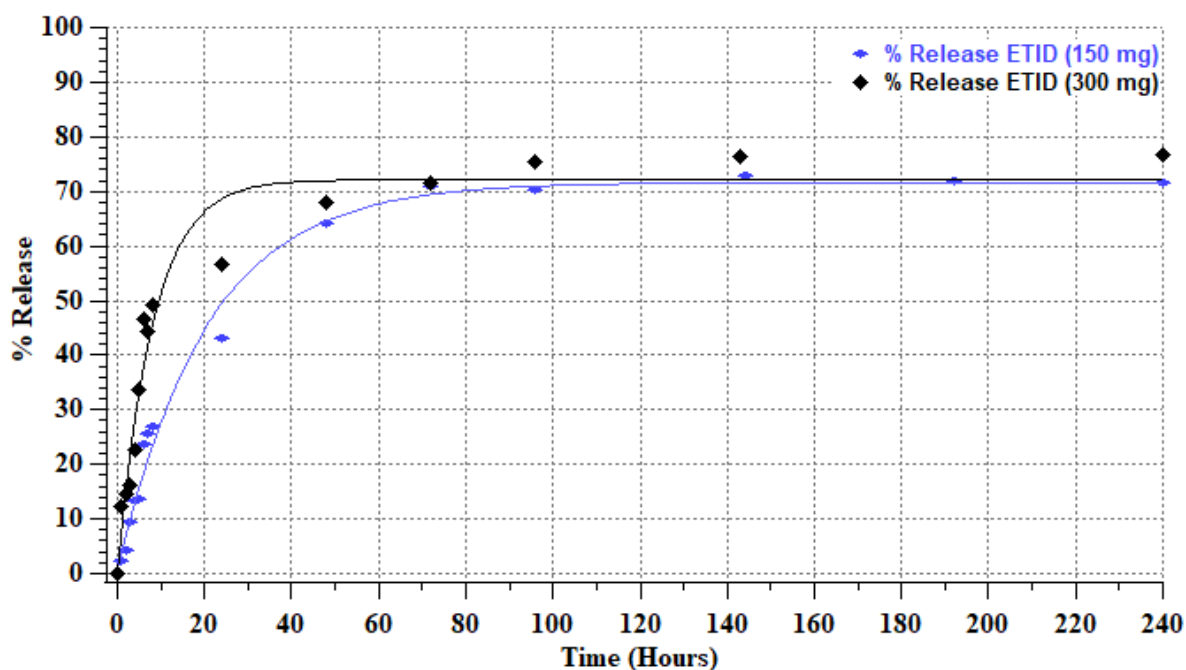
V _{υπερκείμενης} (mL)	10	20	50	70	100
Plateau BP (%)	43	58	75	83	79



Διάγραμμα 17. Γραμμική συσχέτιση συνολικής % αποδέσμευσης του ETID σε συνάρτηση με τον όγκο της υπερκείμενης φάσης.

4.2.5. Μεταβολή συγκέντρωσης του ETID

Στο **Διάγραμμα 18** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite® / **150 mg** ETID (pH = 7) και 3 % w/w Laponite® / **300 mg** ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι με τον υποδιπλασιασμό της αρχικής ποσότητας του ETID στην υδρογέλη, υποτριπλασιάστηκε ο αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης του ETID (**0.55 $\mu\text{mol}/\text{min}$**) ο χρόνος ημιζωής αυξήθηκε σε περίπου 14 ώρες και χρειάστηκε 4 φορές περισσότερο χρόνο για να φτάσει σε πλατώ (περίπου 63 ώρες). Κάτι που ήταν αναμενόμενο, καθώς όσο πιο μικρή η διαφορά της συγκέντρωσης του ETID μεταξύ των δύο φάσεων τόσο πιο αργά πραγματοποιείται διάχυση του φαρμάκου από την υδρογέλη (υψηλή συγκέντρωση) στην υδατική φάση (χαμηλή συγκέντρωση).



Διάγραμμα 18. Αποδέσμευση (%) του ETID από υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) και 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR / 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού pH = 7.3:

$$y(t) = -72.18 \cdot e^{-0.12531t} + 72.149$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.45 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος:

$$y(t) = -70.879 \cdot e^{-0.048048t} + 71.64$$

Πίνακας 17. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 18.

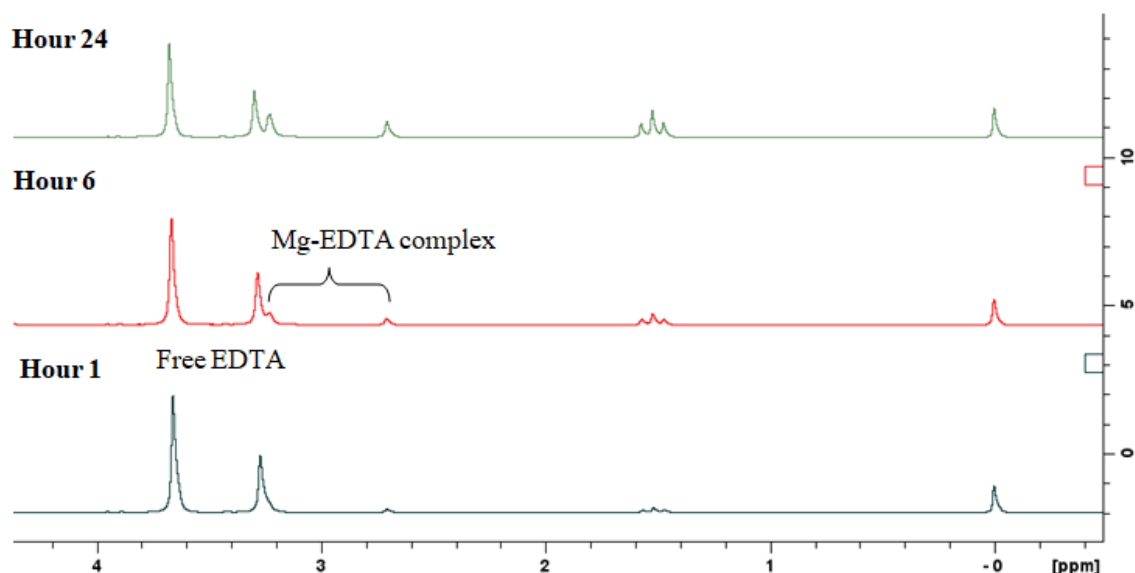
Περιεκτικότητα σε ETID (mg)	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
150	0.55	72	63.4	14.2
300	1.64	72	16.6	5.5

4.3. Προσδιορισμός τρόπου αλληλεπίδρασης ETID με το δίκτυο της υδρογέλης Laponite® XL-21 XR

Ο ρυθμός αποδέσμευσης του ETID εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει με το δίκτυο της υδρογέλης και από άλλα πιθανά χημικά είδη που βρίσκονται στο σύστημα. Στα συγκεκριμένα πειράματα επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης του ETID με το δίκτυο της υδρογέλης, εισάγοντας στο σύστημα το χηλικό υποκαταστάτη EDTA. Σε pH = 7 (τιμή pH υδρογέλης) το ETID είναι διπλά αποπρωτονιωμένο και μπορεί να αλληλεπιδράσει ηλεκτροστατικά με τα θετικά άκρα των σωματιδίων, να σχηματίσει δεσμούς-H ή να συναρμοστεί με τα κέντρα Mg²⁺. Στην περίπτωση που το ETID συναρμόζεται με τα ιόντα Mg²⁺, η εισαγωγή του EDTA στο σύστημα (που εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια συναρμογής με τα ιόντα Mg²⁺), θα ήταν αναμενόμενο να αυξήσει το ρυθμό αποδέσμευσης του ETID. Υπολογίζοντας τη θεωρητική συνολική περιεκτικότητα ιόντων Mg²⁺ στα 0.3 g Laponite® που χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστούν οι υδρογέλες και γνωρίζοντας ότι το EDTA αντιδρά σε αναλογία 1:1 με τα ιόντα Mg²⁺, επιχειρήθηκε να παρασκευαστούν υδρογέλες που περιείχαν ETID και EDTA σε αναλογία 1:1 (εντός του δικτύου και εντός της υπερκείμενης φάσης).

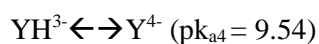
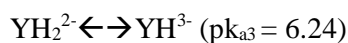
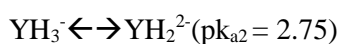
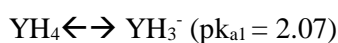
Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε ETID και EDTA (1:1) σε ίση ποσότητα με την θεωρητική συγκέντρωση των ιόντων Mg²⁺, παρατηρήθηκε το ότι η υδρογέλη δεν έπηξε πλήρως, αλλά παρέμενε στην μορφή πηκτού κολλοειδούς διαλύματος. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι σε υψηλή περιεκτικότητα το EDTA, ως ένα ογκώδες μόριο, το οποίο σε pH =

7 είναι τριπλά αποπρωτονιομένο, αλληλεπιδρά απωστικά με τα σωματίδια απομακρύνοντας τα μεταξύ τους. Γεγονός, που οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της υδρογέλης και κατά επέκταση την αδυναμία πήξης της. Στο **Διάγραμμα 19** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite[®]/ 300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υδατικό διάλυμα που περιείχε 1 mL EDTA (1.46 mM) ρυθμισμένο σε pH = 7.41 (πράσινη καμπύλη), και απουσία EDTA (Σύστημα αναφοράς, πορτοκαλί καμπύλη). Επιπρόσθετα, με μωβ χρώμα παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση της απορρόφησης του EDTA από την υπερκείμενη φάση στην υδρογέλη. Το EDTA, ως συμμετρική ένωση, έχει δύο χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα πρωτονίου: (α) $\delta = 3.66$ ppm για τα 8 μεθυλενικά πρωτόνια που βρίσκονται δίπλα στις καρβοξυλικές ομάδες και (β) $\delta = 3.2$ ppm για τα 4 πρωτόνια του αιθανίου. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο συγκεντρωτικό **Φάσμα 1**, από την 6^η ώρα μελέτης του συστήματος εμφανίζεται όμως περίπου στα 3.23 ppm και καινούργια κορυφή στα 2.71 ppm. Οι συγκεκριμένες κορυφές αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές για τον σύμπλοκο Mg-EDTA [63], ως φυσικό επακόλουθο μετά την 6^η ώρα το EDTA που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια της υδρογέλης αποσπά ιόντα Mg^{2+} από την μικροδομή του υλικού, υποβοηθώντας την αποικοδόμηση του.

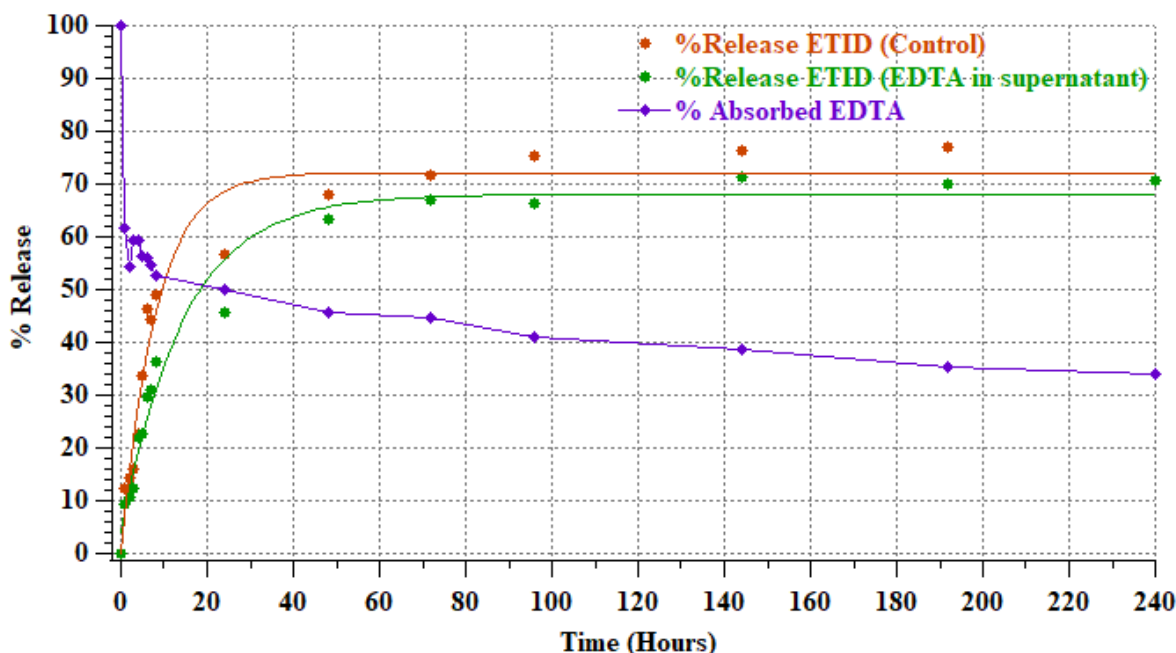


Φάσμα 1. Συγκεντρωτικά φάσματα ¹H NMR για τις μελέτες των πειραμάτων υδρογέλης 3 % w/w Laponite[®]/ 300 mg ETID (pH = 7) σε υδατικό διάλυμα που περιείχε EDTA (1.46 mM) ρυθμισμένο σε pH = 7.41 για την 1^η ώρα, 6^η ώρα και 24^η ώρα.

Στο **Διάγραμμα 19** φαίνεται το ότι η παρουσία του EDTA στην υπερκείμενη φάση παρεμποδίζει την απελευθέρωση του ETID. Ειδικότερα, μειώθηκε ο αρχικός ρυθμός απελευθέρωσης σε **1.41 $\mu\text{mol}/\text{min}$** , το συνολικό ποσοστό του ETID που αποδεσμεύτηκε μειώθηκε κατά 4 %. Επιπρόσθετα, το σύστημα εμφάνισε χρόνο ημιζωής περίπου 9 ώρες και χρειάστηκε περίπου 40 ώρες για να φτάσει σε ισορροπία. Το γεγονός ότι η παρουσία του EDTA δεν αυξάνει τον ρυθμό της αποδέσμευσης του ETID, υποδηλώνει ότι είτε υπάρχουν περισσότερα ιόντα Mg^{2+} (από τα θεωρητικά) ή ότι το ETID δεν συναρμόζεται με τα μεταλλικά κέντρα μαγνησίου, αλλά αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την υδρογέλη ή μέσω δεσμών-Η. Το EDTA σύμφωνα με τις σταθερές αποπρωτονίωσης του από την βιβλιογραφία [62], σε $\text{pH} = 7.4$ υπερισχύει η τριπλά αποπρωτονιωμένη μορφή του.



Η αποδέσμευση του ETID από την υδρογέλη και η απορρόφηση του EDTA από την υπερκείμενη φάση, είναι δύο φαινόμενα που συμβαίνουν ταυτόχρονα. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, στην διεπιφάνεια των δύο φάσεων το τριπλά αρνητικά φορτισμένο EDTA αναπτύσσει απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το διπλά αποπρωτονιωμένο ETID, εμποδίζοντας την αποδέσμευση του στην υπερκείμενη φάση.



Διάγραμμα 19. Κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης (%) του ETID από υδρογέλες 3 % w/w Laponite[®]/300 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υδατικό διάλυμα που περιείχε 1 mL EDTA (1.46 mM) ρυθμισμένο σε pH = 7.41 (πράσινη καμπύλη), και απουσία EDTA (σύστημα αναφοράς, πορτοκαλί καμπύλη). Η μωβ καμπύλη αναφέρεται στην % απορρόφηση του EDTA από την υπερκείμενη φάση. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση (pH = 7.41) που αποτελείται από 50 mL διαλύματος 29.12 mM EDTA σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C):

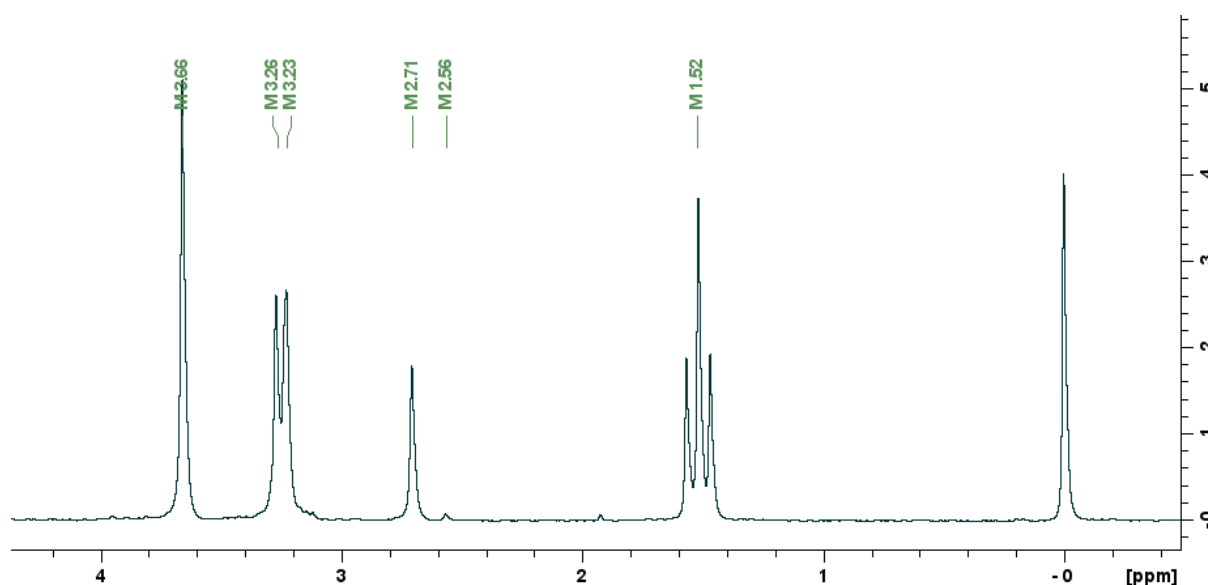
$$y(t) = -63.874 * e^{-0.068284t} + 68.036$$

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 19.

Υπερκείμενη φάση	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
Απιονισμένο νερό	1.64	72	16.6	5.5
29.12 mM EDTA (50 mL)	1.41	68	40.2	9.2

Η παρασκευή σταθερών υδρογελών που περιέχουν ETID:EDTA στις προαναφερθείσες ποσότητες (και σε αναλογία 1:1) ήταν ανεπιτυχής, επομένως, πραγματοποιήθηκε scaledown των ποσοτήτων τους (διατηρώντας όμως την αναλογία στο 1:1), και κατόπιν μελετήθηκε η επιρροή του EDTA όταν ήταν συστατικό της υδρογέλης και όταν ήταν συστατικό της

υπερκείμενης φάσης. Στα πειράματα που το EDTA ήταν συστατικό της υδρογέλης, παρατηρήθηκε αποδέσμευση τόσο του ελεύθερου υποκαταστάτη αλλά και του συμπλόκου Mg-EDTA όπως φαίνεται στο **Φάσμα 2**. Σε αντίθεση με τα πειράματα που το EDTA ήταν συστατικό της υπερκείμενης φάσης, η αποδέσμευση του συμπλόκου Mg-EDTA παρατηρήθηκε από την 1^η ώρα μελετών αποδέσμευσης. Στον **Πίνακα 19** αναφέρονται οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα πρωτονίου των δειγμάτων που λήφθηκαν από την υπερκείμενη φάση της υδρογέλης που περιείχε ETID και EDTA.



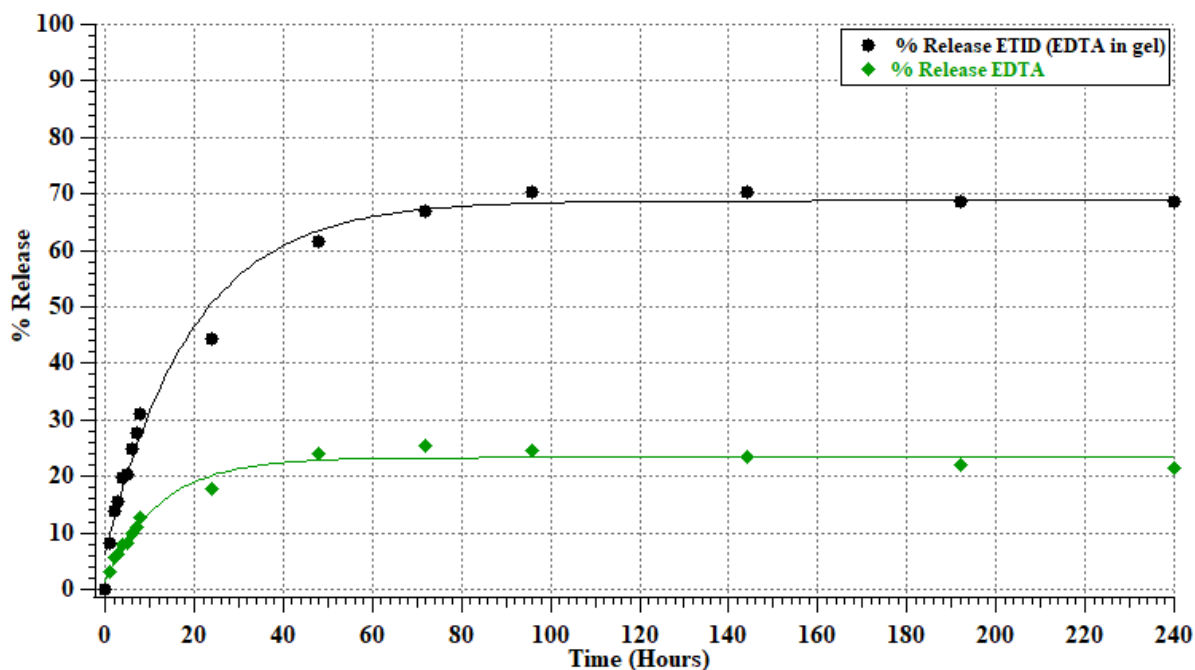
Φάσμα 2. Φάσμα ^1H δείγματος από την υπερκείμενη φάση υδρογέλης (που εμπεριέχει EDTA και ETID).

Πίνακας 19. Ανάθεση κορυφών για το Φάσμα 2.

δ (ppm)	Σήμα
1.52	-CH ₃ - (ETID)
2.56	-CH ₂ CH ₂ - (Ca-EDTA)
2.71	-CH ₂ CH ₂ - (Mg-EDTA)
3.23	CH ₂ -COOH (Mg-EDTA)
3.26	-CH ₂ CH ₂ - (Free EDTA)
3.66	CH ₂ -COOH (Free EDTA)

Στο **Διάγραμμα 20** αναπαριστάται η % αποδέσμευση του ETID (μαύρη καμπύλη) και του ελεύθερου EDTA (πράσινη καμπύλη) από υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ ETID:EDTA (με μειωμένες ποσότητες ETID και EDTA, αλλά σε αναλογία 1:1) σε υπερκείμενη φάση

απιονισμένου νερού (ρυθμισμένο σε pH = 7.4), σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρήθηκε, ότι ο αρχικός ρυθμός αποδέσμευσης του EDTA ($0.16 \mu\text{mol}/\text{min}$) ήταν αρκετά μικρότερος του ETID ($0.51 \mu\text{mol}/\text{min}$), κάτι που υποδηλώνει ότι το EDTA αλληλεπιδρά πολύ ισχυρότερα με το δίκτυο της υδρογέλης. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε ότι απελευθερώνονταν συνολικά περίπου το 23 % της αρχικής ποσότητας του EDTA (στην ελεύθερη μορφή του) και περίπου 11 % ως σύμπλοκο Mg-EDTA. Η αποδέσμευση του EDTA έφτασε σε πλατώ σε 32 ώρες και εμφάνισε χρόνο ημιζωής περίπου 8 ώρες. Η παρουσία συμπλόκων Mg-EDTA στην υπερκείμενη φάση, υποδηλώνει ότι πράγματι σχηματίζεται δεσμός συναρμογής με τον χηλικό υποκαταστάτη EDTA και ότι εν μέρει υποβοηθάει στην αποικοδόμηση του δικτύου της υδρογέλης. Το υπόλοιπο ποσοστό που παρέμεινε εντός της υδρογέλης, ίσως είναι συναρμοσμένο στα υπόλοιπα ιόντα Mg^{2+} ή αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά ή μέσω δεσμών-H με τα σωματίδια του υλικού.



Διάγραμμα 20. Αποδέσμευση (%) του ETID (μαύρη καμπύλη) και του ελεύθερου EDTA (πράσινη καμπύλη) από υδρογέλες 3 % w/w Laponite®/ 150 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ EDTA:ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση (pH = 7.41) που αποτελείται από 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4:

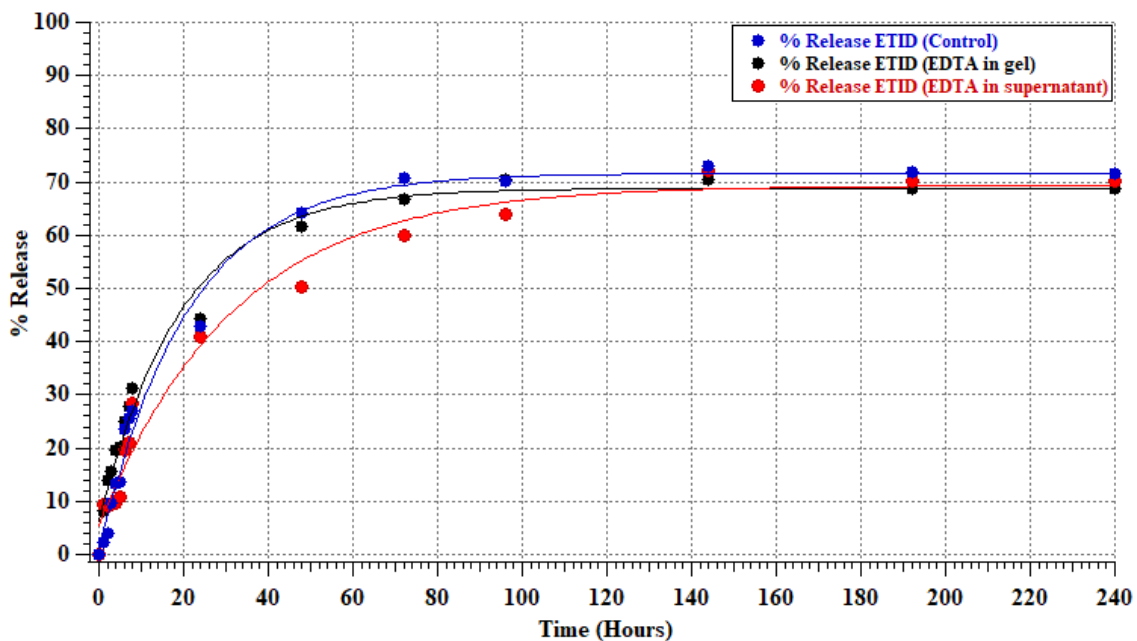
$$\text{ETID: } y(t) = -62.681 * e^{-0.051573t} + 68.803$$

$$\text{EDTA: } y(t) = -21.968 * e^{-0.080645t} + 23.33$$

Πίνακας 20. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 20.

Ένωση	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
ETID	0.51	68	59.3	11.6
EDTA	0.16	23	32.0	7.8

Στο **Διάγραμμα 21** αναπαριστάται η % αποδέσμευση του ETID σε συνάρτηση με τον χρόνο στα εξής συστήματα: (α) υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4), (β) 3 % Lap. XL-21 XR/ETID:EDTA (με μειωμένες ποσότητες ETID και EDTA, αλλά σε αναλογία 1:1) σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4), (γ) υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 14.56 mM EDTA (pH = 7.4). Όπως γίνεται εμφανές στον **Πίνακας 21**, η ύπαρξη του EDTA εντός της υδρογέλης δεν επηρεάζει σημαντικά το κινητικό προφίλ της αποδέσμευσης του ETID. Κατά αυτό τον τρόπο, υποδηλώνεται είτε ότι το ETID αλληλεπιδράει ηλεκτροστατικά με το δίκτυο της υδρογέλης είτε λόγω ύπαρξης διαθέσιμων κέντρων Mg²⁺ (σύμφωνα με τον θεωρητικό υπολογισμό) οι δύο υποκαταστάτες δεν ανταγωνίζονται μεταξύ τους και διαμοιράζονται στα διαθέσιμα μεταλλικά κέντρα Mg²⁺. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την περίπτωση που το EDTA βρισκόταν στην υπερκείμενη φάση, με την διαφορά ότι η αποδέσμευση του ETID ήταν ελαφρώς πιο αργή (για λόγους που αναφέρθηκαν στην ανάλυση για το **Διάγραμμα 19**).



Διάγραμμα 21. Αποδέσμευση (%) του ETID σε συνάρτηση με τον χρόνο στα εξής συστήματα: (α) υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4), (β) 3 % Lap. XL-21 XR/ ETID:EDTA (με μειωμένες ποσότητες ETID και EDTA, αλλά σε αναλογία 1:1) σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4), (γ) υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR /150 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 14.56 mM EDTA (pH = 7.4). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/ 150 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.45 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Control):

$$y(t) = -70.879 * e^{-0.048048t} + 71.64$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/EDTA:ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση (pH = 7.41) που αποτελείται από 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4:

$$\text{ETID: } y(t) = -62.681 * e^{-0.051573t} + 68.803$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/150 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση διαλύματος 14.56 mM EDTA (pH = 7.41).

$$y(t) = -63.97 * e^{-0.031478t} + 69.331$$

Πίνακας 21. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 21.

Σύστημα	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
Control	0.55	72	63.4	14.2

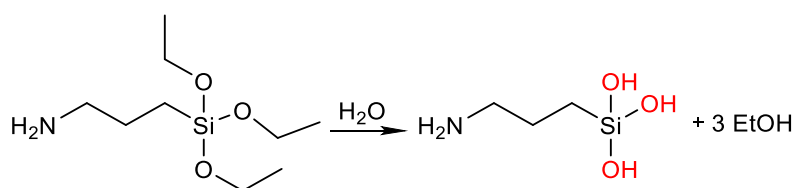
ETID (EDTA in gel)	0.51	69	59.3	11.6
ETID (EDTA in supernatant)	0.31	69	112.4	19.5

4.4. Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογελών Laronite® XL-21 XR και η επιρροή στο κινητικό προφίλ αποδέσμευσης του ETID.

Οι υδρογέλες Laronite® λόγω των εκτεθειμένων ομάδων σιλανόλης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων του αργίλου, μπορούν να υποστούν επιφανειακή τροποποίηση μέσω σιλανοποίησης. Ένας τρόπος για την επίτευξη της επιφανειακής τροποποίησης είναι η προσθήκη αντιδραστηρίων σύζευξης σιλανίου (silane coupling agents) που πραγματοποιούν αντίδραση πρόσδεσης (grafting) στις επιφανειακές σιλανόλες σχηματίζοντας δεσμούς Si-O-Si. Στην συγκεκριμένη ενότητα αναφέρονται δύο αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την επιφανειακή τροποποίηση της υδρογέλης με τρεις διαφορετικές μεθόδους και μελετάται η επίδρασή τους στην ελεγχόμενη αποδέσμευση του ETID από την μήτρα της υδρογέλης.

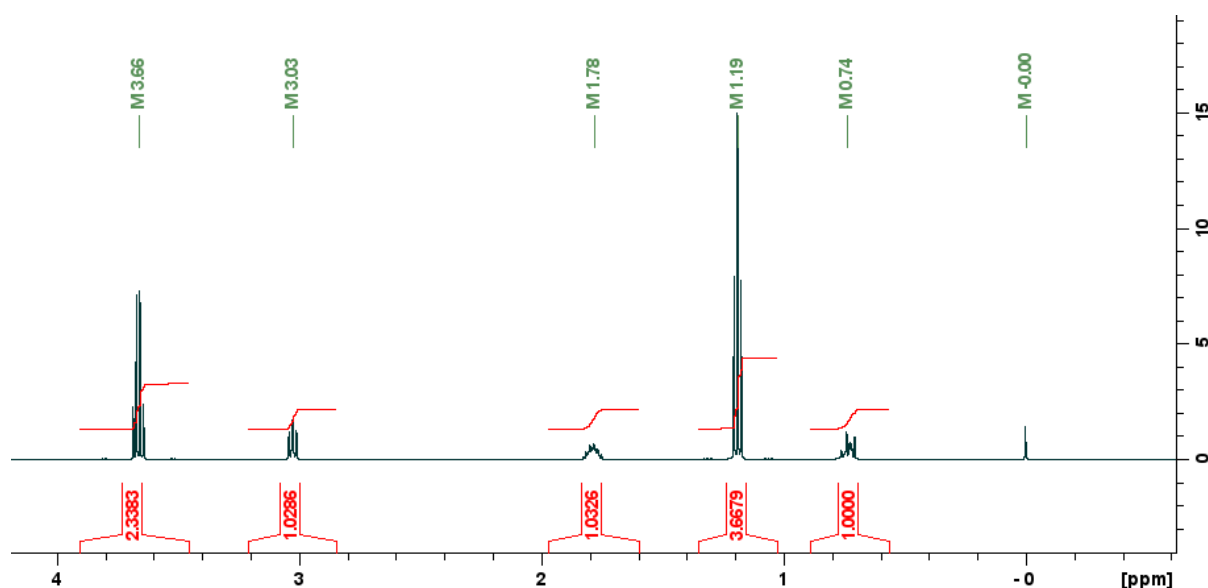
i. Προσθήκη του αντιδραστηρίου (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)

Η συγκεκριμένη ένωση αποτελεί αντιδραστήριο σύζευξης σιλανίου, καθώς όταν υδρολυθούν οι αιθόξυ- ομάδες που διαθέτει δίνει ενεργοποιημένες τερματικές σιλανόλες. Η υδρόλυση των αιθόξυ- ομάδων πραγματοποιείται απλά με ανάδευση της ένωσης σε τουλάχιστον τριπλάσια ποσότητα νερού, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σε pH = 7 που παρασκευάστηκαν όλες οι υδρογέλες η αμινομάδα του οργανοσιλανίου είναι θετικά φορτισμένη. Πραγματοποιώντας σιλανοποίηση της επιφάνειας του αργλικού υποστρώματος με το APTES, επιχειρείται να εισαχθούν θετικά φορτισμένες ομάδες που θα αλλάξουν το συνολικό φορτίο των εκτεθειμένων επιφανειών των νανοδισκίων. Η τροποποίηση αυτή θα επάγει ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το (ανιοντικό) ETID και, ως φυσικό επακόλουθο, αναμένεται να επιβραδύνει την αποδέσμευσή του.

Η υδρόλυση των αιθόξυ- ομάδων αποδεικνύεται από το φάσμα ^1H NMR του stock διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των σιλανοποιημένων παραγώγων. Η αναλογία αιθανόλης-οργανοσιλανίου θα πρέπει να είναι περίπου 3:1. Παράλληλα, επιβεβαιώνεται και από το φάσμα DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy). Στο **Φάσμα 3** αναπαριστώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές πρωτονίων του stock διαλύματος του οργανοσιλανίου APTES σε D_2O . Παράλληλα, στον **Πίνακα 22** δίνεται η ανάθεση των φασματικών κορυφών. Ολοκληρώνοντας τις κορυφές βρέθηκε ότι η αναλογία της αιθανόλης ($\delta = 3.66$ ppm) με το υδρολυμένο αντιδραστήριο ($\delta = 0.74$ ppm) ήταν 2.4:1, συνεπώς μάλλον το APTES έχει υδρολυθεί πλήρως. Για την επιβεβαίωση του παραπάνω πορίσματος πραγματοποιήθηκε πείραμα DOSY στο ίδιο δείγμα.



Φάσμα 3. ^1H NMR stock διαλύματος του οργανοσιλανίου APTES. Η λήψη φάσματος πραγματοποιήθηκε σε D_2O .

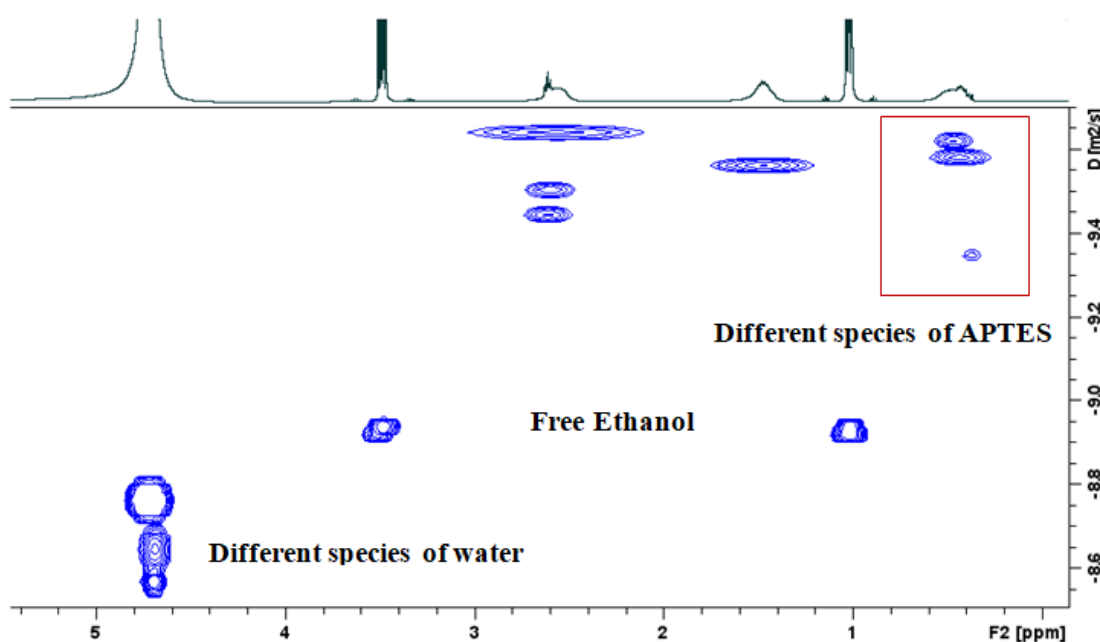
Οι κορυφές της προπυλομάδας του APTES εμφανίζουν διαφορετική πολλαπλότητα από ότι θα έπρεπε. Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται στην εν μέρει αυτοσυμπύκνωση του υλικού προς την δημιουργία διμερών, τριμερών και τετραμερών (**Εικόνα 37**). Η συγκεκριμένη παρατήρηση επιβεβαιώνεται με το πείραμα DOSY και της λήψη φάσματος ^{29}Si του APTES.

Πίνακας 22. Ανάθεση κορυφών για το **Φάσμα 3** (^1H NMR stock διάλυμα APTES).

δ (ppm)	Σήμα
0	TMSP

0.74	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OH})_3$
1.19	$-\text{CH}_3$ (Αιθανόλη)
1.78	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OH})_3$
3.03	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OH})_3$
3.66	$-\text{CH}_2\text{OH}$ (Αιθανόλη)

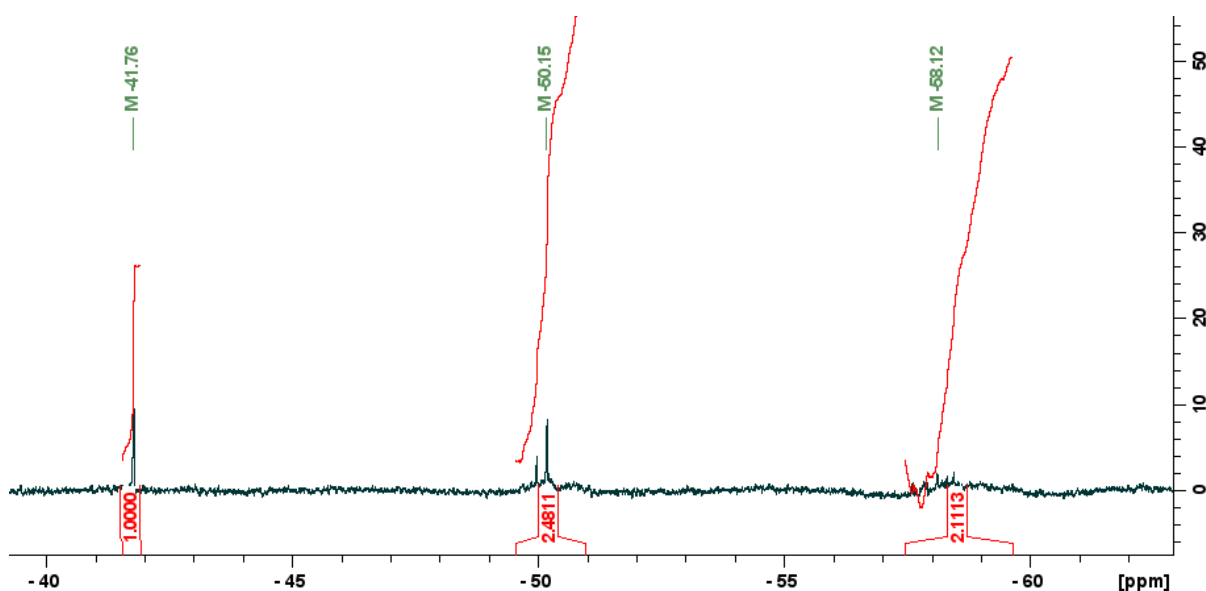
Στα πειράματα DOSY προσδιορίζεται η ταχύτητα μοριακής διάχυσης των προς ανάλυση ενώσεων. Επίσης, διαχωρίζονται επικαλυπτόμενα σήματα κορυφών που οφείλονται στην ίδια ένωση αλλά σε διαφορετική μορφή της. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με την σταθερά διάχυσης. Όπως γίνεται εμφανές στο **Φάσμα 3** στο δείγμα υπάρχει μόνο ελεύθερη αιθανόλη, γεγονός που υποδηλώνει την πλήρη υδρόλυση των αιθόξυ- ομάδων. Επιπρόσθετα, στο σήμα του νερού η κατανομή των σημάτων υποδηλώνει τα διαφορετικά είδη νερού, ανάλογα με τον τρόπο αλληλεπίδρασης με το μόριο. Τέλος, παρατηρείται διαχωρισμός των σημάτων που αφορούν την προπυλομάδα, που δηλώνει την κατανομή των διαφορετικών ειδών του ενεργοποιημένου οργανοσιλανίου ανάλογα με το βαθμό αυτοσυμπύκνωσης του. Όσο πιο μεγάλο το μοριακό βάρος των ειδών που υπάρχουν τόσο πιο αργά διαχέονται.



Φάσμα 3. Πείραμα DOSY (σε φασματόμετρο 500 MHz) για το stock διάλυμα του οργανοσιλανίου APTES.

Στο **Φάσμα 4** αναπαριστώνται οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις των διαφορετικών πυρήνων ^{29}Si (^1H decoupled) που υπάρχουν στο υδατικό διάλυμα του APTES που λήφθηκε

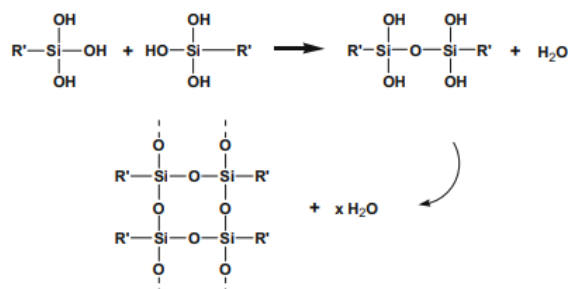
σε φασματόμετρο 600 MHz. Αν το APTES υπήρχε αποκλειστικά ως μονομερές, θα έπρεπε να παρατηρηθεί μία κορυφή. Αντίθετα, στο φάσμα πυριτίου παρατηρούνται περισσότερες. Η κορυφή με $\delta = 41.76$ ppm οφείλεται στο υδρολυμένο μονομερές, η κορυφή με $\delta = 50.15$ ppm οφείλεται στο διμερές (μη υδρολυμένο και μερικώς υδρολυμένο) και η κορυφή με $\delta = 58.12$ στο τριμερές (μη υδρολυμένο και μερικώς υδρολυμένο). Ολοκληρώνοντας τις κορυφές είναι εφικτό να ληφθούν πληροφορίες για την αναλογία τους. Ωστόσο, επειδή το ισότοπο ^{29}Si έχει πολύ μικρή αφθονία (4.9 %) και γυρομαγνητικό λόγο (5 φορές μικρότερο του πρωτονίου [65]), απαιτεί αρκετά πυκνό δείγμα για την ακριβή ποσοτικοποίηση των διαφορετικών ειδών. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό, ότι στο stock διάλυμα του APTES, αραιώνεται η συγκέντρωσή του και το φάσμα ^{29}Si (^1H decoupled) είναι ελλιπές, με αρκετό θόρυβο.



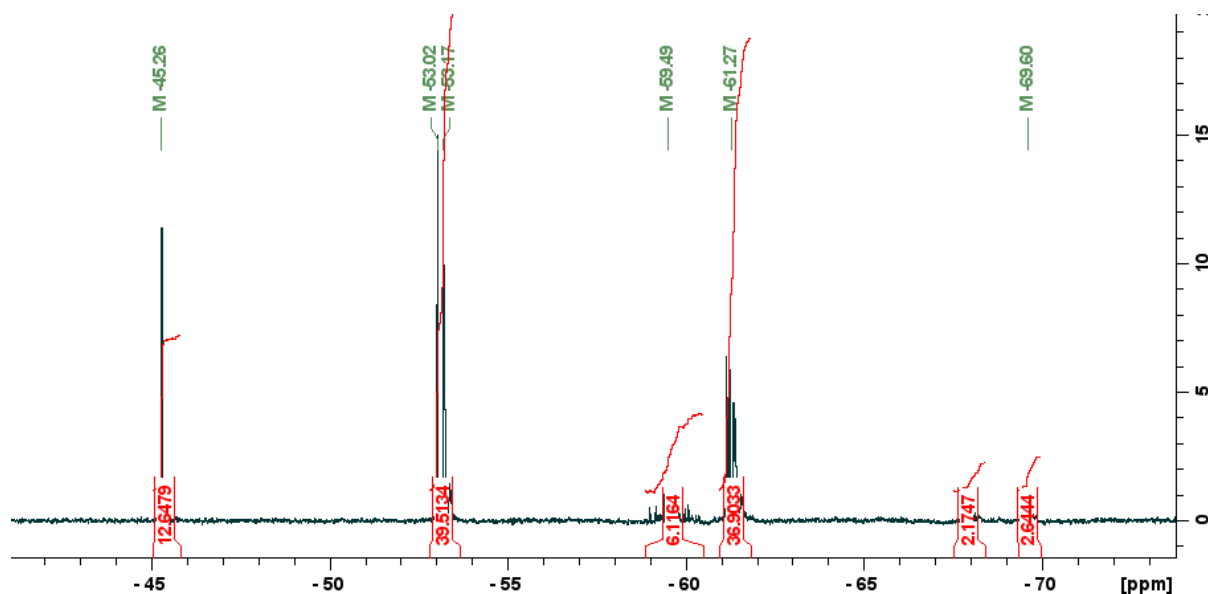
Φάσμα 4. Φάσμα ^{29}Si NMR (^1H decoupled στα 600 MHz) stock διαλύματος APTES. Το φάσμα λήφθηκε σε D_2O και 2048 scans.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί βαθύτερη κατανόηση της κατανομής των διαφορετικών ειδών του APTES, ελήφθη το φάσμα ^{29}Si χρησιμοποιώντας το αρχικό αντιδραστήριο APTES σε διαλύτη CDCl_3 , με πολύ λιγότερη ποσότητα νερού. Κατ' αυτό τον τρόπο, το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε υδρολύθηκε μερικώς, εμφανίζοντας διαφορετικά αυτοσυμπυκνωμένα είδη του APTES με διαφορετικό βαθμό υδρόλυσης. Τα υδρολυμένα είδη εμφανίζονται δεξιά του φάσματος, εξαιτίας του ότι το O της ομάδας $-\text{OH}$ είναι πιο ηλεκτραρνητικό από αυτό της αιθόξυ- ομάδας (θωράκιση του πυρήνα). Όσο περισσότερες αιθόξυ- ομάδες υδρολύονται τόσο πιο δεξιά μετατοπίζονται οι αντίστοιχες κορυφές. Τα

συμπυκνωμένα είδη εμφανίζονται δεξιά του φάσματος, και όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός συμπύκνωσης τόσο πιο δεξιά στο φάσμα βρίσκεται η αντίστοιχη κορυφή. Στο **Φάσμα 5** αναπαριστώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του αρχικού αντιδραστήριου APTES σε CDCl₃ που λήφθηκε σε φασματοόμετρο 600 MHz. Στον **Πίνακα 23** αναγράφεται η ανάθεση των κορυφών και η % κατανομή των διαφορετικών συμπυκνωμένων ειδών (**Εικόνα 38**), όπου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε αντίστοιχες ενώσεις [66].



Εικόνα 37. Αντίδραση διμερισμού των τριαλκοξυσιλανίων και κατόπιν ολιγομερισμού τους. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [67].

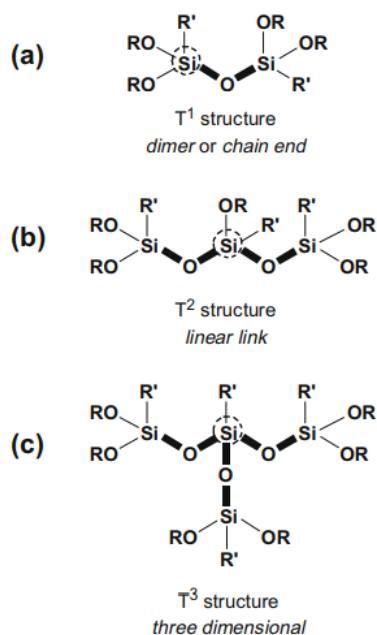


Φάσμα 5. Φάσμα ²⁹Si NMR του APTES σε CDCl₃ (φασματοόμετρο 600 MHz, 2048 scans).

Πίνακας 23. Ανάθεση κορυφών για το Φάσμα 5.

δ (ppm)	Σήμα	% Κατανομή
-45.26	T ⁰ (Μονομερές)	12.65
-53.02	T ¹	39.51
-53.17		

-61.27	T ²	36.90
-69.60	T ³	2.64

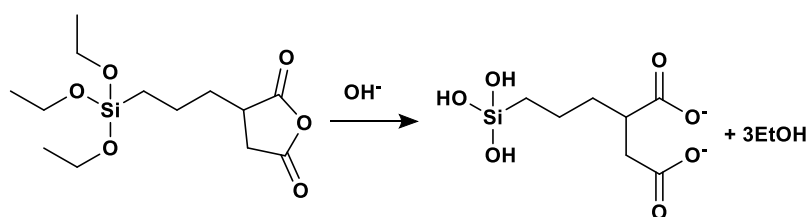


R' = functional group; R = alkyl group

Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση δομής T^x οργανοσιλανίων. Η εικόνα λήφθηκε από την παραπομπή [67].

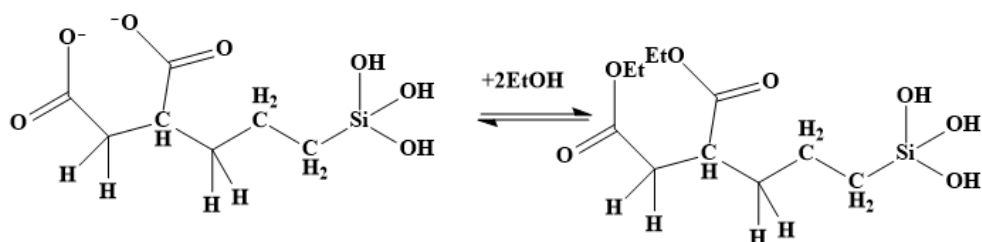
ii. Προσθήκη του αντιδραστηρίου (3-Triethoxysilyl)propyl succinic anhydride (TESPSA)

Αντίστοιχα, η συγκεκριμένη ένωση αποτελεί αντιδραστήριο σύζευξης σιλανίου, το οποίο μέσω της υδρόλυσής του, μπορεί να τροποποιήσει την επιφάνεια των νανοσωματιδίων της υδρογέλης. Η επιλογή του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου οφείλεται στον σουκινικό (ή ηλεκτρικό) ανυδρίτη που διαθέτει. Ο σουκινικός ανυδρίτης παρουσία ιόντων OH⁻ ανοίγει και σχηματίζονται δύο καρβοξυλικές ομάδες, οι οποίες στην τιμή pH = 7 είναι αποπρωτονιωμένες, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

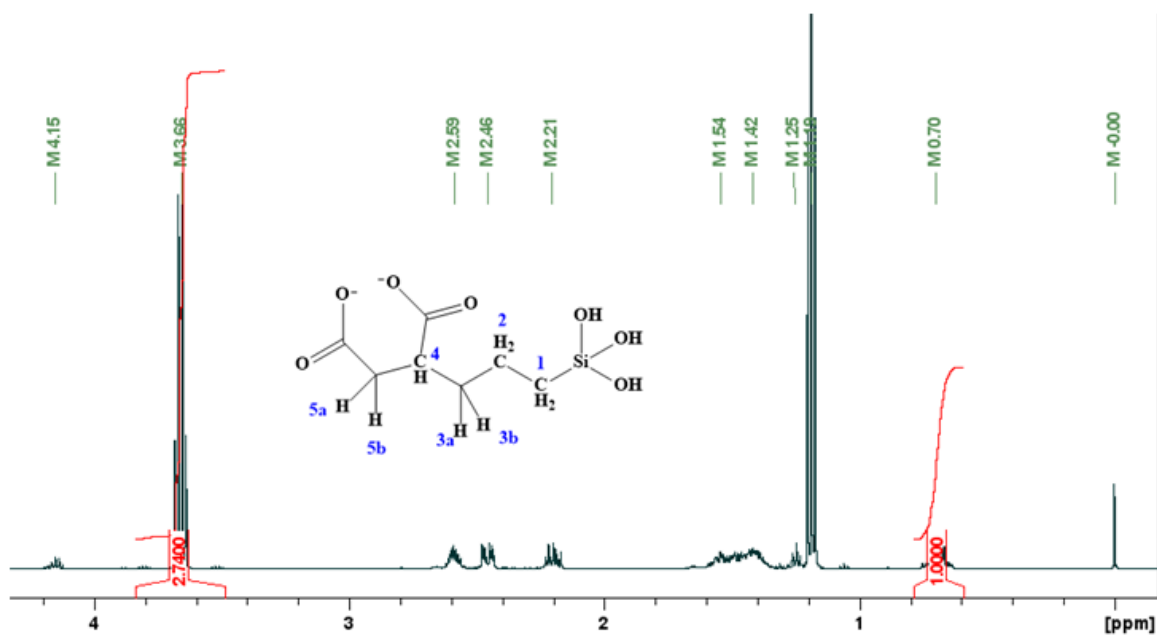


Πραγματοποιώντας σιλανοποίηση της επιφάνειας του αργλικού υποστρώματος με το TESPSA, επιχειρείται να εισαχθούν αρνητικά φορτισμένες ομάδες που θα αλλάξουν το συνολικό φορτίο των εκτεθειμένων επιφανειών των νανοδισκίων. Η τροποποίηση αυτή θα επάγει απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το ETID και ως φυσικό επακόλουθο θεωρητικά θα πρέπει να επιταχύνει την αποδέσμευση του.

Στο **Φάσμα 6** αναπαριστώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του ^1H NMR φάσματος του stock διαλύματος TESPSA που χρησιμοποιήθηκε για την σιλανοποίηση των υδρογελών (σε φασματόμετρο 500 MHz). Στον **Πίνακα 24** πραγματοποιείται η ανάθεση των χαρακτηριστικών κορυφών. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο φάσμα πρωτονίου παρατηρήθηκε χαρακτηριστική κορυφή –αιθόξυ ομάδας (4.15 ppm), γεγονός που υποδηλώνει ότι μέρος των ελεύθερων καρβοξυλικών ομάδων μάλλον έχουν εστεροποιηθεί σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Σε ποσοστό περίπου 8-11 %):



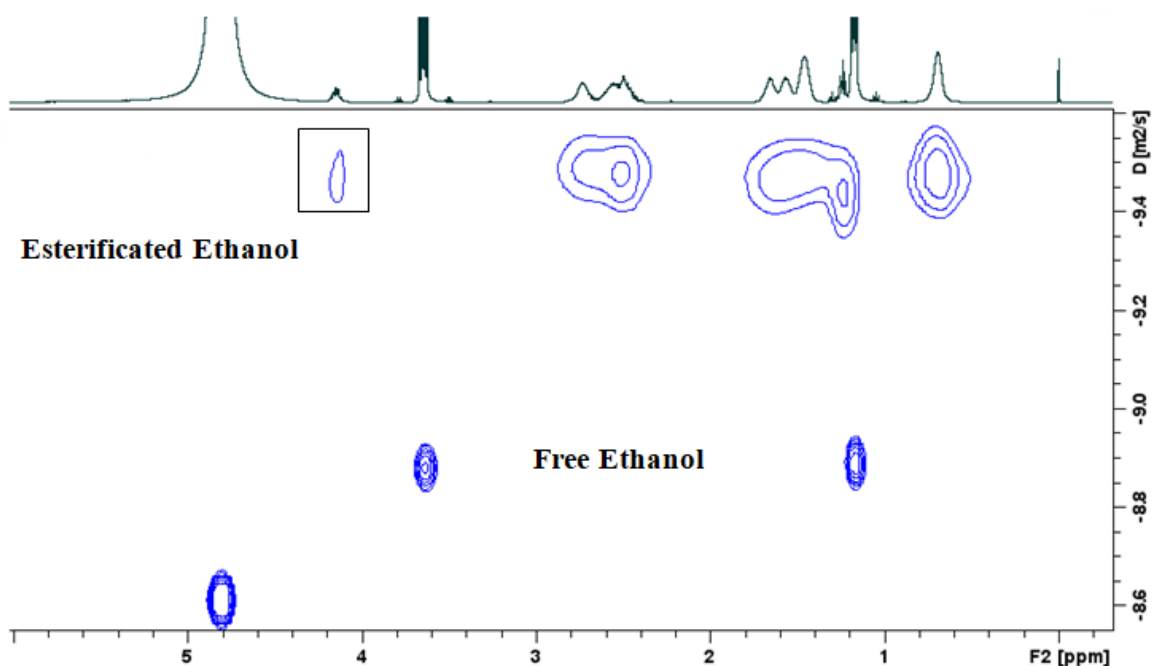
Η αναλογία ελεύθερης αιθανόλης (**3.66 ppm**): TESPSA (**0.70 ppm**) ήταν **2.74:1** γεγονός που υποδηλώνει την υδρόλυση των αιθόξυ- ομάδων. Η πλήρης υδρόλυση των αιθόξυ- ομάδων επιβεβαιώθηκε με πείραμα DOSY (**Φάσμα 7**), όπου παρατηρήθηκε σήμα μόνο για την ελεύθερη αιθανόλη και για την πιθανώς εστεροποιημένη με τις καρβοξυλομάδες. Το γεγονός ότι το σήμα της εστεροποιημένης αιθανόλης εμφανίζει ίδια σταθερά διάχυσης με το οργανοσιλάνιο TESPSA (βρίσκονται στην ίδια ευθεία στο φάσμα) αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι είναι συνδεδεμένη με τις καρβοξυλομάδες.



Φάσμα 6. Φάσμα ^1H NMR stock διαλύματος TESPFA που λήφθηκε σε D_2O σε φασματογράφο 500 MHz.

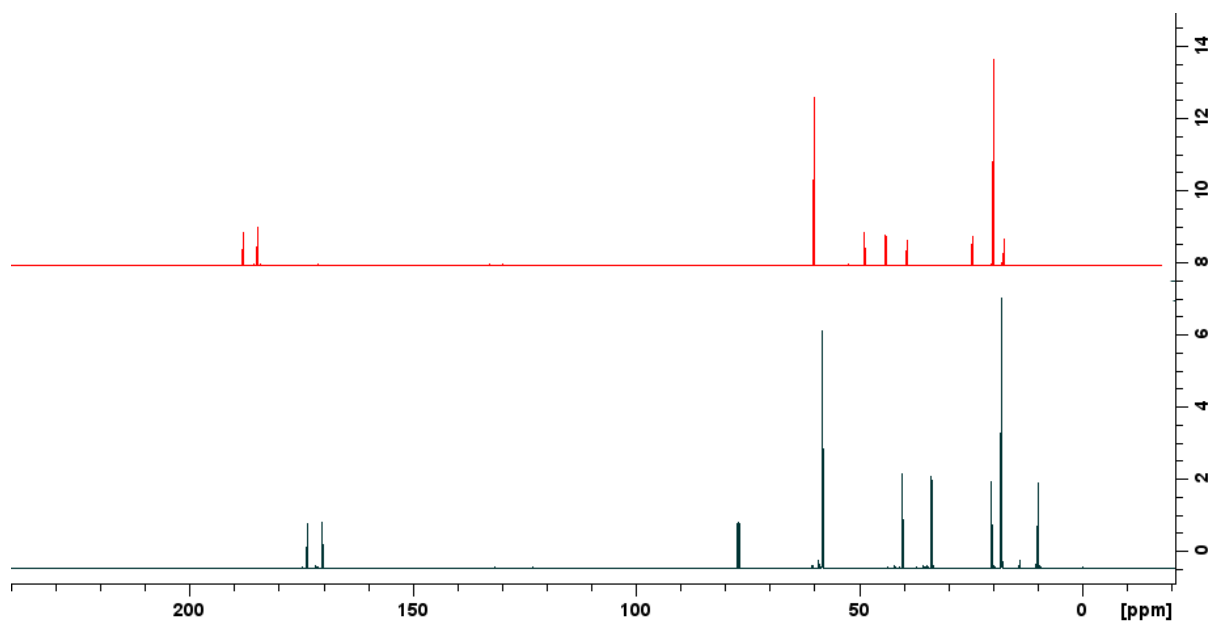
Πίνακας 24. Ανάθεση των κορυφών του Φάσμα 6.

δ (ppm)	Σήμα
0	TMSP
0.70	1
1.19	-CH ₃ (free ethanol)
1.25	-CH ₃ (esterificated ethanol)
1.42	2
1.54	3 (a,b)
2.21	5 (a,b)
2.46	
2.59	4
3.66	-CH ₂ OH (free ethanol)
4.15	-CH ₂ OH (esterificated ethanol)



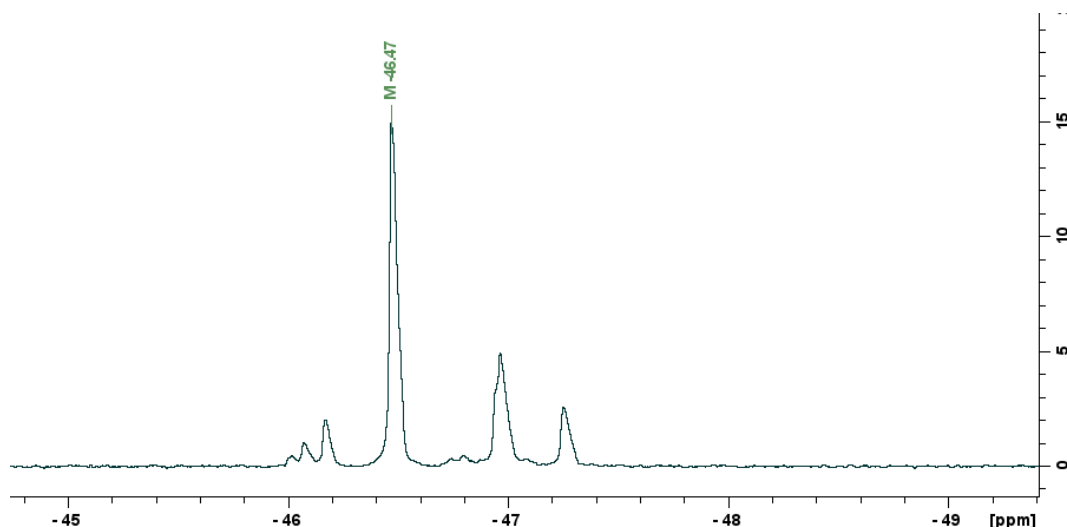
Φάσμα 7. Φάσμα DOSY (φασματόμετρο 500 MHz) για το stock διάλυμα του TESPSA.

Στο **Φάσμα 8** αναπαριστώνται τα φάσματα ^{13}C (^1H decoupled) του αντιδραστηρίου TESPSA σε CDCl_3 (με μαύρο χρώμα) και του stock διαλύματος σε D_2O (με κόκκινο χρώμα). Η διάνοιξη του σουκινικού ανυδρίτη μπορεί να ταυτοποιηθεί με την αξιολόγηση των σημάτων στην περιοχή **150 ppm-200 ppm**, όπου εμφανίζονται οι καρβονυλικοί άνθρακες. Συγκεκριμένα, στο φάσμα του TESPSA πριν την αντίδρασή του με το νερό, εμφάνισε δύο χαρακτηριστικές κορυφές στα **170 ppm** και **174 ppm** που αντιστοιχούν στους καρβονυλικούς άνθρακες της κλειστής μορφής του ανυδρίτη. Όμως, μετά την αντίδραση του TESPSA με το νερό (και ρύθμιση σε $\text{pH} = 7$) οι συγκεκριμένες κορυφές μετατοπίζονται σε μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις (**185 ppm** και **188 ppm**). Η μετατόπιση σε μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις, υποδηλώνει την διάνοιξη του σουκινικού ανυδρίτη προς δύο καρβοξυλικές ομάδες.



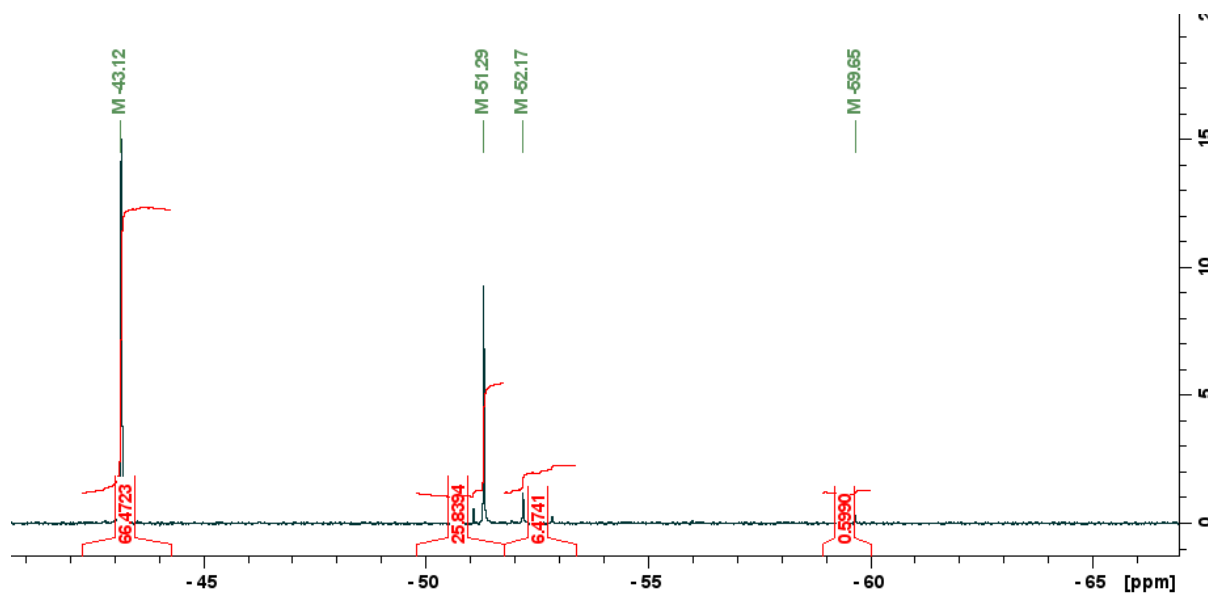
Φάσμα 8. Φάσμα ^{13}C NMR του TESPSA σε CDCl_3 (με μαύρο χρώμα) και ^{13}C NMR υδατικού stock διαλύματος TESPSA (pH = 7) σε D_2O (με κόκκινο χρώμα).

Το αντιδραστήριο TESPSA εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά με το APTES ως προς την κατανομή διαφορετικών ειδών προϊόντων της αυτοσυμπύκνωσής του. Συγκεκριμένα, η λήψη του φάσματος ^{29}Si NMR του αρχικού αντιδραστηρίου σε CDCl_3 (**Φάσμα 9**) έδειξε μία μεγάλη κορυφή με $\delta = -46.47$ ppm που υποδηλώνει ότι μάλλον το TESPSA υπάρχει κυρίως ως μονομερές. Οι μικρότερες κορυφές που κατανέμονται γύρω από την κύρια, πιθανότατα οφείλονται στον διαφορετικό βαθμό υδρόλυσης του μονομερούς. Τα οργανοσιλάνια αντιδρούν γρήγορα με το νερό και είναι ευαίσθητα στην υγρασία, και ως φυσικό επακόλουθο είναι δύσκολο το TESPSA να διατηρηθεί στην μη υδρολυμένη μορφή του όταν εκτίθεται στον ατμοσφαιρικό αέρα.



Φάσμα 9. Φάσμα ^{29}Si NMR του TESPSA σε CDCl_3 (600 MHz, 2048 scans).

Στο **Φάσμα 10** αναπαριστώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές πυριτίου για τα διαφορετικά προϊόντα αυτοσυμπύκνωσης του TESPSA σε D_2O που λήφθηκε σε φασματόμετρο 600 MHz (2048 scans). Στον **Πίνακα 25** επιχειρείται ανάθεση των κορυφών και αναγραφή της % κατανομής των διαφορετικών ειδών.



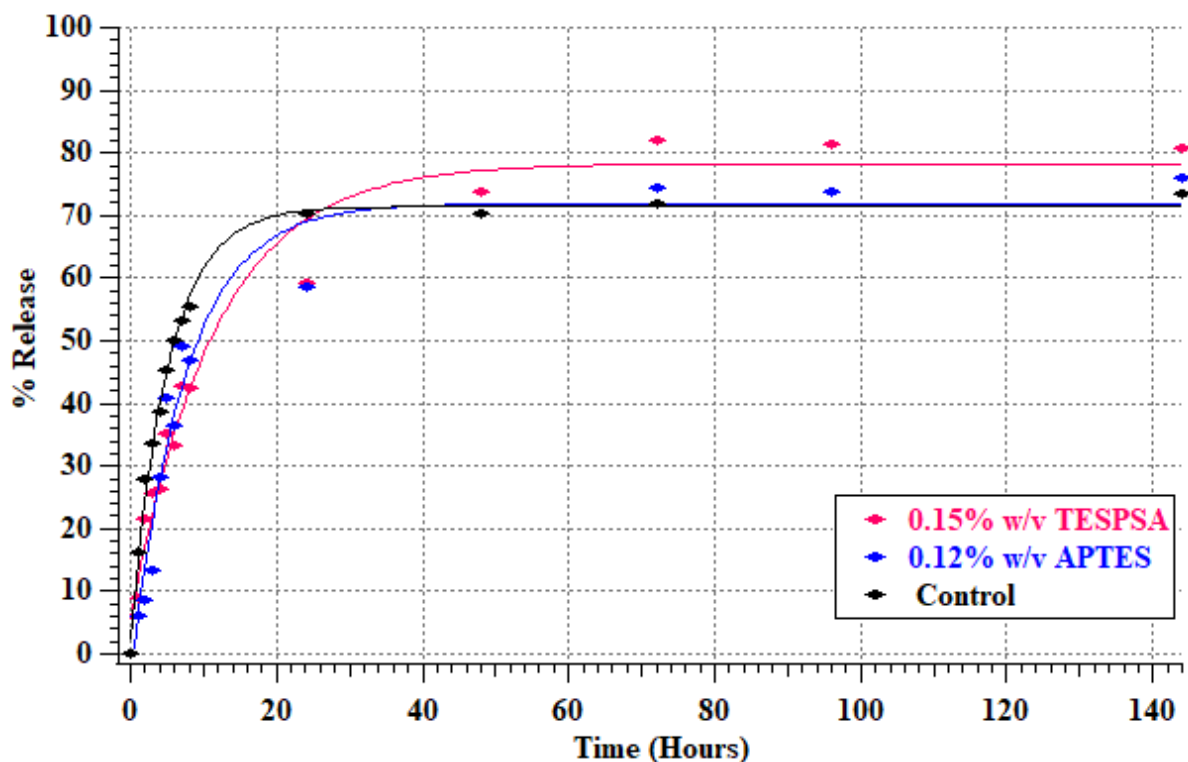
Φάσμα 10. Φάσμα ^{29}Si NMR του TESPSA σε D_2O (600 MHz, 2000 scans).

Πίνακας 25. Ανάθεση κορυφών του Φάσμα 10. Ως T⁰ αναφέρεται στο μονομερές.

δ (ppm)	Σήμα	% Κατανομή
-43.12	T ⁰	66
-51.29	T ¹	26
-59.65	T ³	0.6

4.4.1. Τροποποίηση μέσω εισαγωγής των οργανοσιλανίων πριν την πήξη της υδρογέλης

Στο **Διάγραμμα 22** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών αποδέσμευσης του ETID σε συνάρτηση με τον χρόνο, από υδρογέλες που επιχειρήθηκαν να σιλιανοποιηθούν προσθέτοντας τα οργανοσιλάνια APTES και TESPSA στην υδρογέλη πριν την πήξη της. Στον **Πίνακα 26** αναφέρονται οι χαρακτηριστικές σταθερές μετά από τη μελέτη των συστημάτων, εφαρμόζοντας την εξίσωση κανονικοποίησης. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα από τα αναμενόμενα. Συγκεκριμένα, στο σύστημα που περιείχε TESPSA παρατηρήθηκε ελάχιστη επιβράδυνση της αποδέσμευσης, ενώ στο σύστημα που περιείχε APTES παρατηρήθηκε ελαφρώς αυξημένος ρυθμός απελευθέρωσης του ETID. Συνεπώς, η συγκεκριμένη μέθοδος πιθανώς δεν ευνοεί την σιλιανοποίηση του αργλικού υποστρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην ανάπτυξη σταθερών υδρογελών με τα οργανοσιλάνια εντός της υδρογελικής μήτρας, τα οργανοσιλάνια προστέθηκαν σε πολύ μικρή ποσότητα, διότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτά αποσταθεροποιούσαν την υδρογέλη και παρεμπόδιζαν την πήξη της.



Διάγραμμα 22. Αποδέσμευση (%) του ETID από υδρογέλες (α) 3 % Lap. XL-21 XR/151 mg ETID (Control) (pH = 7), (β) 3 % Lap. XL-21 XR-0.15 % TESPSA (pH = 7) και (γ) 3 % Lap. XL-21 XR-0.12 % APTES (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/151 mg ETID (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.45 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C):

$$y(t) = -68.961 * e^{-0.19468t} + 71.422$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/151 mg ETID-0.15 % TESPSA (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.45 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C):

$$y(t) = -72.65 * e^{-0.086923t} + 78.294$$

Εξίσωση προσαρμοσμένης καμπύλης για την υδρογέλη 3 % Lap. XL-21 XR/151 mg ETID-0.12 % TESPSA (pH = 7) σε 50 mL υπερκείμενη φάση pH = 7.45 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C):

$$y(t) = -75.847 * e^{-0.1352t} + 71.907$$

Πίνακας 26. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 22.

Σύστημα	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
Control	0.97	71	8.6	3.4
0.15 % TESPSA	0.88	78	29.0	7.1
0.12 % APTES	1.13	72	14.4	5.5

Στις μελέτες αποδέσμευσης, παρόλο που τα οργανοσιλάνια υπήρχαν σε μικρή συγκέντρωση, παρατηρήθηκε μικρή διαρροή τους εκτός της υδρογέλης (**Φάσμα 16** στην ενότητα των Παραρτημάτων), γεγονός που υποδηλώνει ότι συγκρατούνται ηλεκτροστατικά ή μέσω δεσμών υδρογόνου στο δίκτυο. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι πιθανότατα η συγκεκριμένη μέθοδος δεν οδηγεί στη σιλιανοποίηση του αργλικού υποστρώματος, οι υδρογέλες ξηράνθηκαν σε κατόπιν λήφθηκαν τα φάσματα IR (**Φάσμα 17** στην ενότητα των παραρτημάτων), όπου πράγματι δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση.

4.4.2. Οργανική τροποποίηση Laponite® XL-21 XR μέσω one-pot αντίδρασης

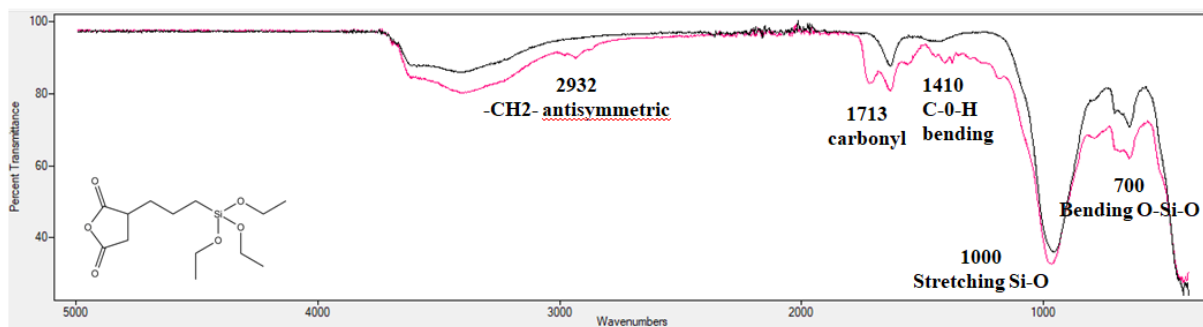
Στον **Πίνακα 27** αναγράφονται οι ποσότητες του αργλικού υποστρώματος, του οργανοσιλάνιου και του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο συνθέσεις. Επιπρόσθετα, αναγράφεται η μάζα του προϊόντος που λήφθηκε. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του υλικού με τις αναλυτικές τεχνικές Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), Περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD) και θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).

Πίνακας 27. Ποσότητες αργλικού υποστρώματος, οργανοσιλάνιου και διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν και προϊόντος που λήφθηκε για τις συνθέσεις των σιλιανοποιημένων παραγώγων Lap. XL 21 XR-APTES και Lap. XL 21 XR-TESPSA.

	Lap. XL 21 XR-APTES	Lap. XL 21 XR-TESPSA
Lap. XL 21 XR (g)	2.003 (0.7 mmol)	1.007 (0.36 mmol)
Grafting Agent (μL)	1.190 (5.0 mmol)	700 (2.4 mmol)
Solvent (Toluene, mL)	95	50
m_{product} (g)	1.642	1.069

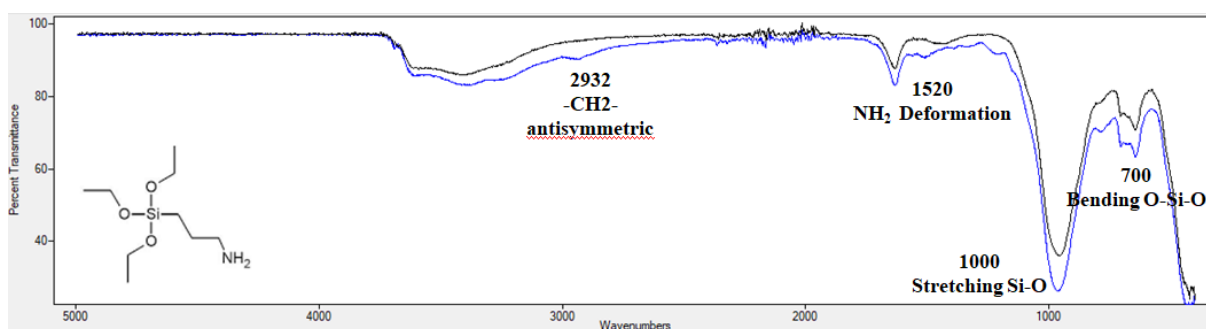
Η μελέτη των δειγμάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου εξυπηρέτησε στην διερεύνηση της ενσωμάτωσης των οργανοσιλάνιων, μέσω τροποποίησης των χαρακτηριστικών

απορροφήσεων. Στο **Φάσμα 11** συγκρίνεται το φάσμα FT-IR του Lap. XL-21 XR (με μαύρο χρώμα) και του σιλανοποιημένου με το οργανοσιλάνιο TESPSA (με ροζ χρώμα). Η εμφάνιση κορυφών στα 1410 cm^{-1} (κάμψη C-O-H), στα 1410 cm^{-1} (καρβονυλίου) και στα 2932 cm^{-1} (αντισυμμετρική $-\text{CH}_2-$), υποδηλώνει την ενσωμάτωση του TESPSA στο αργλικό υπόστρωμα.



Φάσμα 11. Φάσματα AT-IR του Lap. XL-21 XR (μαύρο χρώμα) και του σιλανοποιημένου παραγώγου Lap. XL 21 XR-**TESPSA** (ροζ χρώμα).

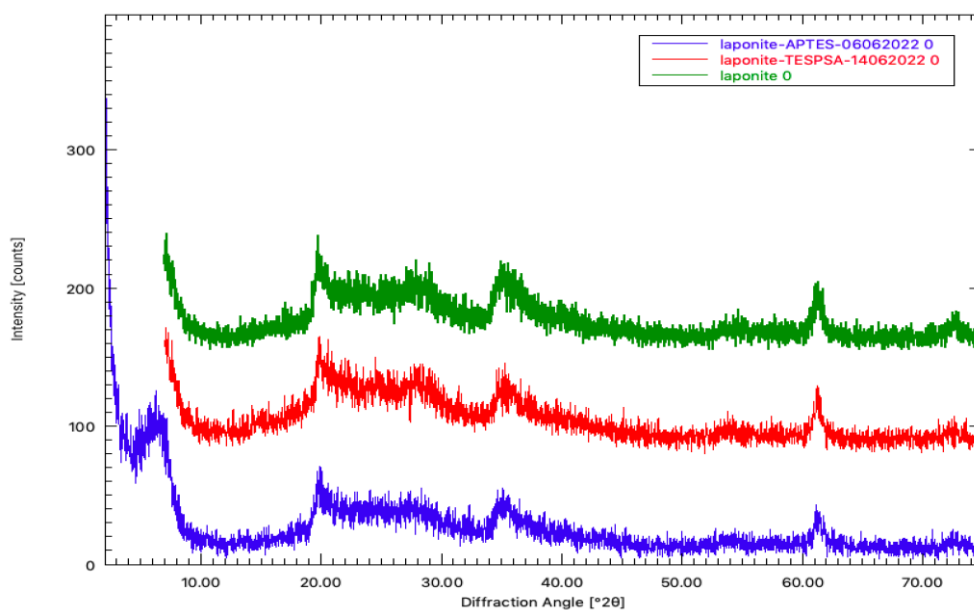
Στο **Φάσμα 12** συγκρίνεται το φάσμα AT-IR του Lap. XL-21 XR (με μαύρο χρώμα) και του σιλανοποιημένου παραγώγου με το APTES (με μπλε χρώμα). Η εμφάνιση κορυφών στα 1520 cm^{-1} (παραμόρφωση $-\text{NH}_2$) και στα 2932 cm^{-1} (αντισυμμετρική $-\text{CH}_2-$), υποδηλώνει την ενσωμάτωση του APTES στο αργλικό υπόστρωμα.



Φάσμα 12. Φάσμα IR Laponite[®] XL-21 XR (μαύρο χρώμα) και Φάσμα σιλανοποιημένου παράγωγου Lap. XL 21 XR-**APTES** (μπλε χρώμα).

Η σιλανοποίηση των επιφανειών των νανοσωματιδίων του Laponite[®], ανάλογα με το βαθμό φόρτωσης των οργανοσιλανίων και της στερεοχημικής διευσθέτησής τους μεταξύ των φύλλων, μπορεί να επάγει την τροποποίηση της μικροδομής του υλικού. Ειδικότερα, μπορεί να

προκαλέσει αύξηση ή μείωση της απόστασης μεταξύ των δισκίων, ανάλογα με τη διευθέτηση του οργανοσιλανίου, και το αν έχει ολιγομεριστεί ή όχι. Για αυτό τον λόγο τα συντεθέντα παράγωγα αναλύθηκαν σε περιθλασίμετρο ακτίνων X, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 23**. Όπως παρατηρείται, λόγω της χαμηλής περιοδικότητας της δομής του υλικού (άμορφο) δεν μπορούν να παρατηρηθούν διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.



Διάγραμμα 23. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X του Αργίλου Lap. XL-21 XR (πράσινο χρώμα) και των σιλανοποιημένων παραγώγων Lap. XL 21 XR-APTES (μπλε χρώμα) και Lap. XL 21 XR-TEPSA (κόκκινο χρώμα).

Κατόπιν, ακολούθησε η θερμοσταθμική ανάλυση των σιλανοποιημένων παραγώγων προκειμένου να προσδιοριστεί το % ποσοστό σιλανοποίησης του. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [61] και υποθέτοντας ότι τα οργανοσιλάνια έχουν υδρολυθεί πλήρως και έχουν ενσωματωθεί εξολοκλήρου στο προϊόν, μπορεί να προσδιοριστεί η % σιλανοποίηση του υλικού. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη το ότι τα οργανοσιλάνια αποτελούνται από το ανόργανο (Si) και το οργανικό (R) μέρος, η αποβολή τους πραγματοποιείται μεταξύ των θερμοκρασιών 200–600 °C. Στη συγκεκριμένη εργασία ωστόσο, ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε από την απώλεια βάρους μεταξύ των θερμοκρασιών 200– 550 °C, διότι σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες υπήρχε κίνδυνος να λιώσει το δισκίο που έφερε το δείγμα (δισκίο

Αλουμινίου). Συνεπώς η % περιεκτικότητα οργανοσιλανίου προσδιορίστηκε, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{ Silane load} = \frac{100 * W(200-550) - W(\text{Si})}{100 - W(200-550) - W(\text{Si})}$$

Όπου:

$W_{(200-550)}$: απώλεια βάρους μεταξύ 200-550 °C

$W_{\text{Si}} = W_{(200-550)} * (Mr_{\text{Si}} / Mr_{\text{R}})$

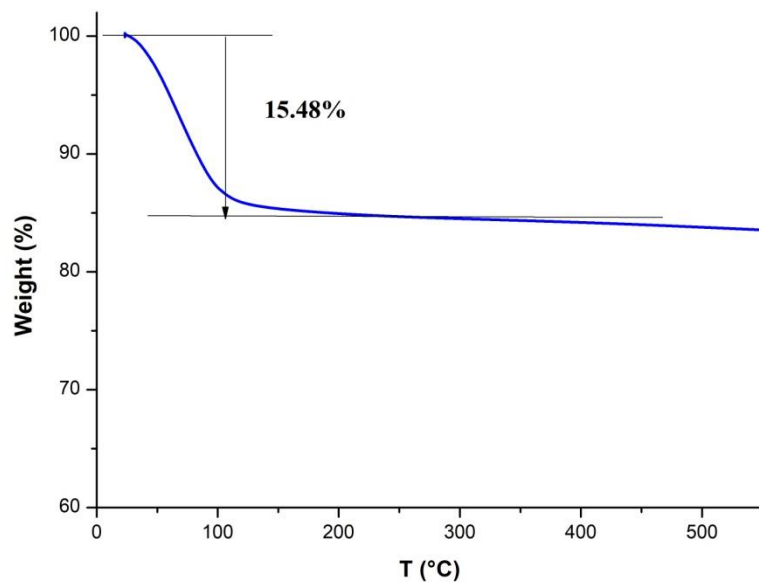
$Mr_{\text{Si}} = 28.1 \text{ g/mol}$

$Mr_{\text{C}_3\text{H}_8\text{N}} = 58.1 \text{ g/mol}$

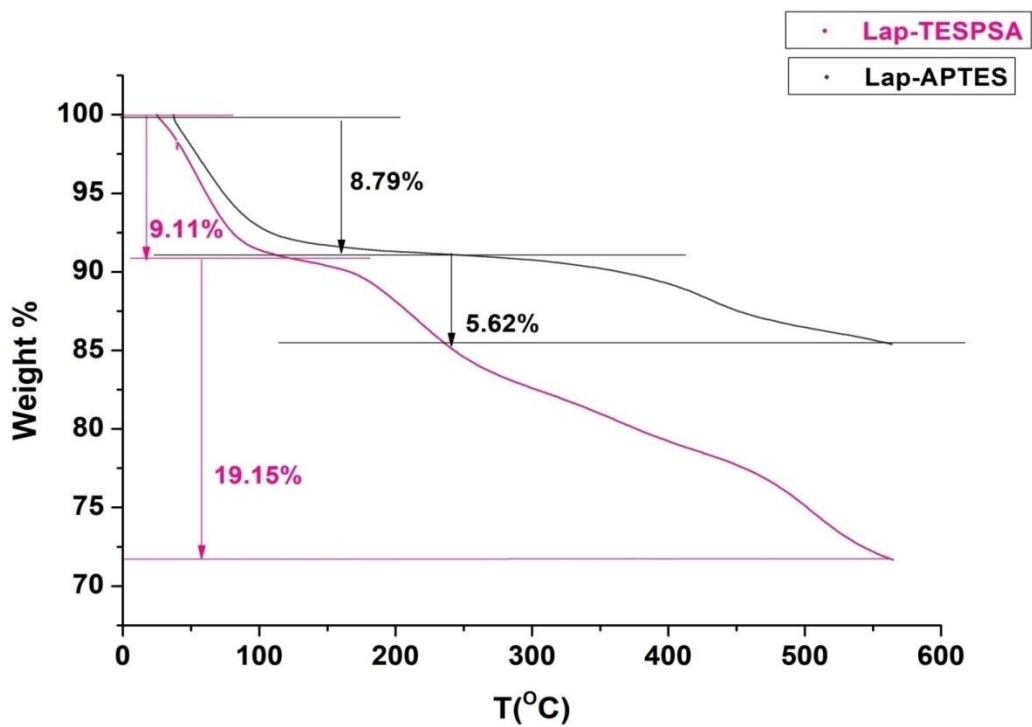
$Mr_{\text{C}_3\text{H}_8\text{N}} = 58.1 \text{ g/mol}$

$Mr_{\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3} = 141.04 \text{ g/mol}$

Στο **Διάγραμμα 24** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θερμοσταθμικής ανάλυσης του Laponite® XL-21 XR, και αναπαριστώνται ως «% απώλεια βάρους» σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Κάθε απώλεια βάρους απεικονίζεται με την μορφή σκαλοπατιού (step). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ένα step που αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους **15.48 %** μεταξύ των θερμοκρασιών **50-150 °C**, που οφείλεται στην αποβολή προσροφημένης υγρασίας. Παράλληλα, στο **Διάγραμμα 25** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα της θερμοσταθμικής ανάλυσης για τα σιλανοποιημένα παράγωγα Lap.XL-21 XR-APTES και Lap.XL-21 XR-TEPSA. Τα δύο προϊόντα εμφάνισαν δύο steps. Ειδικότερα, το Lap.XL-21 XR-APTES εμφάνισε ένα step απώλειας βάρους **8.79 %** στο εύρος θερμοκρασιών **50-150 °C** που οφείλεται στην αποβολή του προσροφημένου νερού και ένα δεύτερο step απώλειας βάρους **5.62 %** (εύρος θερμοκρασιών **200-550 °C**) που οφείλεται στην απομάκρυνση του οργανοσιλανίου. Αντίστοιχα, για το παράγωγο Lap.XL-21 XR-TEPSA παρατηρήθηκε ένα step που αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους **9.11 %** στο εύρος θερμοκρασιών **50-150 °C** που οφείλεται στην αποβολή του προσροφημένου νερού και ένα δεύτερο step που αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους **19.15 %** μεταξύ 200-550 °C λόγω αποβολής του TEPSA. Χρησιμοποιώντας τα συγκεκριμένα δεδομένα προσδιορίστηκε το ποσοστό σιλανοποίησης, όπως αναπαριστάται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 28**. Βρέθηκε λοιπόν ότι το ένα παράγωγο περιείχε περίπου **6.5 % APTES**, ενώ το άλλο **20.5 % TEPSA**.



Διάγραμμα 24. Θερμοσταθμική ανάλυση του Αργίλου Lap. XL 21 XR.



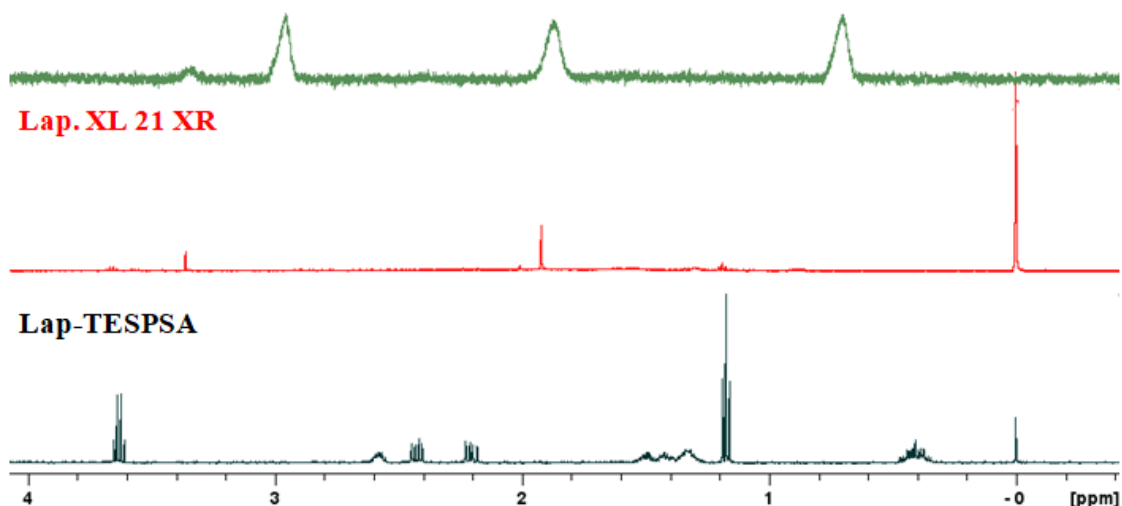
Διάγραμμα 25. Θερμοσταθμική ανάλυση των σιλανοποιημένων παραγώγων Lap. XL 21 XR-APTES (μαυρο χρώμα) και Lap. XL 21 XR-TEPSA (ροζ χρώμα).

Πίνακας 28. Πειραματικά δεδομένα θερμοσταθμικής ανάλυσης των σιλανοποιημένων παραγώγων Lap. XL 21 XR-APTES και Lap. XL 21 XR-TEPSA και προσδιορισμός της % σιλανοποίησής τους.

Sample	% W ₍₂₀₀₎	% W ₍₅₅₅₎	% W ₍₂₀₀₋₅₅₀₎	% W _(Si)	% Silane Loading
Lap-APTES	91.30	85.38	5.92	2.87	6.5
Lap-TEPSA	88.12	71.66	16.46	3.28	20.5

Στο συγκεντρωτικό **Φάσμα 13** αναπαριστώνται τα φάσματα ¹H NMR ποσότητας των σιλανοποιημένων παραγώγων του Laronite[®] που καταστράφηκαν με προσθήκη ποσότητας NaOD. Η διάσπαση του δεσμού Si-O-Si μεταξύ του αργλικού υποστρώματος και του οργανοσιλανίου, επιτρέπει την διαρροή των παραγόντων διασταύρωσης στο δευτερωμένο διαλύτη καθιστώντας εφικτή την ανίχνευσή τους. Στο **Φάσμα 13** γίνονται εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές του APTES (με πράσινο χρώμα) και του TEPSA (με μαύρο χρώμα) που συζητήθηκαν παραπάνω. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα παράγωγα που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε τεστ διαλυτοποίησης και με άλλους δευτερωμένους διαλύτες (CDCl₃, DMSO-d₅, CDCl₃/DMSO-d₅(4:1), MeOD, Acetone, Benzene-d₆), αλλά τα φάσματα ¹H NMR τους δεν έδειξαν κάποιο σήμα. Αυτό επιβεβαιώνει την ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Στην περίπτωση της ομοιοπολικής τροποποίησης με το TEPSA, παρατηρήθηκε αιθανόλη στο δείγμα γεγονός που υποδηλώνει ότι μέρος της είχε προσροφηθεί στο αργλικό υπόστρωμα με μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση.

Lap-APTES



Φάσμα 13. Ποιοτικά Φάσματα ^1H NMR των αποικοδομημένων σιλανοποιημένων παραγώγων Lap. XL 21 XR-APTES (πράσινο χρώμα) και Lap. XL 21 XR-TESPSA (μαύρο χρώμα) σε NaOD και του Lap. XL 21 XR σε D_2O (κόκκινο χρώμα).

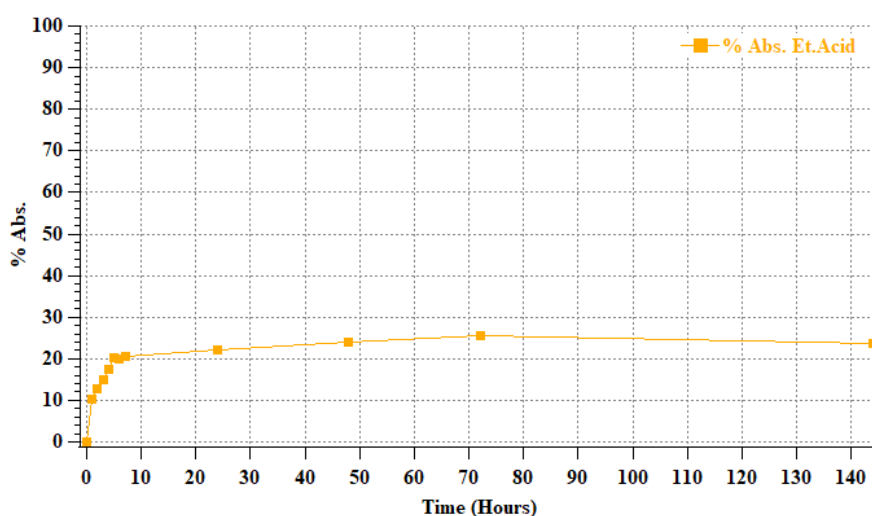
Μετά τον χαρακτηρισμό των παραγώγων Laronite[®] XL 21 XR-APTES (6.5 %) και Laronite[®] XL 21 XR-TESPSA (20.5 %) επιχειρήθηκε να παρασκευαστούν σταθερές υδρογέλες με τη μέθοδο της απλής διασποράς. Ωστόσο, οι προσπάθειες ήταν ανεπιτυχείς ακόμα και με τη χρήση υδατόλουτρου υπερήχων (ομοιογενοποίηση δείγματος). Αυτό υποδηλώνει ότι τα οργανοσιλάνια έχουν πιθανώς ολιγομεριστεί και έχουν φέρει πιο κοντά τα νανοδισκία του Laronite[®], εμποδίζοντας το νερό να διαπεράσει τα τακτοειδή και να σχηματίσει κολλοειδές διάλυμα. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλα εμπορικά διαθέσιμα είδη Laronite[®].

4.4.3. Τροποποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης στην προσχηματισμένη υδρογέλη

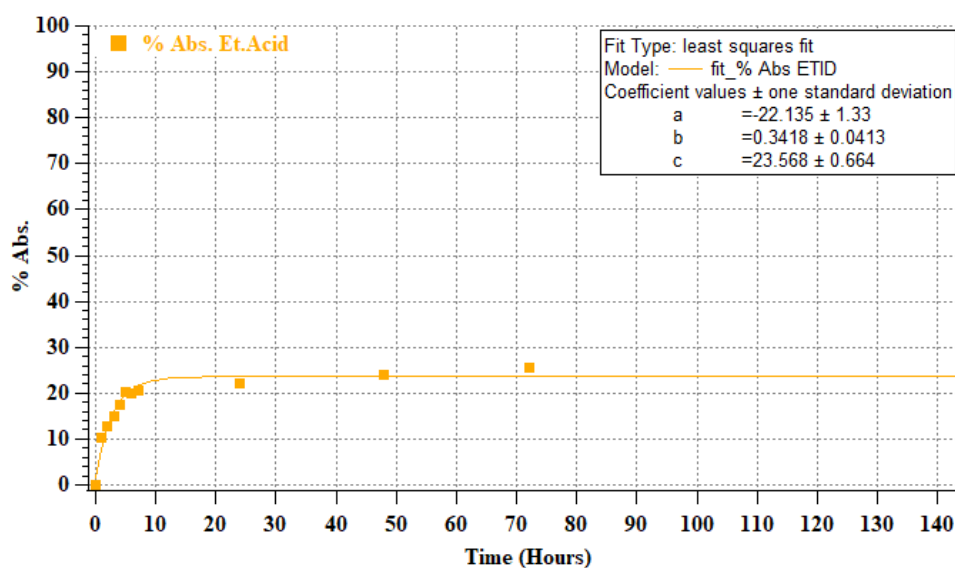
i. Control

Στο **Διάγραμμα 26** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % απορρόφησης του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7)

που περιείχε 3.33 mmol ETID. Παρατηρήθηκε ότι το σύστημα εμφανίζει παρόμοια κινητική με τις μελέτες αποδέσμευσης του ETID. Συνεπώς προσαρμόστηκε η καμπύλη κανονικοποίησης $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$ προκειμένου να υπολογιστεί η συνολική % ποσότητα ETID που απορροφήθηκε. Στο **Διάγραμμα 27** αναπαριστάται η προσαρμοσμένη καμπύλη και ο προσδιορισμός των σταθερών A, B και C. Η άδεια υδρογέλη απορρόφησε συνολικά από την υπερκείμενη φάση **23.57 %** ETID.



Διάγραμμα 26. % Απορρόφηση του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7) που περιείχε 3.33 mmol ETID, σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

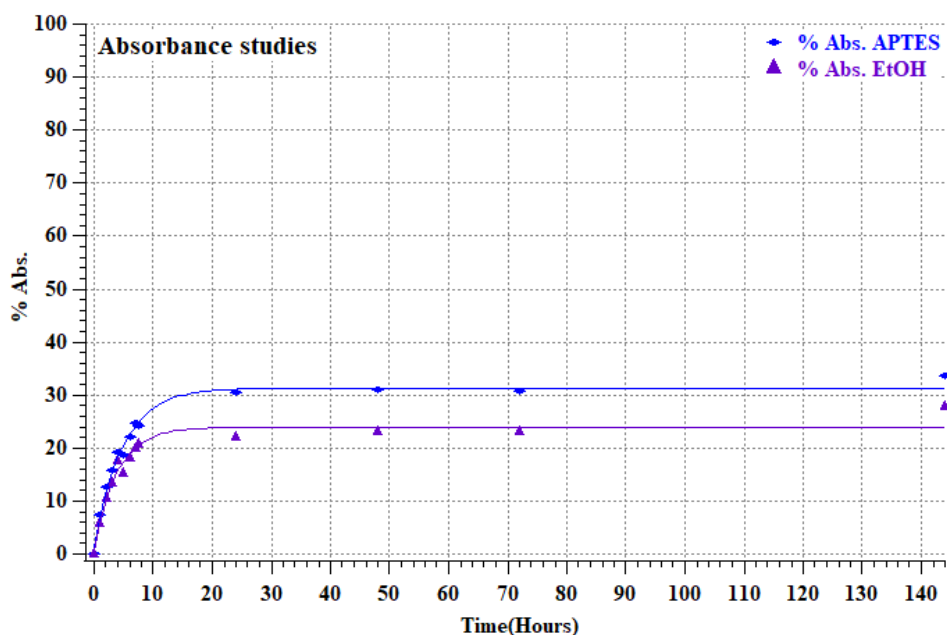


Διάγραμμα 27. Προσαρμογή καμπύλης [$Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$] στα αποτελέσματα % Απορρόφησης του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7) που περιείχε 3.33 mmol ETID, σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Στόχος των μελετών απορρόφησης του ETID στην άδεια υδρογέλη, ήταν να υποβληθεί μετέπειτα σε μελέτες αποδέσμευσης και να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα αναφοράς για τα πειράματα σιλιανοποίησης μέσω προσρόφησης. Ωστόσο, αυτό ήταν αδύνατο, διότι στο πέρας των μελετών προσρόφησης η υδρογέλη είχε συγχωνευτεί πλήρως με την υπερκείμενη φάση. Για αυτό τον λόγο, στα πειράματα προσρόφησης των οργανοσιλανίων παρουσία του ETID, προσδιοριζόταν η συνολική ποσότητα του φαρμάκου που προσροφήθηκε και ως control παρασκευαζόταν υδρογέλη με την μέθοδο της απλής διασποράς που περιείχε στα συστατικά την ίδια ποσότητα ETID.

ii. Lap-APTES

Στο **Διάγραμμα 28** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % απορρόφησης του APTES από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (pH = 7) που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7) που περιείχε 4.41 mmol APTES (Προσδιορίστηκε η μέγιστη ποσότητα μέσω ^1H qNMR). Επίσης, αναπαριστάται και η % απορρόφηση της αιθανόλης που βρισκόταν στο διάλυμα. Για την ποσοτικοποίηση του APTES χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα της κορυφής στα **3.03 ppm** ενώ για την ποσοτικοποίηση της αιθανόλης η κορυφή στα **3.66 ppm**. Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες κορυφές, διότι ήταν οι καλύτερα διαχωρισμένες από την βάση του φάσματος (baseline separated signals), που αποτελεί προϋπόθεση για το qNMR. Παρατηρήθηκε ότι το σύστημα εμφανίζει παρόμοια κινητική με τις μελέτες αποδέσμευσης του ETID. Συνεπώς, προσαρμόστηκε η καμπύλη κανονικοποίησης $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$ προκειμένου να υπολογιστεί η συνολική % ποσότητα APTES που απορροφήθηκε. Στο **Διάγραμμα 28** αναπαριστάται η προσαρμοσμένη καμπύλη και ο προσδιορισμός των σταθερών A, B και C. Η άδεια υδρογέλη απορρόφησε συνολικά από την υπερκείμενη φάση περίπου **31 %** APTES και **24 %** αιθανόλη.

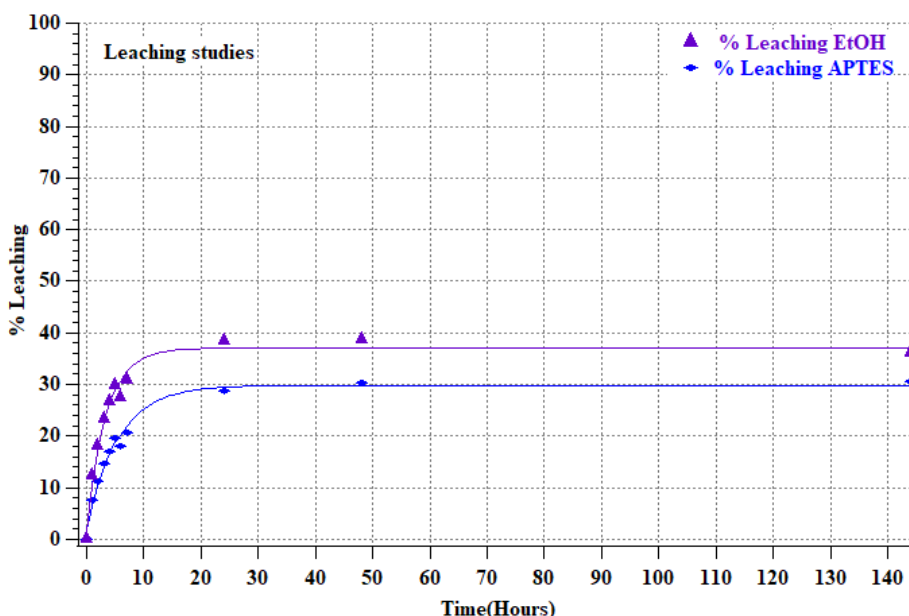


Διάγραμμα 28. % Απορρόφηση APTES και αιθανόλης από την ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7) από άδεια υδρογέλη 3 % w/w Iap. XL-21 XR (pH = 7), σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 29. Προσδιορισμός της ποσότητας (%) APTES και αιθανόλης που απορροφήθηκαν από την άδεια υδρογέλη.

Υπερκείμενη φάση	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Absorbed	% w/w in the gel
4.41 mmol APTES	APTES	A = -30.127 B = 0.20703 C = 31.312	31.31	3.06
	Ethanol	A = -23.444 B = 0.25616 C = 23.922	23.92	1.16

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων προσρόφησης, μελετήθηκε η πιθανή διαρροή του οργανοσιλανίου. Στο **Διάγραμμα 29** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % διαρροής των προσροφημένων ενώσεων APTES και αιθανόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες), όπου έχουν προσαρμοστεί σε καμπύλη $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$. Οι μελέτες διαρροής πραγματοποιήθηκαν σε υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (50 mL), ρυθμισμένη σε pH = 7.4. Μετά τον προσδιορισμό των σταθερών A, B και C προσδιορίστηκε ότι διέρρευσε από την υδρογέλη συνολικά το **30 %** της προσροφημένης ποσότητας του APTES και το **37 %** της προσροφημένης αιθανόλης. Οι προαναφερόμενες τιμές αναπαριστώνται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 30**.



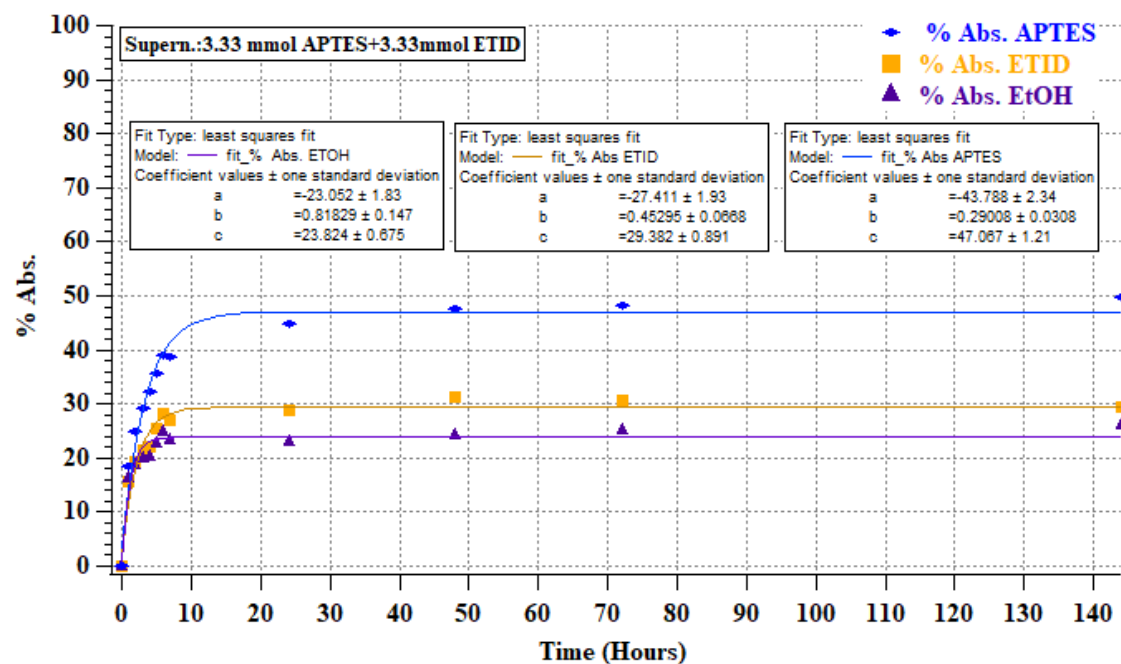
Διάγραμμα 29. Μελέτες διαρροής (%) του προσροφημένου οργανοσιλανίου APTES και της προσροφημένης αιθανόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 30. Προσδιορισμός σταθερών A, B και C από της προσαρμογή της εξίσωσης κανονικοποίησης στα δεδομένα διαρροής (%) και υπολογισμός του συνολικού ποσοστού (%) διαρροής.

Μελέτες διαρροής σε pH = 7.4	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Leached	% w/w in the gel (remained)
1.38 mmol APTES σε 3 % w/w Lap.XL-21 XR	APTES	A = -28.009 B = 0.18163 C = 29.835	29.84	2.14
	Ethanol	A = -35.476 B = 0.293 C = 37.054	37.10	0.69

Στο Διάγραμμα 30 αναπαριστώνται τα αποτελέσματα μελετών απορρόφησης APTES ($n_{\text{real}} = 4.23 \text{ mmol}$) και ETID ($n_{\text{real}} = 3.98 \text{ mmol}$) που εμπεριέχονταν σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7, από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως «% Απορρόφηση» σε συνάρτηση με τον χρόνο και προσαρμόστηκε η εξίσωση κανονικοποίησης $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$, προκειμένου να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα που απορροφήθηκε. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι το σύστημα απορρόφησε περίπου 47 % APTES και 29 % ETID από την υπερκείμενη φάση. Η αύξηση απορρόφησης των δύο συστατικών όταν υπάρχουν μαζί στην ίδια υπερκείμενη φάση, σε αντίθεση με όταν είναι ξεχωριστά υποδηλώνει την ελκτική αλληλεπίδραση τους που συμβάλει συνεργητικά στην απορρόφηση τους. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε περίπου 24 %

απορρόφηση αιθανόλης.



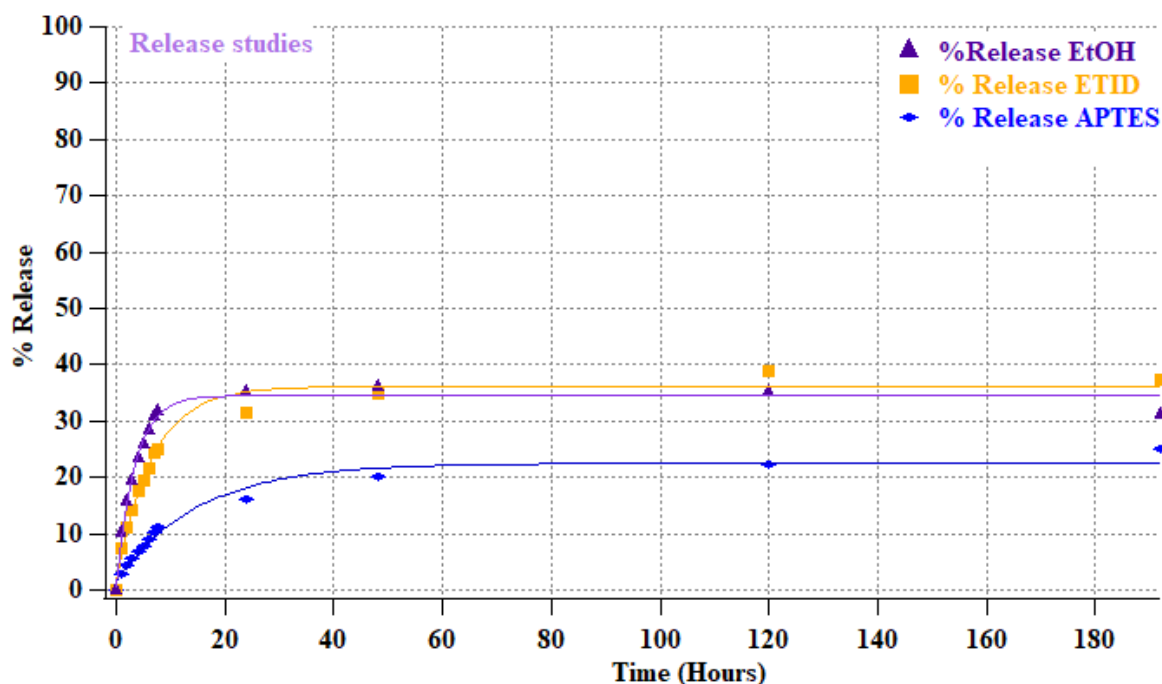
Διάγραμμα 30. Μελέτες προσρόφησης ETID, APTES και αιθανόλης που περιέχονταν σε υπερκείμενη φάση 50 mL (pH = 7) από υδρογέλη 3 % w/w Lap.XL 21 XR (pH=7). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 31. Προσδιορισμός % ποσότητας ETID, APTES και αιθανόλης που απορροφήθηκαν από την άδεια υδρογέλη.

Μελέτες Απορρόφησης σε pH = 7 (50 mL)	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Absorbed	% w/w in the gel
4.23 mmol APTES : 3.98 mmol ETID	APTES	A = -43.788 B = 0.29008 C = 47.067	47.07	4.01
	ETID	A = -27.411 B = 0.45295 C = 29.382	29.38	2.41
	EtOH	A = -23.052 B = 0.81829 C = 23.824	23.82	1.12

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων προσρόφησης, μελετήθηκε η πιθανή διαρροή του οργανοσιλανίου. Στο **Διάγραμμα 31** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % διαρροής των προσροφημένων ενώσεων APTES και αιθανόλης και της % αποδέσμευσης του ETID σε

συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες), όπου έχουν προσαρμοστεί σε καμπύλη $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$. Οι μελέτες διαρροής πραγματοποιήθηκαν σε 50 mL υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4. Μετά τον προσδιορισμό των σταθερών A, B και C προσδιορίστηκε ότι διέρρευσε από την υδρογέλη συνολικά το **30 %** της προσροφημένης ποσότητας του APTES και το **37 %** της προσροφημένης αιθανόλης. Οι προαναφερόμενες τιμές αναπαριστώνται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 32**.

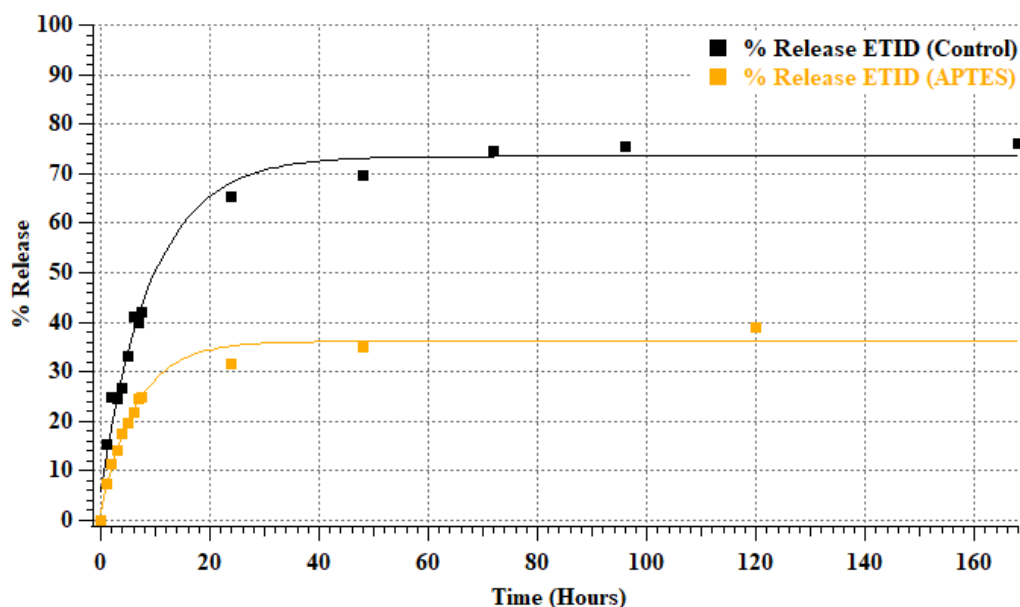


Διάγραμμα 31. Μελέτες % διαρροής του προσροφημένου οργανοσιλανίου και της προσροφημένης αιθανόλης καθώς και % αποδέσμευση του ETID σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 32. Προσδιορισμός % ποσότητας ETID, APTES και αιθανόλης που διέρρευσαν ή αποδεσμεύτηκαν από την υδρογέλη.

Μελέτες Διαρροής/Αποδέσμευσης σε pH = 7.4 (50 mL)	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Leached	% w/w in the gel (remained)
1.99 mmol APTES: 1.17mmol ETID	APTES	A = -20.906 B = 0.06628 C = 22.494	22.49	2.97
	ETID	A = -34.603 B = 0.15052 C = 36.139	36.13	2.41
	EtOH	A = -34.016 B = 0.2908	34.52	1.12

Στο **Διάγραμμα 32** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % αποδέσμευσης του ETID από υδρογέλες: (**α**) 3 % w/w Lap. XL-21 XR/1.17 mmol ETID (pH = 7) ως σύστημα αναφοράς και (**β**) 3 % w/w Laponite XL-21 XR-2.97 % w/w APTES παρουσία 1.17 mmol ETID σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού (pH = 7.4). Παρατηρήθηκε μείωση του αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης σε **0.55 $\mu\text{mol}/\text{min}$** στην υδρογέλη που είχε προσροφηθεί το οργανοσιλάνιο APTES συγκριτικά με το control (**0.79 $\mu\text{mol}/\text{min}$**). Παράλληλα η % τιμή του πλατώ μειώθηκε από 74 % σε περίπου 36 %. Γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς το οργανοσιλάνιο έχει τροποποιήσει την αργλική επιφάνεια με ομοιοπολικό τρόπο, διαθέτοντας εκτεθειμένες τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες. Κατά αυτό τον τρόπο το ETID μπορεί να αναπτύξει ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και να επιβραδυνθεί η αποδέσμευσή του. Στον **Πίνακα 33** αναγράφονται οι χαρακτηριστικοί χρόνοι (t_p και $t_{1/2}$) που υπολογίστηκαν για το κάθε σύστημα.



Διάγραμμα 32. Αποδέσμευση (%) του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR/1.17 mmol ETID και υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR: 2.97 % w/w APTES παρουσία 1.17 mmol ETID σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού (pH = 7.4). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

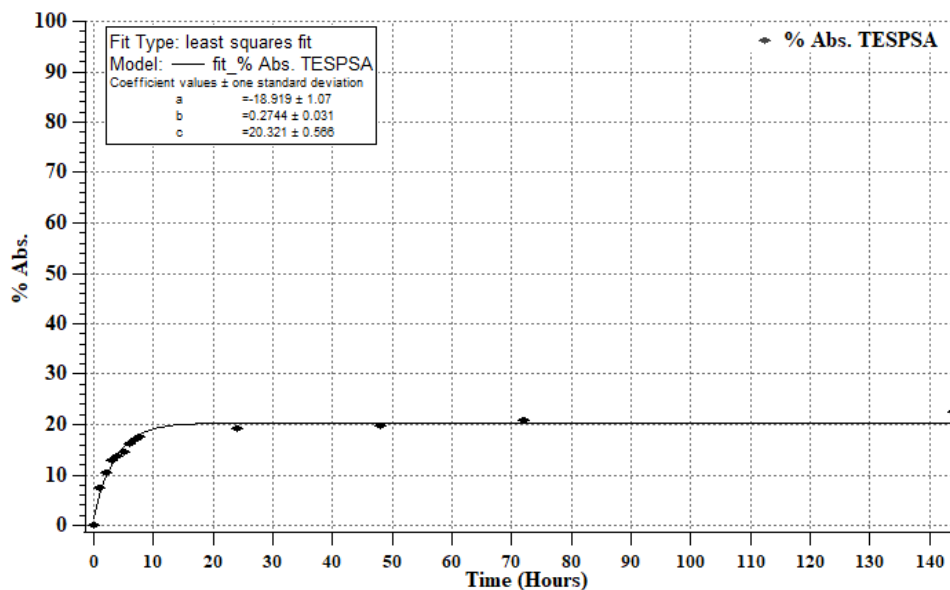
Πίνακας 33. Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών κινητικών σταθερών που προσδιορίστηκαν για το κάθε σύστημα στο Διάγραμμα 32.

Σύστημα	Initial rate (μmol/min)	Plateau BP (%)	t _p (hours)	t _{1/2} (hours)
Control	0.79	73.50	21.8	5.7
2.97 % APTES	0.55	36.14	12.9	4.3

iii. Lap-TESPSA

Στο **Διάγραμμα 33** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % απορρόφησης του οργανοσιλανίου TESPSA από υδρογέλη 3 % w/w Laponite[®] XL-21 XR (pH = 7) που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH = 7) που περιείχε 2.81 mmol TESPSA (η μέγιστη ποσότητα προσδιορίστηκε μέσω ¹H qNMR). Για την ποσοτικοποίηση του TESPSA χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα της κορυφής στα **0.70 ppm**, διότι ήταν καλύτερα διαχωρισμένη από την βάση του φάσματος (baseline separated signals), που αποτελεί προϋπόθεση για το qNMR. Η κινητική προσρόφησης του TESPSA προσομοιάζει την κινητική αποδέσμευσης, συνεπώς εφαρμόστηκε στα δεδομένα η εξίσωση κανονικοποίησης $Y = A \cdot \exp(-b \cdot t) + C$ για να προσδιοριστεί η μέγιστη ποσότητα προσρόφησης (Σταθερά C). Αντίστοιχα, με τις μελέτες απορρόφησης του APTES, πραγματοποιήθηκε απορρόφηση αιθανόλης από την υπερκείμενη φάση. Ωστόσο, στα παρακάτω διαγράμματα εξετάζεται μόνο η απορρόφηση του TESPSA. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε περίπου **20 %** απορρόφηση από την υπερκείμενη φάση. Κατόπιν, το σύστημα υποβλήθηκε σε μελέτες διαρροής σε υπερκείμενη φάση των 50 mL απιονισμένου νερού ρυθμισμένο σε pH = 7.4. Στο **Διάγραμμα 34** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % ποσότητας διαρροής του οργανοσιλανίου TESPSA που είχε προσροφηθεί στην άδεια υδρογέλη σε συνάρτηση με τον χρόνο. Από το **20 %** που είχε προσροφηθεί, διέρρευσε από την υδρογέλη το 49 %, συνεπώς, έχει παραμείνει εντός της υδρογέλης περίπου το 10 %. Συγκρίνοντας τα ποσοστά προσρόφησης και διαρροής του οργανοσιλανίου APTES και TESPSA, παρατηρείται ότι το σύστημα της υδρογέλης εμφανίζει μικρότερη συγγένεια ως προς το TESPSA. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του δικτύου της υδρογέλης και των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων που εμποδίζουν την προσρόφηση του και επιταχύνουν την απελευθέρωση του. Αξίζει επίσης να σημειωθεί από τα 0.29 mmol TESPSA που παρέμειναν στην υδρογέλη το 19 % (περίπου 0.056 mmol) ήταν εστεροποιημένο με αιθανόλη. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι το μικρό ποσοστό φόρτωσης σε συνάρτηση με την μερική

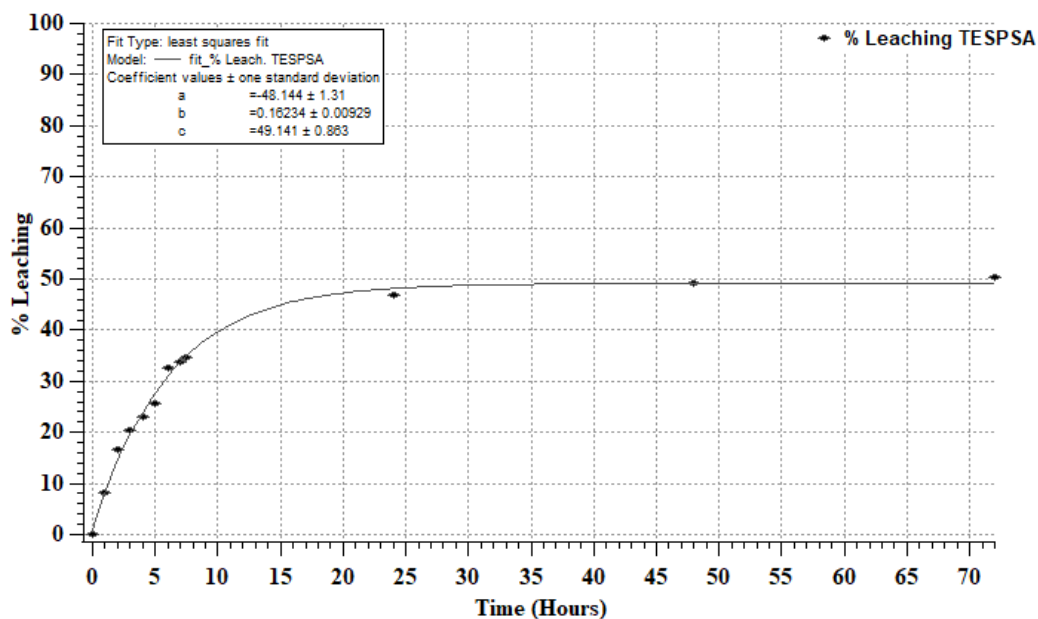
εστεροποίηση των διαθέσιμων καρβοξυλομάδων, πιθανότατα δεν θα είναι αρκετό για αν επηρεάσει την αποδέσμευση του ETID.



Διάγραμμα 33. Προσρόφηση (%) του TESPSA από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (pH = 7) όταν εκτίθεται σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού (pH = 7) που περιέχει 2.81 mmol TESPAS, σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 34. Προσδιορισμός της ποσότητας (%) TESPAS που απορροφήθηκε από την άδεια υδρογέλη.

Υπερκείμενη φάση (pH = 7)	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Absorbed	% w/w in the gel
2.81 mmol TESPAS	TESPASA	A = -18.919 B = 0.2744 C = 20.321	20.32	1.74



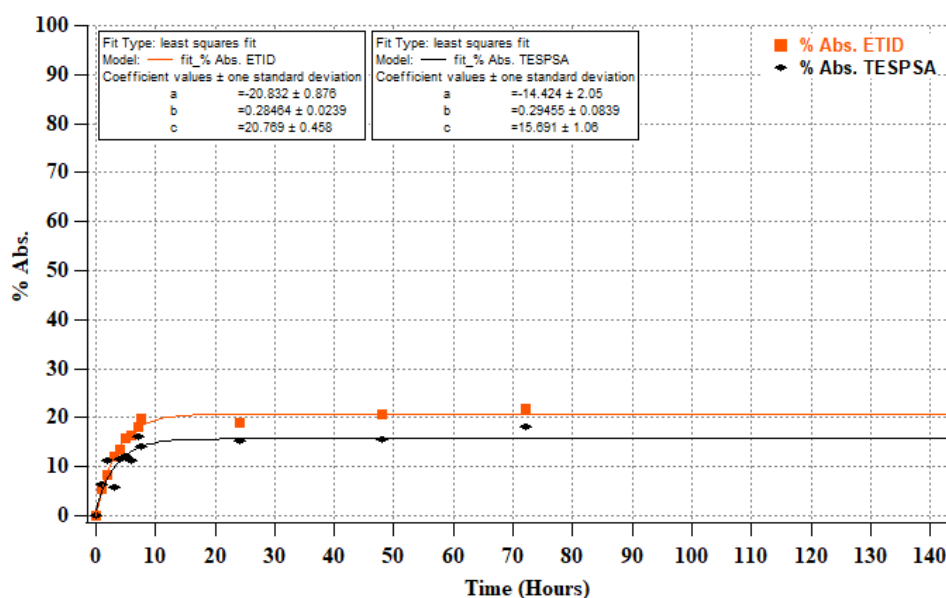
Διάγραμμα 34. Διαρροή (%) του TESPSPA από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR-1.7 % TESPSPA (pH = 7) όταν εκτίθεται σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού (pH = 7.4), σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 35. Προσδιορισμός της ποσότητας (%) του TESPSPA που διέρρευσε από την υδρογέλη.

Υπερκείμενη φάση (pH = 7.4)	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Leached	% w/w in the gel (remained)
0.57 mmol TESPSPA Στην υδρογέλη	TESPSPA	A = -18.919 B = 0.2744 C = 20.321	49.14	0.88

Προκειμένου να εξακριβωθεί το ότι η προσροφημένη ποσότητα TESPSPA δεν είναι ικανή να επηρεάσει το προφίλ αποδέσμευσης του ETID, πραγματοποιήθηκαν μελέτες προσρόφησης του TESPSPA παρουσία του ETID στην υπερκείμενη φάση. Στο **Διάγραμμα 35** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα % απορρόφησης του οργανοσιλανίου TESPSPA και του φαρμάκου ETID από υδρογέλη 3 % w/w Laponite® XL-21 XR (pH = 7) που εκτέθηκε σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση (pH=7) που περιείχε 3.57 mmol TESPSPA και 3.62 mmol ETID. Η πραγματική τιμή περιεκτικότητας του TESPSPA προσδιορίστηκε μέσω ¹H qNMR, ενώ για το ETID, μέσω ¹H qNMR και ³¹P qNMR, για να εξακριβωθεί ότι οι δύο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης συμφωνούν. Για την ποσοτικοποίηση του TESPSPA χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα της κορυφής στα **0.70 ppm**, διότι ήταν καλύτερα διαχωρισμένη από την βάση του φάσματος (baseline separated signals), που αποτελεί προϋπόθεση για το qNMR. Παράλληλα, για την ποσοτικοποίηση του φαρμάκου χρησιμοποιήθηκε το σήμα της κορυφής

στα **19 ppm** στο φάσμα ^{31}P NMR. Η κινητική προσρόφησης του TESPSA και ETID προσομοιάζει την κινητική αποδέσμευσης, συνεπώς εφαρμόστηκε στα δεδομένα η εξίσωση κανονικοποίησης $Y = A*\exp(-b*t) + C$ για να προσδιοριστεί η μέγιστη ποσότητα προσρόφησης (Σταθερά C). Αντίστοιχα με τις μελέτες απορρόφησης του APTES, πραγματοποιήθηκε απορρόφηση αιθανόλης από την υπερκείμενη φάση. Ωστόσο, στα παρακάτω διαγράμματα εξετάζεται μόνο η απορρόφηση του TESPSA και του ETID. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι απορροφήθηκε συνολικά το **16 % TESPSA** και το **21 % ETID** από την υπερκείμενη φάση. Η ελαφρώς μειωμένη τιμή προσροφημένης ποσότητας των δύο αντιδραστηρίων όταν συνυπάρχουν στην υπερκείμενη φάση, υποδηλώνει την ανάπτυξη απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του οργανοσιλανίου και του φαρμάκου που παρεμποδίζει την προσρόφηση τους στο δίκτυο της υδρογέλης.

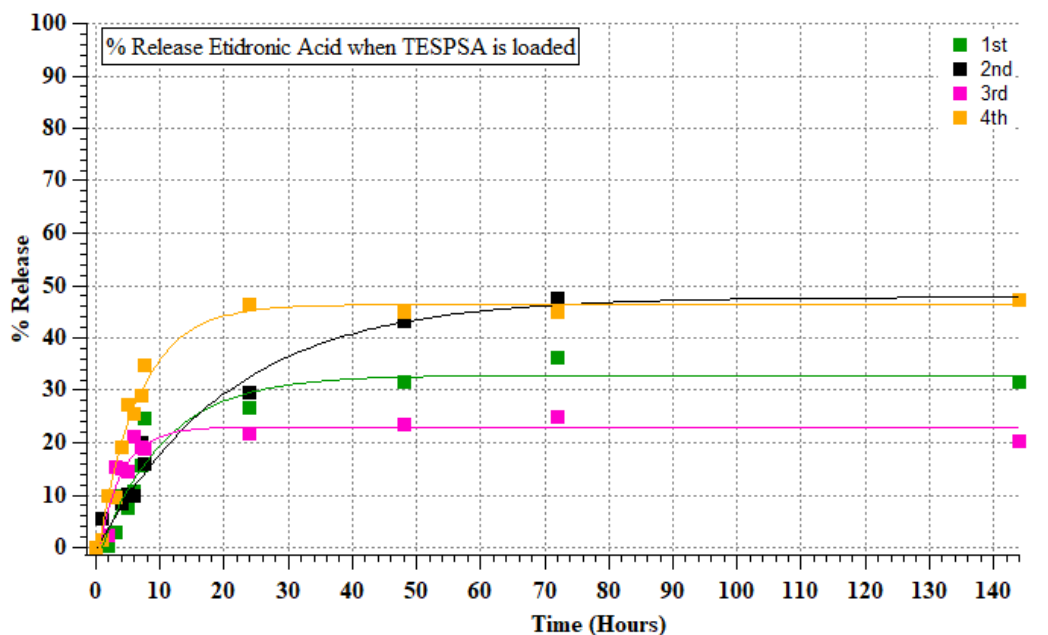


Διάγραμμα 35. Προσρόφηση (%) του TESPSA και του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR (pH = 7) όταν εκτίθεται σε υπερκείμενη φάση 50 mL απιονισμένου νερού (pH = 7) που περιέχει 3.57 mmol TESPSA και 3.62 mmol ETID, σε συνάρτηση με τον χρόνο (ώρες). Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε σύστημα.

Πίνακας 36. Προσδιορισμός της ποσότητας (%) TESPSA και ETID που απορροφήθηκε από την άδεια υδρογέλη.

Υπερκείμενη φάση (pH = 7)	Ένωση	Σταθερές A, B και C	% Absorbed	% w/w in the gel
3.57 mmol TESPSA + 3.62 mmol ETID	TESPSA	A = -14.424 B = 0.29455 C = 15.691	15.69	1.21
	ETID	A = -20.832 B = 0.28464 C = 20.769	20.78	1.49

Μετά το πέρας των μελετών προσρόφησης TESPSA, αξίζει να σημειωθεί ότι η υδρογέλη είχε μερικώς αποσταθεροποιηθεί (μέρος της ήταν σε μορφή κολλοειδούς διαλύματος αντί σταθερής υδρογέλης), γεγονός που καθιστούσε δύσκολο το διαχωρισμό της πρώτης υπερκείμενης φάσης και την εισαγωγή της δεύτερης. Η παραπάνω παρατήρηση είχε σημειωθεί και στην περίπτωση μελετών προσρόφησης αποκλειστικά του ETID από την υπερκείμενη φάση, αντίθετα δεν παρατηρήθηκε στις μελέτες προσρόφησης του APTES. Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι το προσροφημένο TESPSA πιθανότατα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα νανοσωματίδια του αργλικού υποστρώματος, απομακρύνοντας τα μεταξύ τους. Ως φυσικό επακόλουθο, μέρος της υδρογέλης μετατρέπεται σε κολλοειδές διάλυμα. Η αποσταθεροποίηση των υδρογελών έδωσε μη επαναλήψιμα αποτελέσματα στις μελέτες διαρροής/αποδέσμευσης των TESPSA και ETID (**Διάγραμμα 36**). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, η σιλιανοποίηση με το TESPSA μέσω φυσικής προσρόφησης από ήδησχηματισμένη υδρογέλη στις συγκεκριμένες συνθήκες που μελετήθηκαν (pH = 7 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) δεν είναι εφικτή.



Διάγραμμα 36. Επαναλήψεις (4) μελετών αποδέσμευσης ETID από υδρογέλες που έχουν προσροφήσει ποσότητα του οργανοσιλανίου TESPSPA. Η αποσταθεροποίηση των υδρογελών, οδηγεί στην χαμηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

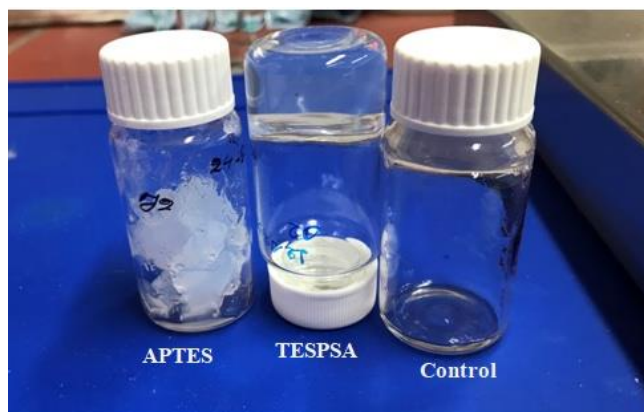
Άλλη μία πειραματική παρατήρηση που σημειώθηκε στα τα πειράματα με το οργανοσιλάνιο TESPSPA, ήταν ότι στο τέλος των μελετών διαρροής και αποδέσμευσης οι υδρογέλες είχαν διογκωθεί (όπως φαίνεται στην **Εικόνα 39**), σε αντίθεση με τα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε το οργανοσιλάνιο APTES.



Εικόνα 39. Διόγκωση υδρογελών που έχουν προσροφήσει ποσότητα του οργανοσιλανίου TESPSPA (παρουσία και απουσία του ETID) στο τέλος των μελετών διαρροής/αποδέσμευσης.

Στο τέλος των πειραμάτων διαρροής των οργανοσιλανίων APTES και TESPSPA οι υδρογέλες συλλέχθηκαν και αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 40** η υδρογέλη που είχε απορροφήσει APTES εμφάνισε θολερότητα και έλλειψη θιξοτροπικών ιδιοτήτων συγκριτικά με εκείνη που είχε προσροφήσει ποσότητα TESPSPA και το σύστημα

αναφοράς που δεν περιείχε κανένα οργανοσιλάνιο. Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει την τροποποίηση της μικροδομής του υλικού.

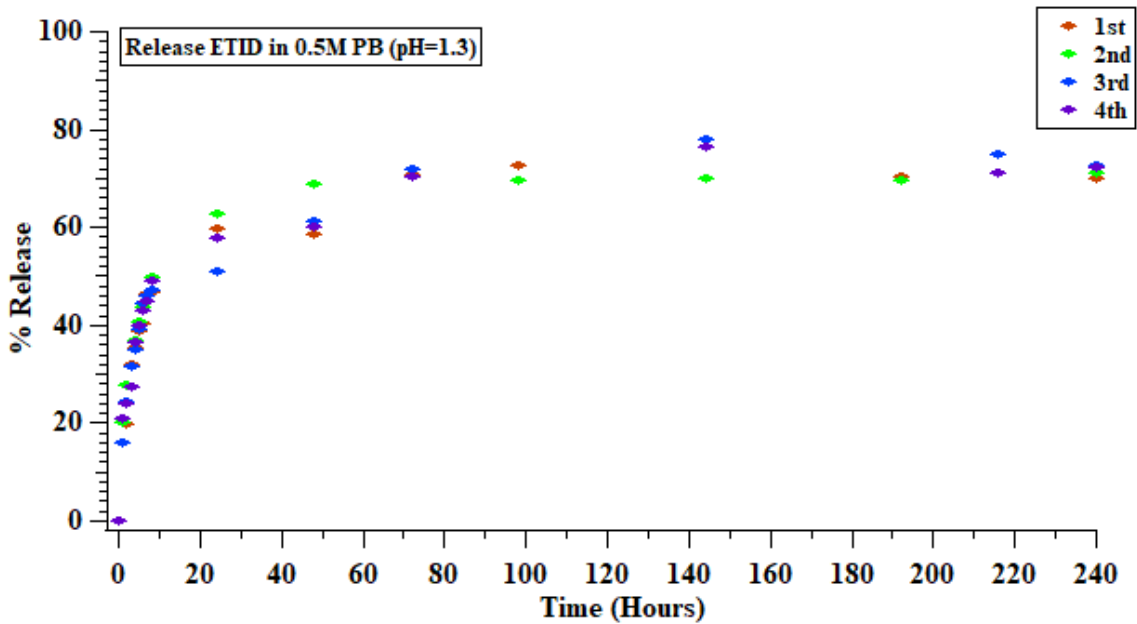


Εικόνα 40. Εμφάνιση των υδρογελών που είχαν προσροφήσει ποσότητα οργανοσιλανίων, στο τέλος των μελετών διαρροής τους (APTES και TESPSA) και σύγκριση με σύστημα αναφοράς που δεν περιείχε κάποιο οργανοσιλάνιο (Control).

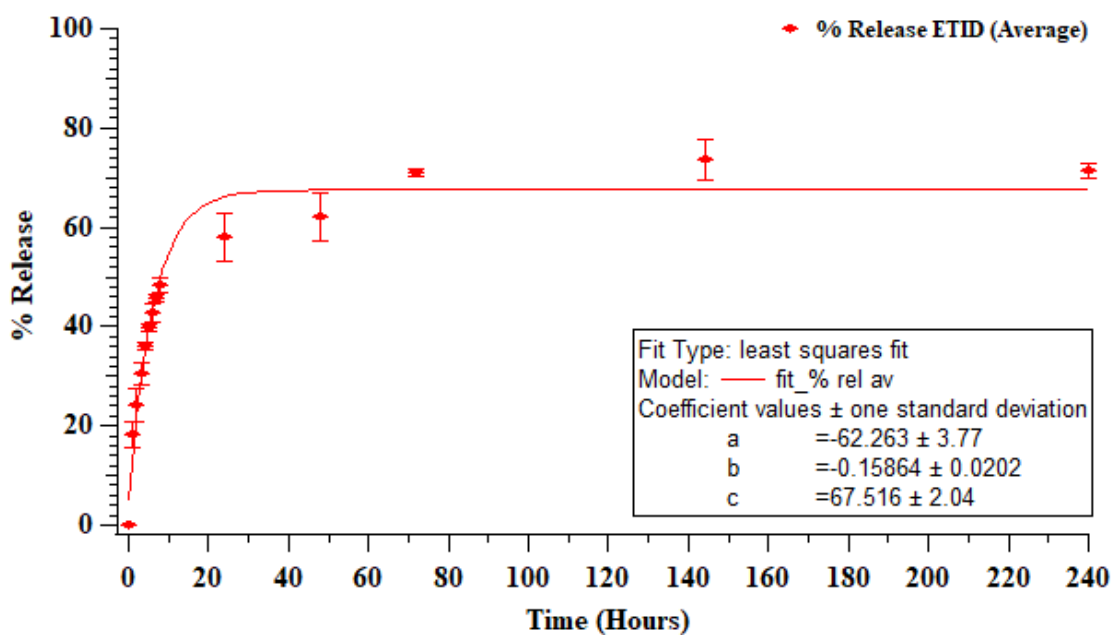
4.5. Αξιολόγηση επαναληψιμότητας πειραματικής πορείας μελετών αποδέσμευσης

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας ποσοτικοποίησης, το πείραμα για τη μελέτη της αποδέσμευσης (για συνολικό χρονικό διάστημα 240 ωρών) του διφωσφονικού φαρμάκου **ETID** πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές για τις υδρογέλες 3 % w/w Laponite® XL-21 XR/300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 50 mL 0.5 M PB (pH = 1.3). Η επαναληψιμότητα μίας σειράς μετρήσεων που έχουν ληφθεί στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους και, προφανώς, όσο η επαναληψιμότητα είναι μεγαλύτερη (καλύτερη), τόσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων. Για τα πειράματα αυτά υπολογίστηκαν ο μέσος όρος των τιμών και η τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή (average value) του δείγματος τιμών ορίζεται η τιμή γύρω από την οποία βρίσκονται συνήθως συγκεντρωμένες οι τιμές του δείγματος. Η τυπική απόκλιση (standard deviation) είναι η τετραγωνική ρίζα της διασποράς, και όσο μικρότερη είναι αυτή, τόσο καλύτερα συμφωνούν οι τιμές μεταξύ τους. Στον **Πίνακα 56**, παρουσιάζονται οι μετρήσεις της % αποδέσμευσης των τεσσάρων επαναλήψεων και τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τη μέση τιμή και τυπική απόκλιση (**STDEV**) των τιμών αυτών. Στο **Διάγραμμα 37** αναπαριστώνται τα αποτελέσματα των 4 επαναλήψεων σε μορφή γραφήματος % αποδέσμευσης του ETID ως προς τον χρόνο (ώρες). Ενώ, στο **Διάγραμμα 38** αναπαριστάται ο μέσος όρος των τιμών και το εύρος σφάλματος. Το εύρος σφάλματος (error

bars) για κάθε τιμή παρατηρείται ότι είναι αρκετά μικρό και ότι οι τιμές δεν εμφανίζουν μεγάλη διασπορά γύρω από τη μέση τιμή. Για τον λόγο αυτό μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η πειραματική διαδικασία παρουσιάζει αρκετά καλή επαναληψιμότητα.



Διάγραμμα 37. Αποδέσμευση (%) του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap. XL-21 XR/ 300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 50 mL 0.5 M PB (pH = 1.3). Το πείραμα επαναλήφθηκε τέσσερις (4) φορές.



Διάγραμμα 38. Μέσος όρος τεσσάρων (4) επαναλήψεων μελέτης % αποδέσμευση του ETID από υδρογέλη 3 % w/w Lap.XL-21 XR/300 mg ETID (pH = 7) σε υπερκείμενη φάση 50 mL 0.5 M PB (pH = 1.3).

4.6. Κινητική μελέτη Δεδομένων

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλα μαθηματικά μοντέλα για την ανάλυση των δεδομένων αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών, τα οποία συνήθως είναι μη γραμμικές εξισώσεις. Για την κινητική μελέτη των δεδομένων αποδέσμευσης στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή DDSolver που αποτελεί πρόσθετο πρόγραμμα (add-on) του Microsoft Excel, και η αξιολόγηση των κινητικών μοντέλων πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση δύο στατιστικών παραμέτρων: (α) του συντελεστή προσδιορισμού (r^2) και του κριτηρίου πληροφοριών Akaike (Akaike information criterion, AIC) [68]. Το AIC [69] αποτελεί κριτήριο επιλογής βέλτιστων μοντέλων ανάλυσης δεδομένων διαλυτοποίησης φαρμάκων και υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

$$AIC = n \cdot \ln (WSS) + 2 \cdot p$$

όπου n = αριθμός των δεδομένων, WSS = σταθμισμένο άθροισμα τετραγώνων, p = αριθμός παραμέτρων μοντέλου.

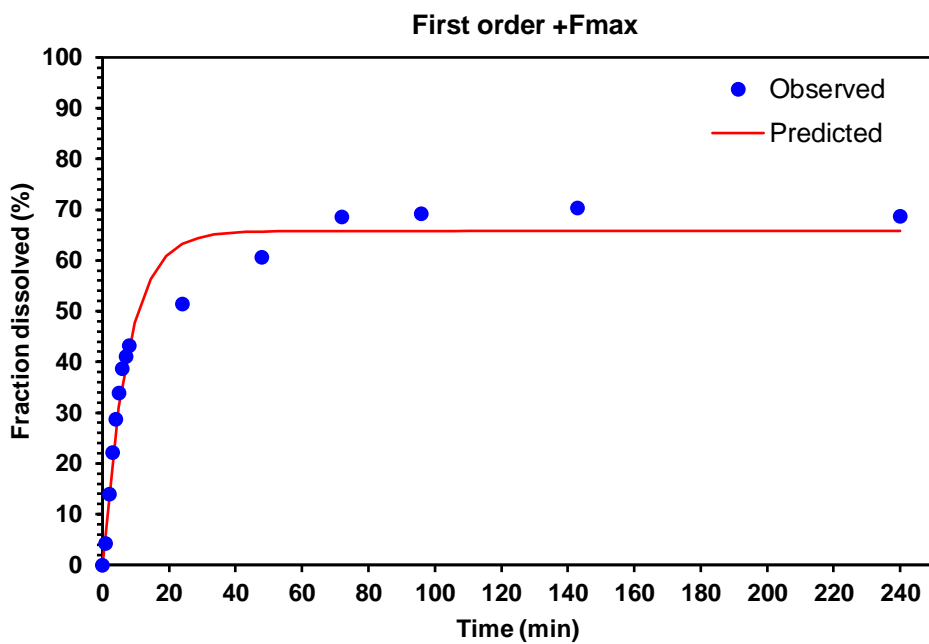
Το μαθηματικό μοντέλο με τη χαμηλότερη τιμή AIC και το μεγαλύτερο συντελεστή προσδιορισμού (r^2) θεωρείται καταλληλότερο για την ανάλυση των δεδομένων αποδέσμευσης φαρμάκων. Για την κινητική μελέτη επιλέχθηκε υδρογέλη 3 % w/w Lap.XL-21 XR/ 300 mg ETID σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση SBF (RT). Τα δεδομένα της αποδέσμευσης του ETID προσαρμόστηκαν σε διαφορετικά κινητικά μοντέλα (zero order, first order, Higushi's, Hixson-Crowell και Korsmeyer-Peppas) και οι τιμές k , r^2 και AIC συγκεντρώθηκαν στον **Πίνακα 37**. Η απλή εκθετική εξίσωση που προσαρμόστηκε σε όλες τις μελέτες αποδέσμευσης, σε όλα τα διαγράμματα της παρούσας εργασίας είναι της μορφής [$y = y_0 + A \cdot \exp(-k \cdot t)$]. Η εκθετική εξίσωση αποτελεί μια απλοποιημένη μορφή του κινητικού μοντέλου πρώτης τάξης με F_{max} και για τα περισσότερα συστήματα παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή συντελεστή προσδιορισμού (r^2). Για το λόγο αυτό, αν και δεν αποτελεί γνωστό κινητικό μοντέλο, επιλέχθηκε για την προσαρμογή των σημείων-δεδομένων στα διαγράμματα της (%) απελευθέρωσης του ETID συναρτήσει του χρόνου.

Πίνακας 37. Προσαρμογή διαφορετικών κινητικών μοντέλων στα δεδομένα αποδέσμευσης του συστήματος: Υδρογέλη 3 % w/w Lap.XL-21 XR/300 mg ETID σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση SBF (RT).

SBF RT		k	F	n	r ²	AIC
Zero order	F = k₀·t	0.456	-	-	-0.6716	144.54302
Zero order + F₀	F = F₀ + k₀·t	0.248	30.115	-	0.5117	128.0838
First order	F = 100· [1-Exp(-k₁·t)]	0.034	-	-	0.3203	131.0455
First order +F_{max}	F = F_{max}· [1-Exp(-k₁·t)]	0.134	65.816	-	0.9697	86.3772
Higushi	F=k_H·t^{0.5}	6.619	-	-	0.4530	127.7882
Hixson-Crowell	F = 100· [1-(1-k_{HC}·t)³]	0.005	-	-	0.1248	134.8364
Korsmeyer-Peppas	F = F₀ + k_{KP}·tⁿ	21.615	0.000	0.242	0.8882	107.9672

*F: ποσοστό (%) φαρμάκου που απελευθερώνεται σε χρόνο t
k₀: zero-order σταθερά απελευθέρωσης
k₁: first-order σταθερά απελευθέρωσης
k_H: Higuchi σταθερά απελευθέρωσης
k_{KP}: σταθερά απελευθέρωσης που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του δοσολογικής μορφής
k_{HC}: Hixson-Crowell σταθερά απελευθέρωσης
n: εκθέτης διάχυσης για το μοντέλο Korsmeyer-Peppas

Συγκρίνοντας τις στατιστικές παραμέτρους r² και AIC το ιδανικό κινητικό μοντέλο για την προσαρμογή των δεδομένων αποδέσμευσης είναι η κινητική πρώτης τάξης (first order) με F_{max} (όπου το F_{max} = 65.82 %), όπου η τιμή F_{max} περιγράφει το μέγιστο ποσοστό απελευθέρωσης φαρμάκου. Στο **Διάγραμμα 39** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα που λήφθηκε από την εφαρμογή DDSolver, όπου απεικονίζεται η προσαρμογή των δεδομένων της απελευθέρωσης του φαρμάκου στην κινητική πρώτης τάξης με F_{max}. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου εξαρτάται από την ποσότητα του φαρμάκου που παραμένει στη δοσολογική μορφή στο χρόνο t.



Διάγραμμα 39. Προσαρμογή κινητικού μοντέλου πρώτης τάξης με F_{max} στα δεδομένα αποδέσμευσης του ETID απόυδρογέλη 3 % w/w Lap.XL-21 XR/300 mg ETID σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση SBF (RT).

5. Συμπεράσματα και Προοπτικές

5.1. Συμπεράσματα

Η οστεοπόρωση είναι μία ασθένεια που πλήττει μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού. Γι' αυτό το λόγο, η ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών που την καταπολεμούν παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι διφωσφονικές ενώσεις αποτελούν ευρέως γνωστά αντιοστεοπορωτικά φάρμακα. Παρουσιάζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα ως αναστολείς, αλλά λόγω της περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητάς τους και της γρήγορης αποβολής τους κρίνεται αναγκαίο η συχνή χορήγηση υψηλών δόσεων για να διατηρηθεί η θεραπευτική δόση σε ικανοποιητικό επίπεδο στο πλάσμα του αίματος. Ως φυσικό επακόλουθο, η συχνή και έντονη χρήση των διφωσφονικών μπορεί να προκαλέσει ποικίλες παρενέργειες, όπως οστεονέκρωση της γνάθου, υπερκαλσιαιμία και νεφρική δυσλειτουργία. Εξαιτίας του φαρμακοκινητικού προφίλ που εμφανίζουν, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη «έξυπνων» συστημάτων αποδέσμευσης, που θα ελέγχουν τον ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου και θα το διατηρούν στην φαρμακευτική του δόση σε αποδεκτά επίπεδα για το επιθυμητό χρονικό διάστημα της εκάστοτε κλινικής περίπτωσης.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα μελετήθηκαν οι υδρογέλες Laponite® XL-21 XR ως αποκρίσιμα συστήματα αποδέσμευσης του διφωσφονικού φαρμάκου ETID. Ειδικότερα, μελετήθηκε: (α) η χημική σταθερότητα του συστήματος (β) η επίδραση διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την αποδέσμευση του φαρμάκου ETID, που βρίσκεται ενθυλακωμένο στο εσωτερικό της υδρογέλης, και (γ) η οργανική τροποποίηση του αργιλικού υποστρώματος με τα οργανοσιλάνια APTES και TESPSA με στόχο τη στοχευμένη τροποποίηση της αργιλικής επιφάνειας.

Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι οι υδρογέλες Laponite® XL-21 XR αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα που αλληλεπιδρά με την υδατική φάση με την οποία έρχεται σε επαφή. Λειτουργεί ως ημιπερατή μεμβράνη που καθιστά εφικτή την μετακίνηση ενώσεων εντός και εκτός της υδρογέλης, μέσω διάχυσης. Οι μελέτες χημικής σταθερότητας του συστήματος της υδρογέλης απουσία του ETID, έδειξαν ότι σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον του στομαχίου (pH = 1.3) παρατηρούνταν ελαφρά αποικοδόμηση του συστήματος λόγω όξινης υδρόλυσης, ενώ απελευθερώθηκαν συνολικά περίπου 14.6 % ιόντων Mg^{2+} και 1.6 % πυριτικών που περιείχονταν στα 0.3 g του αργιλικού υποστρώματος. Παρουσία του ETID η σταθερότητα του συστήματος της υδρογέλης ενισχύθηκε, καθώς απελευθερώθηκαν μόνο 2.5 % Mg^{2+} και 1.0 % πυριτικών. Σε ουδέτερες συνθήκες που προσεγγίζουν τις συνθήκες του

πλάσματος του αίματος ($\text{pH} = 7.4$), το σύστημα, απουσία του φαρμάκου ETID, εμφάνισε περιορισμένη αποικοδόμηση καθώς παρατηρήθηκε μόνο 0.4 % απελευθέρωση πυριτικών και ασήμαντη διαρροή ιόντων Mg^{2+} . Η απελευθέρωση των πυριτικών σε ουδέτερες συνθήκες, οφειλόταν στην διάχυση του νερού εντός της μήτρας της υδρογέλης που προκάλεσε διαδοχική αντίδραση υδρόλυσης και συμπύκνωση του δεσμού Μετάλλου-Οξυγόνου. Η προαναφερόμενη αντίδραση παράγει ιόντα OH^- τα οποία προσβάλλουν το πλέγμα Si-O-Si, σχάζοντας τους δεσμούς Si-O και απελευθερώνοντας πυριτικό οξύ, $\text{Si}(\text{OH})_4$. Η φόρτωση της υδρογέλης με ETID, αύξησε στο 1.8 % την απελευθέρωση των πυριτικών, διότι ως υδρόφιλη ένωση επάγει την διάχυση περισσότερης ποσότητας νερού εντός της υδρογέλης.

Αναφορικά με τις μελέτες ελεγχόμενης αποδέσμευσης του ETID, εξήχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Από την υδρογέλη απελευθερωνόταν συνολικά το 66-83 % της συνολική ποσότητας του ETID που είχε ενθυλακωθεί. Η αδυναμία απελευθέρωσης του 100 % της φορτωμένης ποσότητας οφείλεται στο γεγονός ότι το ETID αποτελεί ισχυρά πολική ένωση, και μέρος της αλληλεπιδρά μέσω ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το δίκτυο της υδρογέλης. Παράγοντες που βρέθηκαν να επηρεάζουν το συνολικό ποσοστό της αποδέσμευσης ήταν: (**α**) ο όγκος και η σύσταση της υπερκείμενης φάσης και (**β**) η θερμοκρασία διεξαγωγής της αποδέσμευσης.
2. Σε ουδέτερη υπερκείμενη φάση ($\text{pH} = 7.4$) η αποδέσμευση του ETID ήταν ταχύτερη από αυτή σε όξινες συνθήκες ($\text{pH} = 1.3$). Αυτό εξηγείται με το ότι σε $\text{pH} = 7.4$ υπερισχύει η διπλά αποπρωτονιωμένη μορφή του ETID που είναι περισσότερο διαλυτή (περισσότεροι δεσμοί ιόντος-διπόλου) και διαχέεται ευκολότερα εκτός της υδρογέλης.
3. Υπερκείμενες φάσεις με διαφορετική ιοντική σύσταση μπορούν να δώσουν ελαφρώς διαφοροποιημένα προφίλ αποδέσμευσης. Η ύπαρξη φωσφορικών ειδών στην υπερκείμενη φάση επάγει μικρή αύξηση του ρυθμού αποδέσμευσης του ETID. Ο λόγος ίσως είναι ότι το φάρμακο αλληλεπιδρά πιθανώς με τις θετικά φορτισμένες άκρες των νανοσωματιδίων, η προσρόφηση των αρνητικά φορτισμένων φορφορικών εντός της μήτρας αποσβένει μερικώς τις θετικά φορτισμένες άκρες εξασθενώντας την αλληλεπίδραση υδρογέλης-φαρμάκου. Ως φυσικό επακόλουθο, η αποδέσμευση του φαρμάκου παρουσία φωσφορικών είναι ευκολότερη.
4. Το σύστημα της υδρογέλης είναι αποκρίσιμο στη διαφοροποίηση της θερμοκρασίας διεξαγωγής των μελετών αποδέσμευσης. Συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει τον ρυθμό αποδέσμευσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το σύστημα έχει μεγαλύτερη κινητική ενέργεια, συνεπώς η διάχυση των μορίων ETID πραγματοποιείται

ταχύτερα.

5. Η συγκέντρωση του φαρμάκου ETID που έχει ενθυλακωθεί στο εσωτερικό της υδρογέλης επηρεάζει τον αρχικό ρυθμό αποδέσμευσης. Συγκεκριμένα, αν μειωθεί η αρχική συγκέντρωση παρατηρείται μείωση του αρχικού ρυθμού αποδέσμευσης, λόγω μικρότερης διαφοροποίησης συγκέντρωσης των δύο φάσεων που αποτελεί την κινητήρια δύναμη αποδέσμευσης του.

Από τα δεδομένα των πειραμάτων σιλιανοποίησης της αργλικής επιφάνειας εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

1. Στα υδατικά διαλύματα των οργανοσιλανίων APTES και TESPSA παρατηρείται η αυτοσυμπύκνωση τους προς τον σχηματισμό διμερών, τριμερών ή ακόμα και μεγαλύτερων ολιγομερών.
2. Σε υδατικό διάλυμα του οργανοσιλανίου TESPSA που έχει πραγματοποιηθεί διάνοιξη του δακτυλίου του σουκινικού ανυδρίτη, μέρος των εκτεθειμένων καρβοξυλικών ομάδων εστεροποιούνται από την διαθέσιμη αιθανόλη (που παράγεται μέσω υδρόλυσης των ομάδων Si-OCH₂CH₃).
3. Οι προσπάθειες σιλιανοποίησης της επιφάνειας του Laponite[®], εισάγοντας τα αντιδραστήρια APTES και TESPSA πριν την πήξη της υδρογέλης (παρουσία του ETID) δεν τροποποιεί με ομοιοπολικό τρόπο την υδρογέλη.
4. Μπορούν να παρασκευαστούν τα σιλιανοποιημένα παράγωγα Laponite[®] XL-21 XR-APTES και Laponite[®] XL-21 XR-TESPSA μέσω οργανικής σύνθεσης, ωστόσο με αυτό τον τρόπο εξαλείφεται η ιδιότητα ενυδάτωσης του ορυκτού που οδηγεί στον σχηματισμό υδρογελών. Η αδυναμία ενυδάτωσης του υλικού ίσως οφείλεται στον (μερικό) ολιγομερισμό των τριαλκοξυσιλανίων που φέρουν κοντά τα φύλλα Laponite[®], καθιστώντας δύσκολο στα μόρια του νερού να εισχωρήσουν.
5. Επιτεύχθηκε επιφανειακή τροποποίηση της υδρογέλης με το αντιδραστήριο APTES μέσω της μεθόδου φυσικής προσρόφησης του οργανοσιλανίου από το ήδη σχηματισμένο δίκτυο της υδρογέλης. Κατά αυτό τον τρόπο εισάχθηκαν στο σύστημα της υδρογέλης θετικά φορτισμένες αμινομάδες που οδήγησαν στην ανάπτυξη ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το ETID. Ως φυσικό επακόλουθο, μειώθηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης του. Αντίθετα, με το οργανοσιλάνιο TESPSA δεν ήταν εφικτό.

5.2. Προοπτικές

Το σύστημα υδρογέλης Laronite® παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον στις βιοεπιστήμες. Πιθανές μελλοντικές ερευνητικές μελέτες που θα επέκτειναν την υπάρχουσα γνώση για τα συγκεκριμένα συστήματα είναι:

1. Μελέτη επιρροής περιεκτικότητας του Laronite® XL-21 XR στις υδρογέλες, στην αποδέσμευση του αντιοστεοπορωτικού φαρμάκου ETID.
2. Η δοκιμή παρασκευής σταθερών υδρογελών από διαφορετικά είδη εμπορικών διαθέσιμων ειδών Laronite® και σύγκριση της αποτελεσματικότητάς τους.
3. Η ενθυλάκωση άλλων διφωσφονικών φαρμάκων και η μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσης τους με στόχο την σύγκριση της δομής τους με την δραστηριότητα που εμφανίζουν.
4. Επιχείρηση επιφανειακής τροποποίησης με μονοαλκοξυσιλάνια που δεν ολιγομερίζονται και επιχείρηση παρασκευής σταθερών υδρογελών από τα σιλανοποιημένα παράγωγα του ορυκτού.
5. Σύζευξη με πολυμερικά ικρίωματα (όπως τα πολυαιθυλενογλυκόλη, ζελατίνη ή χιτοζάνη) και μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσης των ενθυλακωμένων αντιοστεοπορωτικών φαρμάκων με στόχο την βελτιστοποίηση του συστήματος.

Οι ερευνητικές αυτές προσπάθειες θα σχημάτιζαν μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων υδρογελών σε συνθήκες που προσεγγίζουν τις βιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού. Κατά συνέπεια, θα ήταν εφικτό να εμπλουτίσουμε τις γνώσεις μας για το αν ο άργιλος Laronite® μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά και μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις στην παρασκευή αποκρίσιμων υδρογελών ως μεταφορείς για φάρμακα κατά των οστικών παθήσεων.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Graham R, Russel G. **Bisphosphonates: The first 40 years**. ELSEVIER. 2011;Bone 49(1):2-19.
- [2] Sharma U, Pal D, Prasad R. **Alkaline Phosphatase: An Overview**. Indian J Clin Biochem. 2014;29(3):269.
- [3] Francis MD, Russell RGG, Fleisch H. **Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo**. Science 1969;165:1264–6.
- [4] Publisher: John Wiley & Sons, Inc, Editors: Ernesto Brunet, Jorge L. Colón, Abraham Clearfield **Layered Materials Chemistry: Techniques to Tailor New Enabling Organic-Inorganic Materials**, Chapter: 3 Phosphonates in matrices ,Papathanasiou, Konstantinos, Demadis Konstantinos . (2015).
- [5] Roelofs, A.J. *et al.* (2008) “**Chapter 81, Bisphosphonates Mechanisms of Action**,” in *Principles of Bone Biology*. 3rd edn. San Diego: Academic Press.
- [6] Deruiter, Jack & Clark, Randall. (2002), **Endocrine Module, Bisphosphonates: Calcium Antiresorptive Agents**.
- [7] Sawamoto, K. *et al.* (2020) “**Bone-specific drug delivery for osteoporosis and rare skeletal disorders**,” *Current Osteoporosis Reports*, 18(5), pp. 515–525. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11914-020-00620-4>.
- [8] T. John Martin, Director, and Vivian Grill, Endocrinologist, St Vincent’s, **Bisphosphonates – mechanisms of action**, Australian Prescriber Vol. 23 No. 6 (130-2)2000
- [9] Alvarez, K. and Nakajima, H. (2009) “**Metallic scaffolds for bone regeneration**,” *Materials*, 2(3), pp. 790–832. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma2030790>.
- [10] Seibel, Markus J, **Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability**, *The Clinical biochemist*. Reviews vol. 26,4 (2005): 97-122.
- [11] Thomson J. **Netter's Concise Orthopaedic Anatomy**. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier - Health Sciences Division; 2015.pp 4
- [12] Kalervo Väänänen , **Mechanism of Bone Turnover**, *Annals of Medicine*, (1993) 25:4, 353-359

- [13] Li Y, Wu M, Chen W. **Osteoclast Activity: Bone Resorption/Polarization/Acidification/Proton Pumps/Chloride Channels**. Reference Module in Biomedical Sciences. 2019;.
- [14] Signe, B.-N., Nella Augusta, G. and Lars, H. (2021) “**Defining a growing and maturing skeleton and its relevance in diseases that affect skeletal growth, such as X-linked hypophosphataemia (XLH)**,” *International Journal of Rare Diseases & Disorders*, 4(1). Available at: <https://doi.org/10.23937/2643-4571/1710029>.
- [15] Drake M, Clarke B, Khosla S. **Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice**. Mayo Clinic Proceedings. 2008;83(9):1032-1045.
- [16] Lindsay R. **Modeling the benefits of pamidronate in children with osteogenesis imperfecta**. J Clin Invest. 2002 Nov;110(9):1239-41. doi: 10.1172/JCI17051.
- [17] de Villiers, T. and Goldstein, S., 2022. Bone health 2022: an update. *Climacteric*, 25(1), pp.1-3.
- [18] Alanne, A.L. **Novel Applications Related to Bisphosphorus Compounds**, *Dissertation in Health Sciences*, 2014, 212.
- [19] RUSSELL R. **Bisphosphonates: From Bench to Bedside**. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006;1068(1):367-401.
- [20] Dunn, C.J., Fitton, A. and Sorkin, E.M. (1994) “**Etidronic acid**,” *Drugs & Aging*, 5(6), pp. 446–474. Available at: <https://doi.org/10.2165/00002512-199405060-00006>.
- [21] Kiaee, G. *et al.* (2022) “**Laponite-based nanomaterials for Drug Delivery**,” *Advanced Healthcare Materials*, 11(7), p. 2102054. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.202102054>.
- [22] Liu, B. *et al.* (2020) “**Cell-loaded injectable gelatin/alginate/LAPONITE® nanocomposite hydrogel promotes bone healing in a critical-size rat calvarial defect model**,” *RSC Advances*, 10(43), pp. 25652–25661. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0ra03040f>.
- [23] Tomás, H., Alves, C.S. and Rodrigues, J. (2018) “**Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?**,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), pp. 2407–2420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>.
- [24] Chrzanowski, W., Kim, S.Y. and Abou Neel, E.A. (2013) “**Biomedical applications of Clay**,” *Australian Journal of Chemistry*, 66(11), p. 1315. Available at: <https://doi.org/10.1071/ch13361>.

- [25] Qin, X., Han, D.-H. and Zhao, L. (2019) “**Elastic characteristics of overpressure due to smectite-to-illite transition based on micromechanism analysis,**” *GEOPHYSICS*, 84(4). Available at: <https://doi.org/10.1190/geo2018-0338.1>.
- [26] Weller, M.T. *et al.* (2018) “**Materials Chemistry and nanomaterials,**” in *Inorganic Chemistry*. 7th edn. Oxford: Oxford University Press, p. 781.
- [27] Chauhan, V. *et al.* (2018) “**Numerical study of shear thickening fluid with distinct particles dispersed in carrier fluid,**” *Vibroengineering PROCEDIA*, 21, pp. 242–247. Available at: <https://doi.org/10.21595/vp.2018.20397>.
- [28] Żółek-Tryznowska, Z. (2016) “**Rheology of printing inks,**” *Printing on Polymers*, pp. 87–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-37468-2.00006-3>.
- [29] Lapasin, R. *et al.* (2020) “**Structural evolution of salt-free aqueous laponite dispersions: A study based on low-field NMR relaxometry and Rheological Investigations,**” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 602, p. 125126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125126>.
- [30] Sheikhi, A. *et al.* (2018) “**Effect of ionic strength on shear-thinning nanoclay–polymer composite hydrogels,**” *Biomaterials Science*, 6(8), pp. 2073–2083. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8bm00469b>.
- [31] Becher, T.B. *et al.* (2019) “**The structure–property relationship in LAPONITE® Materials: From Wigner glasses to strong self-healing hydrogels formed by non-covalent interactions,**” *Soft Matter*, 15(6), pp. 1278–1289. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8sm01965g>.
- [32] Das, S.S. *et al.* (2019) “**Laponite-based nanomaterials for biomedical applications: A Review,**” *Current Pharmaceutical Design*, 25(4), pp. 424–443. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190402165845>.
- [33] Dawson, J.I. and Oreffo, R.O. (2013) “**Clay: New opportunities for tissue regeneration and biomaterial design,**” *Advanced Materials*, 25(30), pp. 4069–4086. Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.201301034>.
- [34] Park, J.K. *et al.* (2008) “**Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays,**” *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2), pp. 198–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.012>.
- [35] Wheeler, P.A. *et al.* (2005) “**Synthesis and characterization of covalently functionalized Laponite Clay,**” *Chemistry of Materials*, 17(11), pp. 3012–3018. Available at: <https://doi.org/10.1021/cm050306a>.

- [36] Liu, P. *et al.* (2021) “**Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels,**” *Applied Clay Science*, 208, p. 106113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106113>.
- [37] Mongondry, P., Tassin, J.F. and Nicolai, T. (2005) “**Revised state diagram of laponite dispersions,**” *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.043>.
- [38] Narayanaswamy, R. and Torchilin, V.P. (2019) “**Hydrogels and their applications in targeted drug delivery,**” *Molecules*, 24(3), p. 603. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24030603>.
- [39] Bunker, B.C. (1994) “**Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses,**” *Journal of Non-Crystalline Solids*, 179, pp. 300–308. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(94\)90708-0](https://doi.org/10.1016/0022-3093(94)90708-0).
- [40] Mousa, M. *et al.* (2018) “**Clay nanoparticles for Regenerative Medicine and biomaterial design: A review of Clay bioactivity,**” *Biomaterials*, 159, pp.204–214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.024>.
- [41] Khatoon, N., Chu, M.Q. and Zhou, C.H. (2020) “**Nanoclay-based drug delivery systems and their therapeutic potentials,**” *Journal of Materials Chemistry B*, 8(33), pp. 7335–7351. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0tb01031f>.
- [42] Dalwadi, C.; Patel, G., *Application of Nanohydrogels in Drug Delivery Systems: Recent Patents Review. Recent Pat. Nanotechnol.*2015, 9, 17-25.
- [43] Kolesova, O.L.G.A. (2018) “**Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) uptake by candida albicans cells as biodegradable controlled drug delivery carrier.**” Available at: <https://doi.org/10.26226/morressier.5ac39997d462b8028d89a29c>.
- [44] Gaharwar, A.K. *et al.* (2013) “**Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells,**” *Advanced Materials*, 25(24), pp. 3329–3336. Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.201300584>.
- [45] GmbH, B.Y.K.C. (07/2019) “**LAPONITE-XL 21 XR Synthetic Layered Silicate Thickener of Water Phases in Cosmetic Applications.**” Data Sheet Issue
- [46] Zou, H., Wu, S. and Shen, J. (2008) “**Polymer/silica nanocomposites: Preparation, characterization, properties, and applications,**” *Chemical Reviews*, 108(9), pp. 3893–3957. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr068035q>.
- [47] Herrera, N.N. *et al.* (2005) “**Silylation of laponite clay particles with monofunctional and trifunctional vinyl alkoxysilanes,**” *Journal of Materials Chemistry*, 15(8), p. 863. Available at: <https://doi.org/10.1039/b415618h>.

- [48] Negrete *et al.* (2004) “**Aqueous dispersions of silane-functionalized laponite clay platelets. A first step toward the elaboration of water-based polymer/Clay Nanocomposites,**” *Langmuir*, 20(5), pp. 1564–1571. Available at: <https://doi.org/10.1021/la0349267>.
- [49] Pape, P.G. (2011) “**Adhesion promoters,**” *Applied Plastics Engineering Handbook*, pp. 503–517. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-3514-7.10029-7>.
- [50] Plueddemann, E.P. (1991) “**Nature of Adhesion Through Silane Coupling Agents,**” in *Silane Coupling Agents*. 2nd edn. New York: Plenum Press, pp. 116–128.
- [51] Diehl, B. *et al.* (2008) “**Principles in NMR Spectroscopy,**” in *NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis*. First. Elsevier Science Limited, pp. 12–16.
- [52] Carreras, H.Z. (2021) “**NMR Spectroscopy Principles, Interpreting an NMR Spectrum and Common Problems,**” *Technology Networks Analysis and Separation* [Preprint].
- [53] Peraro, G.R. *et al.* (2020) “**Aminofunctionalized LAPONITE® as a versatile hybrid material for chlorhexidine digluconate incorporation: Cytotoxicity and antimicrobial activities,**” *Applied Clay Science*, 195, p. 105733. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105733>.
- [54] Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Trussell, R.R. (1989) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th edn. Washington, D.C.: American Public Health Association, pp 180-185, pp 268-271.
- [55] A.D. Eaton, L.S. Clesceri, E.W. Rice, A.E. Greenberg, M.H. Franson, **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**, American Public Health Association, 2005
- [56] Coradin, T., Eglin, D. and Livage, J. (2004) “**The silicomolybdic acid spectrophotometric method and its application to silicate/biopolymer interaction studies,**” *Spectroscopy*, 18(4), pp. 567–576. Available at: <https://doi.org/10.1155/2004/356207>.
- [57] Rhee, S.-H. and Tanaka, J. (1999) “**Effect of citric acid on the nucleation of hydroxyapatite in a simulated body fluid,**” *Biomaterials*, 20(22), pp. 2155–2160. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00118-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00118-0).
- [58] Demadis, K.D., Delgado, D.J. and Moreno, P. (2008) “**Silica Scale Inhibition Relevant to Desalination Technologies: Progress and Recent Developments,**” in *Calcium Sulfate Scale: Formation and Prevention*. NY: Nova Science Publishers, pp. 249–259. ISBN: 978-1-60456-567-6

- [59] Liang, H. *et al.* (2022) “**Optimizing 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid and mechanically-activated iron ore tailings to prepare low-cost and retarded magnesium oxysulfate cement,**” *Case Studies in Construction Materials*, 17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2022.e01631>.
- [60] Niu, Y. *et al.* (2021) “**Modulating macrophage activities to promote endogenous bone regeneration: Biological mechanisms and engineering approaches,**” *Bioactive Materials*, 6(1), pp. 244–261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.012>.
- [61] Tao, Q. *et al.* (2014) “**Silylation of mechanically ground kaolinite,**” *Clay Minerals*, 49(4), pp. 559–568. Available at: <https://doi.org/10.1180/claymin.2014.049.4.06>.
- [62] Riveros, G. *et al.* (2003) “**Redox and solution chemistry of the SESO₃2⁻–Zn–EDTA²⁻ system and electrodeposition behavior of ZnSe from Alkaline Solutions,**” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 558, pp. 9–17. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0022-0728\(03\)00371-1](https://doi.org/10.1016/s0022-0728(03)00371-1).
- [63] Hafer, E. *et al.* (2020) “**Qualitative and quantitative ¹H NMR spectroscopy for determination of divalent metal cation concentration in model salt solutions, food supplements, and pharmaceutical products by using EDTA as chelating agent,**” *Magnetic Resonance in Chemistry*, 58(7), pp. 653–665. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrc.5009>.
- [64] Pek-Ing, A. and Yee-Kwong, L. (2015) “**Surface Chemistry and rheology of laponite dispersions — zeta potential, Yield Stress, ageing, fractal dimension and pyrophosphate,**” *Applied Clay Science*, 107, pp. 36–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.01.033>.
- [65] Lux, P. *et al.* (1993) “**Determination of the structure of alkoxysilane polymers in solution by natural abundance two dimensional ²⁹Si–²⁹Si inept DQF COSY NMR,**” *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31(7), pp. 623–631. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrc.1260310704>.
- [66] Surivet, F. *et al.* (1992) “**Organic-inorganic hybrid materials. 1. hydrolysis and condensation mechanisms involved in alkoxysilane-terminated macromonomers,**” *Macromolecules*, 25(17), pp. 4309–4320. Available at: <https://doi.org/10.1021/ma00043a011>.
- [67] Xie, Y. *et al.* (2010) “**Silane coupling agents used for natural fiber/polymer composites: A Review,**” *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(7), pp. 806–819. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.03.005>.

- [68] Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* **2010**, *12*(3), 263-271.
- [69] Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE T. Automat. Contr.* **1974**, *19*(6), 716-723.

7. Παραρτήματα

7.1. Μελέτες χημικής σταθερότητας των υδρογελών Laponite®XL-21 XR όταν εκτίθενται σε υδατικό μέσο

7.1.1. Μελέτες μεταβολής τιμής pH της υπερκείμενης φάσης

Πίνακας 38. Πειραματικά δεδομένα της μελέτης μεταβολής των τιμών pH της υδατικής φάσης που εκτίθενται υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 XR-300 mg ETID (pH = 7) σε (α) ουδέτερες συνθήκες και (β) Οξινες συνθήκες. Οι τιμές που αναγράφονται αποτελούν το μέσο όρο των μετρήσεων που λήφθηκαν για 2 υδρογέλες σε κάθε υπερκείμενη φάση.

Time (Days)	Av. pH (Neutral conditions)	Av. pH (Acidic conditions)
0	7.33	1.32
1	7.41	1.98
2	7.39	2.36
3	7.35	2.43
4	7.34	2.32
6	7.36	2.37
8	7.37	2.31
10	7.41	2.22

7.1.2. Μελέτες διαρροής ιόντων Mg^{2+} , μέσω τιτλοδότησης με EDTA και δείκτη EBT

Πίνακας 39. Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (ppm) που διαρρέουν τις υδρογέλες 3 % Lap. XL-21 (Control) και 3 % Lap XL-21/300 mg ETID όταν εκτίθενται σε 50 mL υπερκείμενη φάση απιονισμένου νερού ρυθμισμένη σε pH = 1.17.

pH υπερκείμενης φάσης = 1.17	3 % Lap. XL-21 (Control)	3% Lap-XL-21 /300 mg ETID
Time (Days)	Mg^{2+} (ppm)	Mg^{2+} (ppm)
0	0	0
1	3.65	7.30
2	535.04	60.58
3	492.70	86.37
4	615.57	104.62

ι. Υπολογισμοί ποσοτικοποίησης ιόντων Mg^{2+}

Το EDTA αντιδράει με τα ιόντα Mg^{2+} σε αναλογία 1:1, συνεπώς ισχύει $n_{EDTA} = n_{Mg(2+)}$

Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} εκφρασμένη σε ppm υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$\text{ppm } Mg^{2+} = C_{EDTA} (M) * V_{EDTA} (mL) * 1000 * 10^{-3} * Ar_{Mg(2+)} (g/mol) * 1001.142303 (g/L)$$

$$\text{όπου } C_{EDTA} = 0.001 M \text{ και } Ar_{Mg(2+)} = 24.3032 g/mol$$

$$\text{ή } \text{ppm } Mg^{2+} = 24.331 * V_{EDTA} (mL)$$

ii. Υπολογισμός θεωρητικής ολικής ποσότητας ιόντων Mg^{2+} στον Laponite-XL 21 XR

Η συνολική ποσότητα ιόντων Mg^{2+} υπολογίστηκε από την σχέση:

$$ppm Mg^{2+} = N (Mg) * \frac{m(Lap)}{Mr(Lap)} * Ar(Mg) * \frac{1000 mL}{V_{gel}(mL)} * 10^3$$

όπου:

$$Mr_{Laponite XL-21 XR} = 2775.02 \text{ g/mol}$$

Μοριακός τύπος: $F_{18}Mg_{16}Na_{10}O_{66}Si_{27}$ Συνεπώς $N_{Mg}=16$

$$m_{Laponite XL-21 XR} = 0.3 \text{ g}$$

$$V_{gel}=10 \text{ mL}$$

Συνεπώς $ppm Mg^{2+} = 4,203.7665$ Μετά από στρογγυλοποίηση $ppm Mg^{2+} = 4,204$

7.1.3. Μελέτες διαρροής διαλυτών ειδών $Si(OH)_4$ με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος

Πίνακας 40. Πειραματικά δεδομένα μελετών διαρροής διαλυτών πυριτικών ειδών με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος που αναπαριστώνται στο Διάγραμμα 3.

	3 % Lap. (Control)	3 % Lap. /300 mg ETID	3 % Lap. (Control)	3 % Lap. /300 mg ETID
pH υπερκείμενης φάσης	1.30		7.33	
Ώρες	ppm $Si(OH)_4$	ppm $Si(OH)_4$	ppm $Si(OH)_4$	ppm $Si(OH)_4$
0	0	0	0	0
2	99	81	21	41
24	238	181	53	190
48	269	209	68	190
72	263	205	72	185
168	282	171	68	175

i. Υπολογισμός θεωρητικής ολικής ποσότητας $Si(OH)_4$ στο Laponite® XL 21 XR

Η συνολική ποσότητα $Si(OH)_4$ υπολογίστηκε από την σχέση:

$$ppm Si(OH)_4 = N(Si) * \frac{m(lap)}{Mr(lap)} * Mr(\text{πυριτικού οξέος}) * \frac{1000mL}{V_{gel}(mL)} * 10^3$$

όπου:

$$Mr_{Laponite XL-21 XR} = 2775.02 \text{ g/mol}$$

Μοριακός τύπος: $F_{18}Mg_{16}Na_{10}O_{66}Si_{27}$ Συνεπώς $N_{Si} = 27$

$$m_{Laponite XL-21 XR} = 0.3 \text{ g}$$

$$Mr_{Si(OH)_4} = 60.084 \text{ g/mol}$$

$V_{gel} = 10 \text{ mL}$

Συνεπώς ppm $\text{Si(OH)}_4 = 17,538$

Πίνακας 41. Πειραματικά δεδομένα μελετών διαρροής διαλυτών πυριτικών ειδών με την μέθοδο του μολυβδαινοπυριτικού οξέος που αναπαριστώνται στο Διάγραμμα 4.

3 % Lap. /300 mg ETID (Σε υπερ. Φάση με pH = 7.33)	
Ώρες	Total Si(OH)₄ppm
0	0
24	40
48	255
72	281
168	339
24	319

7.2. Ελεγχόμενη αποδέσμευση ETID ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα.

7.2.1. Μεταβολή pH.

Πίνακας 42. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 7.

Acidic			Neutral		
Hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	Hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
1	7.37	0.39	1	12.40	1.84
2	7.34	0.37	2	14.45	2.05
3	7.97	1.55	3	16.15	1.26
4	13.83	4.07	4	22.64	2.80
5	17.94	1.28	5	33.63	2.81
6	20.56	4.23	6	46.47	6.97
7	27.40	13.75	7	44.45	2.02
8	27.63	12.44	8	49.14	2.63
24	54.64	2.18	24	56.54	1.43
48	63.33	3.51	48	68.05	1.64
72	67.36	4.84	72	71.57	1.11
96	70.94	0.32	96	75.44	0.52
144	70.30	0.40	143	76.27	0.02
192	72.13	0.44	240	76.84	0.01
240	71.84	3.24			

7.2.2. Αποδέσμευση σε διαφορετικής ιοντικής σύστασης υπερκείμενη φάση.

Πίνακας 43. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 8.

0.25 M PB			0.5 M PB			1 M PB		
hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	14.28	0.71	1	18.38	3.64	1	24.16	0.38
2	22.05	5.05	2	24.13	0.44	2	34.48	1.32
3	26.43	3.25	3	29.38	2.89	3	41.07	0.99
4	30.81	2.25	4	35.75	0.88	4	43.87	0.78
5	38.24	5.12	5	39.61	0.52	5	49.60	4.66
6	49.36	8.91	6	43.66	0.99	6	50.02	0.00
7	49.08	0.69	7	45.41	0.59	7	52.04	0.11
8	47.76	2.36	8	48.03	1.34	8	52.41	0.40
24	51.09	0.17	24	54.40	4.68	24	60.36	0.69
48	62.75	5.30	48	60.67	0.91	48	65.85	3.55
72	71.55	1.32	72	71.18	1.11	72	73.32	0.85
96	75.06	0.22	144	77.13	1.09	144	73.30	1.96
143	73.73	1.20	216	72.94	2.59	216	73.47	1.01
192	73.75	1.24	240	72.55	0.32			
240	74.11	2.39						

Πίνακας 44. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 10.

SBF			0.5 M PB			0.5 M Tris-HCl	
hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% release ETID
0	0	0	0	0	0	0	0
1	4.28	1.67	1	25.84	1.78	1	10.01
2	13.95	2.37	2	34.76	2.90	2	12.20
3	22.22	5.57	3	41.43	2.67	3	17.02
4	28.75	2.05	4	46.34	3.32	4	21.22
5	33.87	2.40	5	50.19	3.09	5	35.17
6	38.72	0.61	6	51.87	4.12	6	35.68
7	41.17	0.91	7	54.53	1.68	7	39.86
8	43.28	3.14	8	56.03	2.30	8	56.10
24	51.44	7.72	24	69.57	0.20	124	59.27
48	60.66	2.63	48	71.87	0.03	48	59.29
72	68.56	0.09	72	72.33	1.02	72	63.10
96	69.25	0.72	96	71.60	0.61	96	66.44

143	70.41	1.27				144	66.88
240	68.80	0.25				198	68.04
						240	68.65
						312	66.63
						384	67.89

Πίνακας 45. Ιονική σύσταση 50 mL διαλύματος SBF.

	Na ⁺	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	K ⁺	Cl ⁻
C (mM)	139.83	1.00	0.51	2.50	1.50	4.19	5.00	151.50

7.2.3. Μεταβολή θερμοκρασίας.

Πίνακας 46. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 11.

D.I water R.T (Acidic)			D.I water 36.6 °C (Acidic)		
hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
0	0	0	0	0	0
1	7.37	0.39	1	8.27	3.32
2	7.34	0.37	2	17.37	2.67
3	7.97	1.55	3	33.67	2.72
4	13.83	4.07	4	39.63	0.72
5	17.94	1.28	5	45.88	1.15
6	20.56	4.23	6	52.74	2.74
7	27.40	13.75	7	57.66	0.55
8	27.63	12.44	8	58.88	1.59
24	54.64	2.18	24	67.65	1.64
48	63.33	3.51	48	79.09	3.25
72	67.36	4.84	71	77.19	1.06
96	70.94	0.32	96	76.82	1.61
144	70.30	0.40	144	74.11	7.03
192	72.13	0.44			
240	71.84	3.24			

Πίνακας 47. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 15.

SBF R.T.			SBF 36.6°C		
hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
0	0	0	0	0	0
1	4.28	1.67	1	5.93	2.96
2	13.95	2.37	2	12.09	4.04
3	22.22	5.57	3	24.59	6.86
4	28.75	2.05	4	38.05	0.41
5	33.87	2.40	5	45.31	4.36
6	38.72	0.61	6	47.52	6.63

7	41.17	0.91	7	57.04	3.43
8	43.28	3.14	8	63.44	8.24
24	51.44	7.72	24	68.73	0.79
48	60.66	2.63	48	74.12	0.49
72	68.56	0.09	71	73.96	0.42
96	69.25	0.72	96	72.73	0.39
143	70.41	1.27	144	73.53	1.67
240	68.80	0.25			

7.2.4. Μεταβολή όγκου υπερκείμενης φάσης.

Πίνακας 48. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 16.

10 mL		20 mL		50 mL	
Ώρες	% rel. ETID (av.)	Ώρες	% rel. ETID (av.)	Ώρες	% rel. ETID (av.)
0	0	0	0	0	0
5	32.09	5	32.84	5	29.44
24	45.4	24	52.55	24	49.1
120	44.47	120	61.42	120	74.66
144	41.99	144	58.79	144	73.37
168	40.99	168	58.87	168	73.48
70 mL		100 mL		240	77.88
Ώρες	% rel. ETID (av.)	Ώρες	% rel. ETID (av.)		
0	0	0	0		
5	20.94	5	7.57		
24	38.92	24	35.82		
120	78.78	120	69.17		
144	77.85	144	76.37		
168	79.78	168	77.95		
240	86.29	240	81.93		

7.3. Προσδιορισμός τρόπου αλληλεπίδρασης ETID με το δίκτυο της υδρογέλης Laponite® XL-21 XR.

- Θεωρητικός υπολογισμός μmol ιόντων Mg^{2+} στα 0.3 g Laponite® XL-21 XR:

$$\mu\text{mol Mg}^{2+} = N(\text{Mg}) * \frac{m(\text{laponite})}{M_r(\text{laponite})} * 10^6$$

όπου:

$$M_r(\text{Laponite XL-21 XR}) = 2775.02 \text{ g/mol}$$

Μοριακός τύπος: $\text{F}_{18}\text{Mg}_{16}\text{Na}_{10}\text{O}_{66}\text{Si}_{27}$ Συνεπώς $N_{\text{Mg}} = 16$

Συνεπώς, σε 0.3 g Laponite εμπεριέχονται $n_{\text{mg}} = 1,729.71726 \mu\text{mol}$ ή $n_{\text{mg}} = 1,730 \mu\text{mol}$

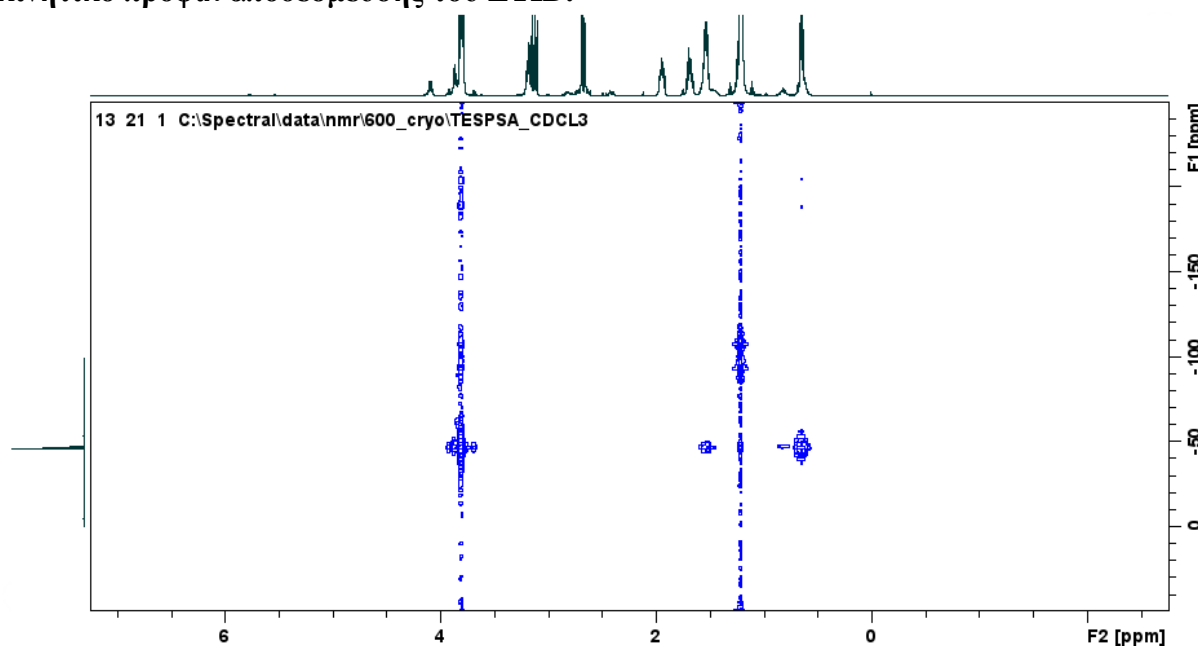
Πίνακας 49. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 19.

EDTA στην υπερκ. Φάση (1:1)		
hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
0	0	0
1	9.50	0.21
2	10.69	1.94
3	12.30	0.47
4	22.14	7.66
5	22.60	9.90
6	29.74	6.27
7	31.10	6.02
8	36.47	8.98
24	45.74	6.75
48	63.36	3.70
72	66.94	3.69
96	66.33	3.98
144	71.34	0.33
192	70.05	0.27
240	70.61	3.07

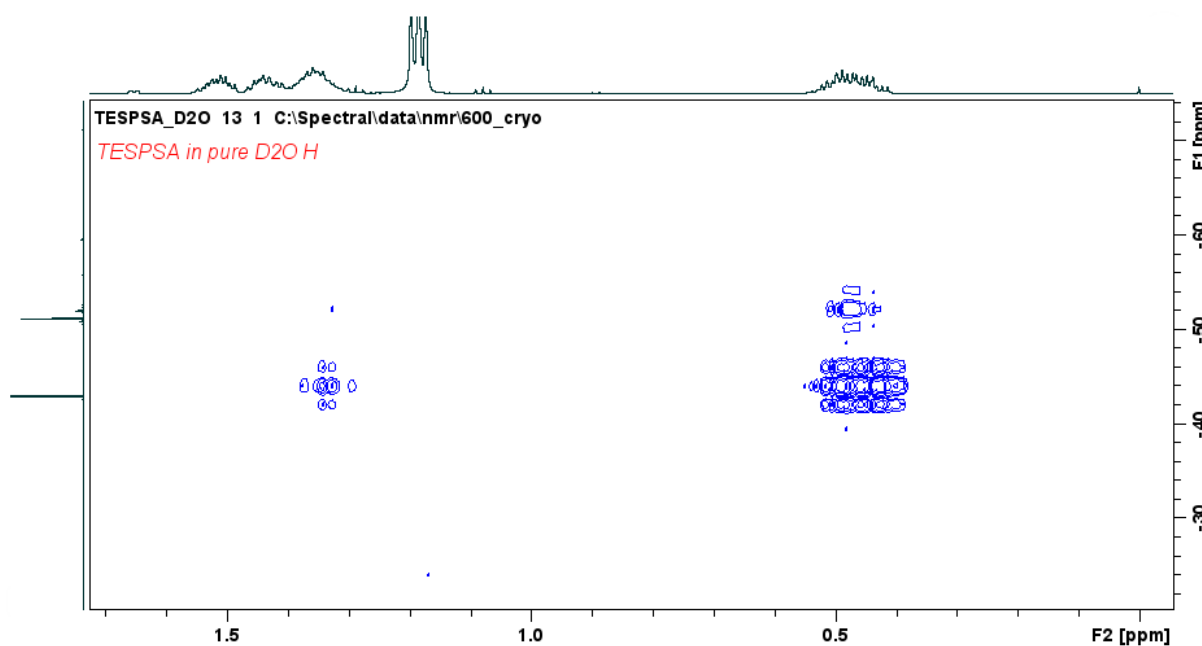
Πίνακας 50. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 20 και Διάγραμμα 21.

EDTA στην υπερκ. φάση (μειωμένη ποσότητα)		EDTA στην υδρογέλη (μειωμένη ποσότητα)				
hours	% rel. ETID (av.)	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV (ETID)	% rel. EDTA (av.)	STDEV (EDTA)
0	0	0	0	0	0	0.09
1	9.34	1	8.11	0.43	3.18	3.00
2	9.16	2	13.83	7.06	5.53	2.78
3	9.24	3	15.61	6.32	6.17	5.46
4	9.73	4	19.64	12.62	7.85	5.73
5	10.66	5	20.28	12.38	8.26	4.73
6	10.66	6	24.97	10.01	10.01	3.63
7	19.64	7	27.78	7.86	11.10	5.04
8	21.10	8	31.13	11.37	12.61	1.83
24	28.55	24	44.22	3.82	17.67	0.77
48	40.93	48	61.62	0.79	23.96	0.23
72	50.34	72	66.84	1.60	25.32	0.53
96	60.05	96	70.39	1.22	24.66	0.08
144	63.89	144	70.47	1.38	23.43	1.45
192	72.02	192	68.76	2.16	22.13	1.31
240	70.27	240	68.68	3.73	21.38	0.09

7.4. Επιφανειακή Τροποποίηση υδρογελών Laronite® XL-21 XR και η επιρροή στο κινητικό προφίλ αποδέσμευσης του ETID.



Φάσμα 14. ^{29}Si - ^1H HMBC (Heteronuclear multiple-bond coherence experiment) TESPSA σε CDCl_3 (σε 600 MHz φασματογράφο). Συσχέτιση πυριτικών με τις μεθυλενικές της πρότυλο ομάδας του TESPSA. Διαχωρισμός διαφορετικών ειδών αυτοσυμπύκνωσης του TESPSA.

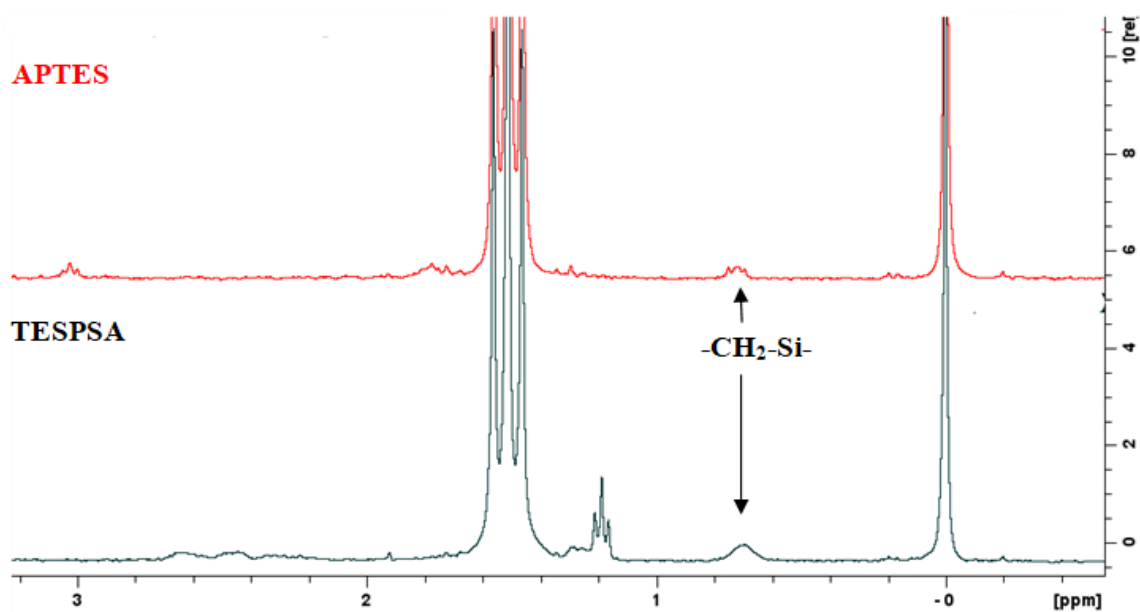


Φάσμα 15. ^{29}Si - ^1H HMBC (Heteronuclear multiple-bond coherence experiment) TESPSA σε D_2O (600 MHz). Συσχέτιση πυριτικών με τις μεθυλενικές ομάδες του πρότυλο τμήματος του TESPSA. Διαχωρισμός διαφορετικών ειδών αυτοσυμπύκνωσης του TESPSA.

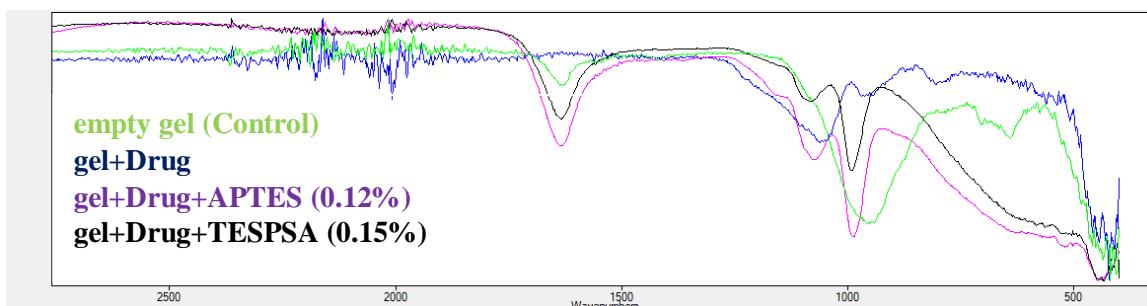
7.4.1. Τροποποίηση μέσω εισαγωγής πριν την πήξη της υδρογέλης.

Πίνακας 51. Πειραματικά δεδομένα μελετών % αποδέσμευσης στο Διάγραμμα 22.

Control			0.15 % TESPSA			0.12 % APTES		
Hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	hours	% rel. ETID (av.)	STDEV	Hours	% rel. ETID (av.)	STDEV
0	0	0	0	0	0.7	0	0	0
1	16.03	3.85	1	8.97	1.0	1	5.86	2.19
2	27.74	8.62	2	21.66	0.1	2	8.44	4.69
3	33.66	6.57	3	25.77	4.9	3	13.17	4.44
4	38.62	6.84	4	26.30	0.8	4	28.29	3.31
5	45.17	4.46	5	35.13	8.9	5	40.76	4.01
6	49.94	2.79	6	33.18	3.8	6	36.25	2.79
7	53.03	7.08	7	42.63	12.9	7	49.11	0.28
8	55.46	5.59	8	42.31	3.2	8	46.76	6.07
24	70.34	0.36	24	59.02	3.9	24	58.49	0.89
48	70.22	0.59	48	73.63	4.3	48	70.21	0.37
72	71.95	1.93	72	81.81	0.6	72	74.22	1.10
144	73.45	0.57	96	81.27	3.8	96	73.89	0.69
			144	80.60	0.7	144	76.03	1.79

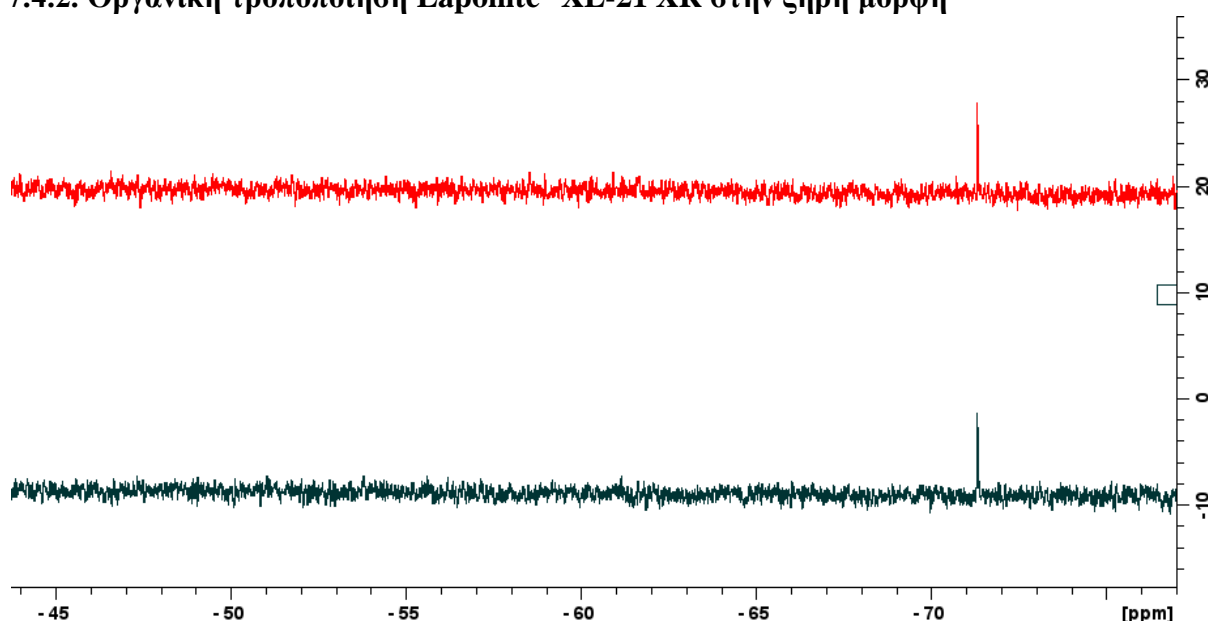


Φάσμα 16. Ενδεικτικό ^1H NMR φάσμα των μελετών αποδέσμευσης από υδρογέλες που περιείχαν τα οργανοσιλάνια APTES και TESPSA, όπου παρατηρείται διαρροή εκτός της υδρογέλης ($\delta = 0.7$ ppm).



Φάσμα 17. Φάσματα AT-IR των υδρογελών: (α) control, (β) υδρογέλη + ETID, (γ) υδρογέλη + ETID + APTES, (δ) υδρογέλη + ETID + TESPSA, αφού προηγουμένως είχαν υποστεί ξήρανση σε φούρνο.

7.4.2. Οργανική τροποποίηση Laponite® XL-21 XR στην ξηρή μορφή



Φάσμα 18. Φάσμα ^{29}Si NMR των σιλανοποιημένων παραγώγων Lap.-TESPSA (με κόκκινο χρώμα) και Lap.-APTES (με μαύρο χρώμα), αφού είχαν προηγουμένως αποικοδομηθεί σε ποσότητα NaOD. Η κορυφή στα 71.33 ppm αντιστοιχεί σε Q_0 (μονοπυριτικό οξύ, ή ανιόν).

7.4.3. Τροποποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης στην προσχηματισμένη υδρογέλη

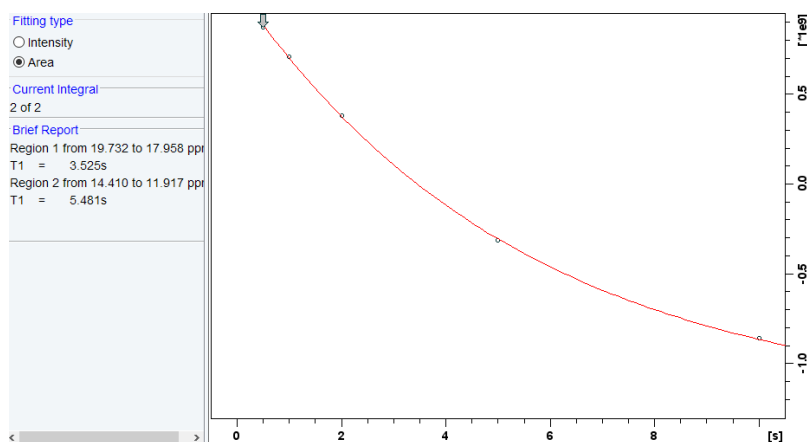
Πίνακας 52. Πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων προσρόφησης χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο APTES (Διάγραμμα 26, Διάγραμμα 28, Διάγραμμα 30).

Absorption studies	Control ETID	Control APTES		APTES+ETID		
	% Abs. ETID	% Abs. APTES	% Abs. EtOH	% Abs. APTES	% Abs. ETID	% Abs. EtOH
Hours Abs	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

1	10.36	7.99	5.77	18.39	15.71	16.28
2	12.70	12.97	10.59	24.08	19.30	18.69
3	14.84	15.90	13.29	27.91	21.38	20.04
4	17.30	19.60	17.49	30.33	22.19	20.35
5	20.18	19.29	15.21	33.34	25.49	22.60
6	19.99	22.19	18.09	36.18	28.08	24.95
7	20.62	24.90	19.91	35.13	26.94	23.19
24	22.14	24.48	20.74	41.53	28.96	23.08
48	23.84	30.55	22.05	43.68	31.17	24.24
72	25.56	31.57	23.18	43.57	30.55	25.10
144	23.79	31.61	23.10	46.44	29.57	26.18

Πίνακας 53. Πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων διαρροής και απελευθέρωσης χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο APTES (Διάγραμμα 29, Διάγραμμα 31, Διάγραμμα 32).

Release/Leaching studies	Control APTES		APTES + ETID				Control ETID	
	% leach. APTES	% leach. EtOH	Hours	% leach. APTES	% rel. ETID	% leach. EtOH	Hours	% rel. ETID
0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0	0.00
1	7.80	12.25	1	2.98	7.51	10.28	1	15.35
2	11.55	17.94	2	4.63	11.26	15.77	2	24.83
3	15.06	23.14	3	6.02	14.23	19.33	3	24.52
4	18.17	26.76	4	7.65	17.56	23.39	4	26.78
5	20.11	29.87	5	8.87	19.53	25.99	5	33.10
6	18.60	27.45	6	10.32	21.74	28.26	6	41.04
7	21.18	30.93	7	11.88	24.48	30.79	7	39.91
24	29.08	38.28	7.5	12.62	24.92	31.90	7.5	42.12
48	30.96	38.71	24	17.59	31.60	35.12	24	65.27
72	26.37	31.72	48	22.26	35.00	36.22	48	69.52
144	31.01	35.95	120	27.24	39.03	35.09	72	74.51
			192	27.50	37.45	31.15	96	75.56
							168	76.07



Εικόνα 41. Πείραμα προσδιορισμού T_1 για τα συστήματα που περιείχαν TESPSA + ETID, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση μέσω ^{31}P qNMR. Η κορυφή που αντιστοιχεί στο ETID απαιτεί 3.5 s για να χαλαρώσουν όλοι οι πυρήνες ενώ το PES απαιτεί 5.48s. Μετά την διευκρίνιση του χρόνου χαλάρωσης, χρησιμοποιήθηκε για ^{31}P qNMR το πρόγραμμα zgig30 ($T_D = 13,1072$, $DS = 4$, $NS = 32$, $TD_0 = 1$, $D_1 = 30\text{s}$, $AQ = 6.47$).

Πίνακας 54. Πειραματικά δεδομένα των μελετών προσρόφησης χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο TESPSA (Διάγραμμα 33, Διάγραμμα 35).

Absorption studies	Control TESPSA		TESPSA + ETID		
	% Abs. TESPSA	% Abs. EtOH	% Abs. TESPSA	% Abs. ETID	% Abs. EtOH
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	7.27	10.83	6.26	5.48	8.94
2	10.45	14.11	11.16	8.24	14.75
3	12.97	16.49	5.89	12.21	10.08
4	13.58	16.94	11.37	13.62	15.25
5	14.53	18.03	12.19	15.86	15.41
6	16.07	19.36	11.31	16.25	14.57
7	16.99	20.34	16.18	17.97	18.64
7.5	17.57	20.17	14.01	19.94	16.97
24	19.24	21.23	15.28	18.83	16.79
48	19.73	21.84	15.62	20.76	14.82
72	20.94	22.04	18.13	21.72	17.07
144	22.33	25.91	13.81	21.16	14.64

Πίνακας 55. Πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων διαρροής χρησιμοποιώντας το οργανοσιλάνιο TESPSA (Διάγραμμα 34).

Leaching studies	Control TESPSA	
Hours	% Leach. TESPSA	STDEV
0	0.00	0.00
1	8.04	4.72
2	16.66	0.81
3	20.31	3.81
4	22.98	3.02
5	25.67	5.13
6	32.57	6.33
7	33.68	3.84
7.5	34.52	3.35
24	46.91	0.44
48	49.07	0.61
72	50.43	0.56

7.5. Επαναληψιμότητα μεθόδου ποσοτικοποίησης.

Πίνακας 56. Πειραματικά δεδομένα μελέτης επαναληψιμότητας της πειραματικής μεθόδου (Διάγραμμα 37, Διάγραμμα 38).

Hours (1 και 2)	% rel. ETID 1	% rel. ETID 2	Hours (3 και 4)	% rel. ETID 3	% rel. ETID 4	Hours (Av.)	% rel. ETID (Av.)	STDEV
0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0	0.00
1	16.07	20.15	1	15.81	20.95	1	18.24	2.68
2	19.94	27.93	2	24.45	23.82	2	24.03	3.27
3	31.88	31.68	3	31.42	27.33	3	30.58	2.17
4	35.31	36.97	4	35.13	36.37	4	35.94	0.87
5	38.64	40.54	5	39.25	39.98	5	39.60	0.83
6	40.15	43.86	6	44.37	42.96	6	42.83	1.88
7	46.28	46.16	7	45.83	44.99	7	45.82	0.58
8	46.87	49.79	8	47.09	48.98	8	48.18	1.43
24	59.80	62.86	24	51.09	57.71	24	57.87	4.99
48	58.47	69.01	48	61.31	60.03	48	62.20	4.68
72	70.70	70.19	72	71.97	70.40	72	70.82	0.80
98	72.72	69.40	144	77.90	76.36	144	73.52	4.22
144	69.97	69.84	216	74.77	71.11	240	71.54	1.33
192	70.38	69.43	240	72.78	72.32			
240	69.78	71.27						

