

ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΔΕΟΞΥΧΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΗΤΡΕΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΪΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ

Μ. Παναγιωτοπούλου*, Σ. Παπαδάκη, Μ. Κροκίδα

Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

(*panagiot.marg@gmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια, της παρούσας εργασίας, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μικρο- και νάνο- δομών για την ενθυλάκωση του δεοξυχολικού οξέος (DCA), με εφαρμογή της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας. Πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός του DCA σε φυσικές μήτρες (ζεΐνη (ZN), υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)) και εξετάστηκε τόσο η ομοαξονική (coaxial) όσο και η μονοαξονική (uniaxial) διάταξη. Ο εγκλεισμός μελετήθηκε με τη χρήση των μεθόδων FTIR και DSC για την ανίχνευση σχηματισμών συμπλέγματος και τον προσδιορισμό των τύπων αλληλεπίδρασης μεταξύ της πολυμερικής μήτρας και της εγκλεισμένης ουσίας καθώς και την θερμική συμπεριφορά των συμπλόκων, ώστε να αξιολογηθεί η σταθερότητα των παραγόμενων δομών. Από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν η μονοαξονική (uniaxial) διάταξη λειτούργησε σταθερότερα στην περίπτωση της ZN έναντι της ομοαξονικής (coaxial) που απέδωσε καλύτερα για την HP-β-CD ενώ διαπιστώθηκε ο επιτυχής εγκλεισμός του DCA τόσο στην κυκλοδεξτρίνη όσο και στην ζεΐνη, κυρίως σε αυτή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις δύο που μελετήθηκαν.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με γνώμονα τις νέες απαιτήσεις των καταναλωτών για αποτελεσματικά φυσικά προϊόντα που στοχεύουν στην απώλεια βάρους και την προστασία της υγείας, οι εταιρείες καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής επικεντρώνονται στην ανάπτυξη προϊόντων με βάση φυσικά βιοδραστικά συστατικά. Ένα τέτοιο συστατικό συνιστά και το δεοξυχολικό οξύ (DCA) που αποτελεί ένα φυσικά απαντώμενο, χολικό οξύ, και έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τη λιπολυτική του δράση^[1,2]. Ωστόσο η εφαρμογή του περιορίζεται μόνο σε ενέσιμα σκευάσματα καθιστώντας το μη προσβάσιμο στο ευρύ κοινό, καθώς η χορήγησή του πρέπει να γίνεται αποκλειστικά από εξειδικευμένο προσωπικό. Ο εγκλεισμός του DCA σε φυσικές μήτρες μέσω της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας αποτελεί καινοτόμα λύση, καθώς οι παραγόμενες δομές υπό τη μορφή μικρο-, νανο- ινών και σωματιδίων παρουσιάζουν μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας, καλές μηχανικές ιδιότητες, προστασία του συστατικού από εξωγενείς παράγοντες και δυνατότητα σταδιακής απελευθέρωσής του στον οργανισμό. Με τη διεργασία αυτή αποφεύγεται η χρήση τοξικών διαλυτών, καθώς χρησιμοποιούνται κυρίως συστήματα αιθανόλης-νερού ενώ εξασφαλίζεται η ποιότητα και η σταθερότητα των θερμοευαίσθητων συστατικών λόγω της διεξαγωγής της διεργασίας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος^[3,4].

Στην συγκεκριμένη εργασία προτιμήθηκαν σαν μήτρες του DCA δύο φυσικά πολυμερή, η ζεΐνη και η υδροξυπροπυλ -β- κυκλοδεξτρίνη. Η ζεΐνη επιλέχθηκε, ως ένα μη τοξικό, υδρόφοβο βιοπολυμερές με ποικίλες χρήσεις στην ενθυλάκωση ουσιών, ενώ η κυκλοδεξτρίνη ως ένας οικονομικός, ευρέως χρησιμοποιούμενος αμφιφιλικός φορέας με εξαιρετικές προστατευτικές ιδιότητες (χαρακτηρισμός GRAS από τον FDA)^[5,6].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Για τις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκε δεοξυχολικό οξύ (DCA) σε σκόνη από την εταιρία Sigma-Aldrich, υδατικό διάλυμα 60 % w/v υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD, I.R.A. Istituto Ricerche Applicate, Italy) και ζεΐνη (ZN) σε νιφάδες -CP2010 (Shandong, China).

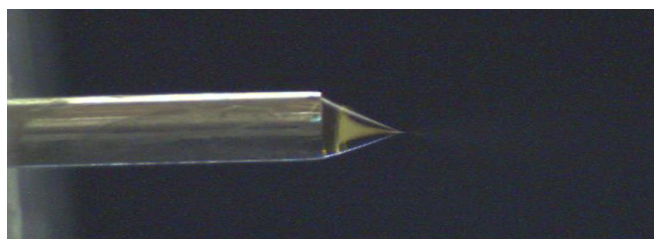
Μέθοδοι

Για μήτρα ZN: κατασκευάστηκε διάλυμα 10 mg/mL DCA σε αιθανόλη:νερό (90:10 v/v) στο οποίο προστέθηκε το πολυμερές ώστε να προκύψουν διαλύματα 5 και 10 % w/w σε ζεΐνη.

Για μήτρα HP-β-CD: κατασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/mL DCA σε αιθανόλη και χρησιμοποιήθηκε εμπορικό υδατικό διάλυμα 60 % w/v HP-β-CD.

- **Ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία**

Χρησιμοποιήθηκε το όργανο FluidNatek[®] της εταιρίας Biolnacia S.L. (Valencia, Spain) εξοπλισμένο με συσκευή υψηλής τάσης 0-30 kV. Μία βελόνα από ανοξείδωτο ατσάλι με εσωτερική διάμετρο 0,9 mm συνδέθηκε μέσω ενός σωληνίσκου PTFE σε πλαστική σύριγγα χωρητικότητας 10 ml που περιείχε το διάλυμα. Η σύριγγα τοποθετήθηκε οριζόντια πάνω σε μία ψηφιακά ελεγχόμενη αντλία, ενώ η βελόνα προσανατολίστηκε οριζόντια προς τον συλλέκτη. Η βελόνα συνδέθηκε στο θετικό πόλο της συσκευής υψηλής πίεσης. Ο στόχος τοποθετήθηκε σε απόσταση 15-17 cm από τον τριχοειδή σωλήνα ενώ η τάση ρυθμίστηκε στα 26-28 kV. Στην περίπτωση της ZN η διάταξη που εφαρμόστηκε ήταν η **μονοαξονική** καθώς μήτρα και ουσία προς ενθυλάκωση βρίσκονταν στο ίδιο διάλυμα και η αντλία σύριγγας ρυθμίστηκε ώστε να δίνει ροή 200-300 μL/h. Για την HP-β-CD εφαρμόστηκε **ομοαξονική** διάταξη με τη μήτρα και το DCA σε διαφορετικές σύριγγες. Οι αντλίες σύριγγας ρυθμίστηκαν στα 600 μL/h για την HP-β-CD και 300 μL/h για το DCA. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της ZN τοποθετήθηκε δεύτερη σύριγγα με οξικό οξύ (80-100 μL/h) ώστε να εμποδίζει την άμεση εξάτμιση της αιθανόλης. Η εγκλεισμένη ουσία συλλέγεται σε αλουμινόχαρτο που καλύπτει τον συλλέκτη ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον αρνητικό πόλο της συσκευής υψηλής τάσης.



Σχήμα 1. Ενδεικτική απεικόνιση του κώνου που δημιουργείται στην έξοδο του τριχοειδούς σωλήνα κατά την εφαρμογή τάσης για διάλυμα ZN (10 % w/w)/ DCA.

- **Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)**

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή Pyris DSC-6 της εταιρίας Perkin-Elmer (Η.Π.Α.). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ανάλυση DSC του εγκλεισμένου σε ZN DCA περιελάμβανε: θέρμανση από τους 0 °C στους 200 °C (ρυθμός 5 °C/ min) ώστε να απαλειφτεί η επίδραση της «θερμικής ιστορίας» του υλικού, στη συνέχεια ψύξη στους 0 °C (ρυθμός 20 °C/ min) και τέλος δεύτερο κύκλο θέρμανσης έως τους 200 °C. Ενώ για το αντίστοιχο σε μήτρα HP-β-CD: θέρμανση από τους 0 °C στους 260 °C, έπειτα ψύξη από τους 260 °C στους 0 °C και τέλος δεύτερο κύκλο θέρμανσης έως τους 300 °C, με τους ίδιους ρυθμούς θέρμανσης- ψύξη.

- **Εξασθενημένη ολική ανακλαστικότητα με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ATR-FTIR)**

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT/IR-4200, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) με μονάδα εξασθενημένης ολικής ανακλαστικότητας (ATR PRO-410-S). Στα δείγματα εφαρμόστηκε σάρωση σε εύρος μεταξύ 4000 και 700 cm⁻¹, ενώ κάθε μέτρηση συνίστατο από, κατά μέσο όρο, 32 σαρώσεις με ανάλυση 4 cm⁻¹.

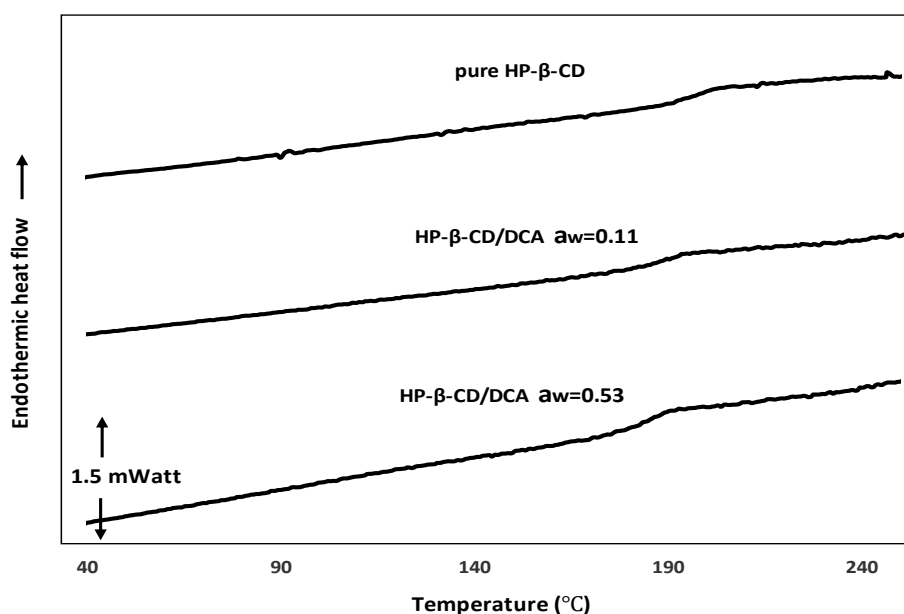
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- **Ηλεκτροϋδροδυναμική Διεργασία**

Από την εφαρμογή της μεθόδου παραλείφθηκε το εγκλεισμένο DCA στις δύο μήτρες. Στην περίπτωση της ZN συλλέχθηκε λεπτόκοκκη σκόνη ενώ με την HP-β-CD μία ενιαία αλλά εύθραυστη μεμβράνη.

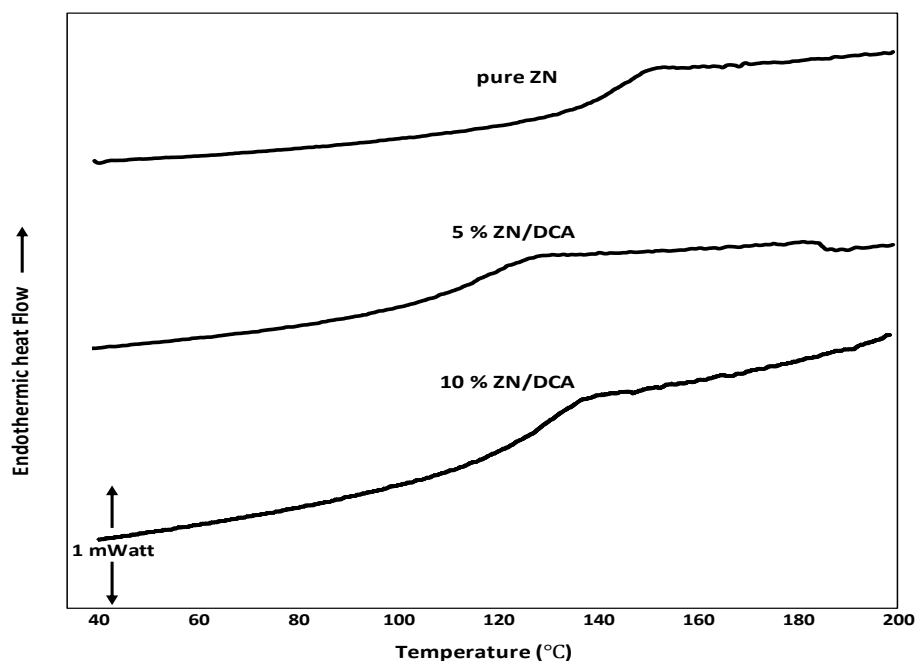
• Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στη συνέχεια και προέρχονται από το δεύτερο κύκλο θέρμανσης οπότε και έχει εξαλειφθεί η «θερμική ιστορία» των δειγμάτων εκτός του καθαρού DCA όπου έγινε μόνο ένα κύκλος θέρμανσης. Πρέπει να αναφερθεί ότι το σύνολο των δειγμάτων παρέμεινε για περίπου 2,5 εβδομάδες σε θαλάμους εξισορρόπησης υγρασίας σε a_w : 0.11 και 0.53 με συστηματική καταμέτρηση της μάζας τους ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της υγρασίας. Στην περίπτωση της ζείνης δεν διαπιστώθηκε μεταβολή σε αντίθεση με την κυκλοδεξτρίνη. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε σημείο υαλώδους μετάπτωσης δηλώνοντας τον άμορφο χαρακτήρα τους ενώ δεν εντοπίστηκε καμιά χαρακτηριστική κορυφή που να παραπέμπει στην κρυσταλλικής ένωσης του DCA (σ.τ.= 178 °C) (Σχήμα 4). Όσον αφορά λοιπόν στην HP-β-CD (Σχήμα 2) παρατηρείται υαλώδους μετάπτωση με T_g = 193,72 °C και 182,89 °C για τα δείγματα παραμονής σε a_w = 0.11 και 0.53 αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές εμφανίζονται κατά 5-10 °C μικρότερες από το T_g της καθαρής μήτρας που βρέθηκε στους 197,99 °C, τιμή πολύ κοντά στη βιβλιογραφική για ξηρή ουσία (~210-220°C)^[8]. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην καθοριστική επίδραση της υγρασίας στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Επιπλέον τα δύο T_g εμφανίζονται πολύ κοντά μεταξύ τους παρά την παραμονή τους σε πολύ διαφορετικές συνθήκες υγρασίας. Αυτό οφείλεται στο ότι με βάση την συνολική μεταβολή μάζας τους στο διάστημα των 2,5 εβδομάδων το τελικό ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας τους ήταν αντίστοιχα 0,5 και 1,3 % εξ ου και η μικρή διαφορά στο σημείο υαλώδους μετάπτωσης.

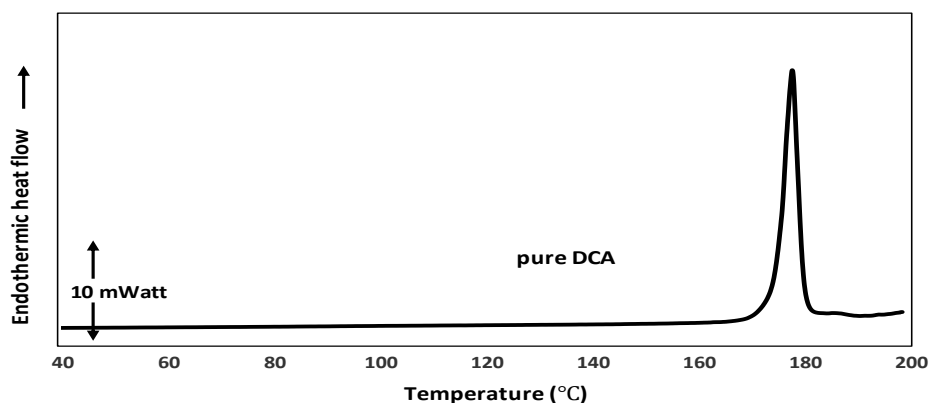


Σχήμα 2. Απεικόνιση τμήματος των διαγραμμάτων DSC για την καθαρή μήτρα και τα δείγματα HP-β-CD/ DCA μετά από παραμονή τους σε θαλάμους με a_w = 0.11 και 0.53.

Όσον αφορά στη ZN, η μεταβολή στο σημείο υαλώδους μετάπτωσης έγκειται στην διαφορετική συγκέντρωση της μήτρας (5 και 10 %) και προέκυψαν αντίστοιχα οι θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης 118,32 και 129,25 °C. Για την καθαρή μήτρα βρέθηκε T_g = 140,29 °C (Σχήμα 3) Στην βιβλιογραφία αναφέρεται για άνυδρη ζείνη T_g ≈ 139 °C^[9]. Η μετατόπιση που παρατηρείται προς μικρότερα T_g σε όλα τα δείγματα, συγκριτικά με τις καθαρές μήτρες είναι ένδειξη ότι έχει πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός.



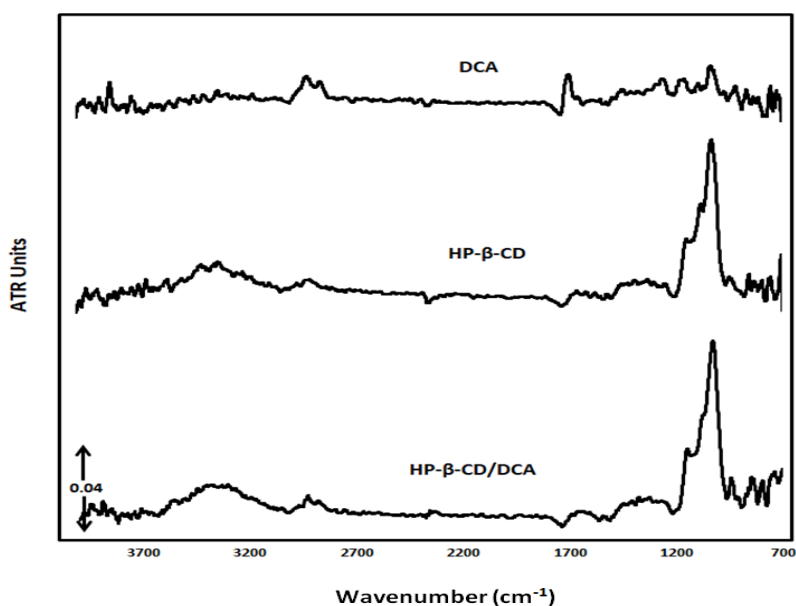
Σχήμα 3. Απεικόνιση τμήματος των διαγραμμάτων DSC για την καθαρή μήτρα και τα δείγματα ZN 5 %/ DCA και ZN 10 %/ DCA.



Σχήμα 4. Απεικόνιση τμήματος του διαγράμματος DSC το καθαρού DCA

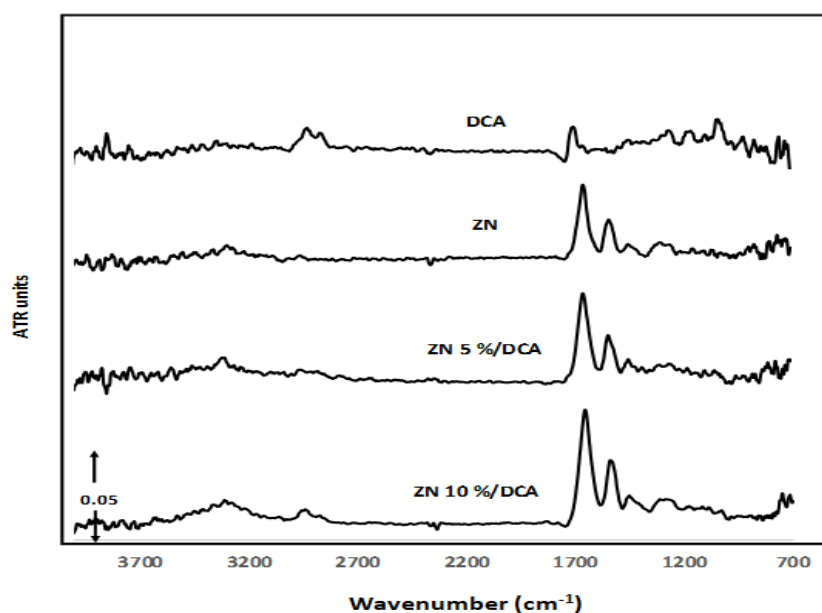
- **Εξασθενημένη ολική ανακλαστικότητα με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ATR-FTIR)**

Όσον αφορά στο DCA (Σχήμα 5, Σχήμα 6) οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 2926 με 2865 cm^{-1} συνδέονται με τη δόνηση τάσης του δεσμού C–H, στα $1705\text{-}1696\text{ cm}^{-1}$ με το δεσμό του καρβονυλίου (C=O) ενώ μία μικρής έντασης κορυφή παρατηρείται στα 1040 cm^{-1} περίπου^[10,11,13]. Αντίστοιχα για την καθαρή HP-β-CD (Σχήμα 5) παρατηρείται μια χαρακτηριστική ευρεία κορυφή στα $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων (-OH). Η κορυφή στα 2870 cm^{-1} οφείλεται στις συμμετρικές και μη συμμετρικές δονήσεις του δεσμού C–H ενώ στα 1130 με 1029 cm^{-1} αποτυπώνεται τάση των δεσμών C–H και C–O^[7]. Όσον αφορά στο γράφημα του προϊόντος από την ηλεκτροϋδροδυναμική διεργασία παρατηρείται μία εντονότερη κορυφή περίπου στα 2920 cm^{-1} σε σχέση με το φάσμα της καθαρής μήτρας που οφείλεται στην παρουσία του DCA το οποίο και εμφανίζει στο δικό του φάσμα κορυφή στο σημείο αυτό, ενώ παρατηρείται εντονότερη κορυφή στα $1130\text{-}1029\text{ cm}^{-1}$ που επίσης μπορεί να αποδίδεται στην παρουσία του συστατικού.



Σχήμα 5. Φάσμα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier για τα καθαρά DCA, HP-β-CD και το αντίστοιχο προϊόν εγκλεισμού.

Όσον αφορά στη ZN (Σχήμα 6), το φάσμα της καθαρής ουσίας εμφανίζει κορυφή μικρής έντασης στα 3350 cm^{-1} που συνδέεται με τη δόνηση της καρβοξυλικής ομάδας. Άλλες δύο μεγαλύτερης έντασης κορυφές, εντοπίζονται στα $1651\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$ λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού C=O (Αμίδιο I) και δίνουν πληροφορίες για τον κορμό της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα η ομάδα του αμιδίου I έχει βρεθεί ότι συντίθεται από πολλές ζώνες απορρόφησης, υποδηλώνοντας μεγάλη αναλογία α – ελικοειδούς διαμόρφωσης της πρωτεΐνης^[12]. Για τα φάσμα των προϊόντων ενθυλάκωσης έχουμε από το ίδιο γράφημα ότι για 5 % ZN δεν παρατηρείται καμία μεταβολή του φάσματος σε σχέση με αυτό της καθαρής μήτρας ενώ για 10 % ZN διαπιστώνεται κορυφή μικρής έντασης στα 2925 cm^{-1} η οποία εμφανίζεται και στο φάσμα το DCA ενώ είναι εντονότερη η χαρακτηριστική κορυφή στα 1651 cm^{-1} που ίσως οφείλεται σε εν μέρη κάλυψη των κορυφών του DCA.



Σχήμα 6. Φάσμα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier για τα καθαρά DCA, ZN και τα αντίστοιχα προϊόντα εγκλεισμού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, από την εφαρμογή της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας δοκιμάστηκε η ενθυλάκωση δεοξυχολικού οξέος σε μήτρα ζεΐνης και υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνης και παραλήφθηκε λεπτόκοκκη σκόνη (σωματίδια) στην πρώτη και ενιαία εύθραυστη μεμβράνη (μίγμα σωματιδίων – ιών) στην δεύτερη. Από την παραμονή των δειγμάτων σε θαλάμους εξισορρόπησης υγρασίας προέκυψε η μη επίδραση του παράγοντα αυτού στην ΖΝ που αποτελεί και υδρόφοβη ουσία, ενώ αντίθετα επηρέασε την ΗΡ-β-CD που θεωρείται εξαιρετικά υδρόφιλη. Με την ανάλυση DSC καταγράφηκε η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης των δειγμάτων με μικρές διαφοροποιήσεις από τις βιβλιογραφικές τιμές ενώ οι γενικά υψηλές τιμές των T_g υπέδειξε την σταθερότητα τους στις συνήθεις συνθήκες. Η ανάλυση των δειγμάτων με ATR-FTIR έδειξε ανίχνευση του DCA τόσο σε ΗΡ-β-CD όσο και σε ΖΝ (περισσότερο για συγκέντρωση 10 %) γεγονός που δηλώνει τον επιτυχή εγκλεισμό.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ-01716).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] B. Rzany, T. Griffiths, P. Walker, S. Lippert, J. McDiarmid, B.Havlickova. Br. J. Dermatol170 (2014) 445–453.
- [2] N.-H. Zangenberg, A. Müllertz, H.-G Kristensen, L.Hovgaard. Eur. J. Pharm. Sci.14 (2001) 115–122.
- [3] C.-G. Drosou, M.-K. Krokida, C.-G. Biliaderis. Dry Technol 35 (2017) 139–162.
- [4] S. Papadaki, K. Kyriakopoulou, M.Krokida IOSR J. Environ. Sci10 (2016) 2319–2399.
- [5] Z.-P. Liu, Y.-Y. Zhang, D.-G. Yu, D. Wu, H.-L Li. Chemical Engineering Journal 334 (2018) 807-816
- [6] A.-P. Capelezzo, L.-C. Mohr, F. Dalcanton, J.-M. Muneron de Mello, M.-A. Fiori. Intecopen (2018) 169-200.
- [7] H. Rachmawati, C. A. Edityaningrum, R. Mauludin, AAPS Pharm SciTech 14 (2013) 1303–1312.
- [8] Y. Zheng, A. Chow, Drug Development and Industrial Pharmacy35(6) (2009) 727–734.
- [9] H. Madeka, J.-L. Kokini. Cereal Chemistry. 73(4) (1996) 433–438.
- [10] J. Yang, C. Gao, S. Lü, X. Zhang, C. Yu, M. Liu. Carbohydrate Polymers 102 (2014) 838– 845.
- [11] D.- R. Telangea, R.- P. Dengea, A.- T. Patila, M.- J. Umekara, S.- V. Guptab, V.- S. Davec. J. Excipients and Food Chem. 9(3) (2018) 80-95.
- [12] S. Bancila, C.-I. Ciobanu, M. Murarius, G. Drochioiu. Rev. Roum. Chim.61 (10) (2016) 725-731.
- [13] L. Yang, Y. Xu, Y. Su, J. Wu, K. Zhao, J. Chen, M. Wang. Spectrochimica Acta Part A. 62 (2005) 1209–1215.