

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

**Granulometrie nanočástic z kopolymerů
alifatických hydroxykyselin**

Diplomová práce

Robert Šrejma

Hradec Králové 2016

Děkuji Doc. RNDr. Milanovi Dittrichovi, CSc. za odborné vedení, rady, připomínky a podněty k mé diplomové práci.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Robert Šrejma

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřená na studium vlivu složení soustavy na velikost nanočástic z alifatických polyesterů s lineární a větvenou konstitucí molekuly. Zvoleným postupem přípravy nanočástic byla emulzní metoda za rozdělování rozpouštědla. V teoretické části práce je pozornost zaměřena na nanočástice. Jejich původ, využití a stručný popis různých typů nanočástic. Dostatečný prostor je také věnován biodegradabilním polymerům, především PLGA. Krátce je zmíněno antimykotikum terbinafin, se kterým byly připraveny nanočástice zkoumané v experimentální části.

V experimentální části práce byly vyzkoušeny různé varianty vzorků kompozice s hlavním důrazem na volbu rozpouštědla polymerů a emulgátoru. Byly také aplikovány směsi rozpouštědel a emulgátorů. Jako důležitý aspekt byla hodnocena inkorporace terbinafinu jako modelového léčiva. Připravené disperze byly podrobeny stresovým podmínkám v podobě několikadenního uchovávání a centrifugace.

Abstract

The diploma thesis is focused on the study of influence on the composition of the system to the size of the nanoparticles from aliphatic polyesters with linear and branched molecules constitution. The emulsion method for distributing of solvent was chosen for preparation of nanoparticles. The theoretical part describes the nanoparticles, its origin and application. The following part is applying to biodegradable polymers, especially PLGA. There is also a mention of antifungal agent terbinafine. The nanoparticles are prepared of this substance. The process is described in the experimental part of thesis.

The experimental part is testing different composition of samples. A main emphasis is on the choice of polymer solvent and emulsifier. There are also applied mixtures of solvents and emulsifiers. The important aspect is the evaluation of incorporated terbinafine, which has been the model drug. Prepared dispersions were exposed to stress conditions in the form of several days-storage and centrifugation.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	7
2. Zadání	8
3. Teoretická část	9
3.1 Nanomateriál	9
3.2 Původ nanočástic	9
3.3 Nanočástice a jejich využití	10
3.4 Typy nanočástic	11
3.4.1 Polymery na bázi uhlíku	11
3.4.2 Polymerní nanočástice	12
3.4.3 Dendrimery	13
3.4.4 Nanočástice na bázi lipidů	14
3.4.5 Kvantové tečky.....	14
3.4.6 Kovové nanočástice	15
3.5 Biodegradabilní polymery	16
3.5.1 PLGA – kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny mléčné	17
3.5.2 Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu.....	20
3.6 Terbinafin	20
4. Experimentální část	22
4.1 Použité přístroje	22
4.2 Použité chemikálie	22
4.3 Postup přípravy a měření vzorků	23
4.3.1 Příprava baze terbinafinu	23
4.3.2 Příprava vnější fáze	23
4.3.3 Příprava vnitřní fáze	23
4.3.4 Příprava nanočástic.....	24
4.3.5. Měření velikosti částic	25
5. Výsledky	26
6. Obrázky	44
7. Diskuse	50
8. Závěry	55
9. Seznam použitých zkratk	56
10. Seznam použitých tabulek	57
11. Seznam použitých obrázků	60
12. Seznam použité literatury	62

1. Úvod

Nanotechnologie patří k jednomu z nejdiskutovanějších technologií současnosti, které poskytují vzrušující možnosti výzkumů a nových znalostí. Jako nanotechnologie se všeobecně označuje vědní (někdy technický) obor výzkumu a vývoje, jež se zabývá cíleným vytvářením a využíváním struktur materiálů v měřítku pouhých několika nanometrů (1-100 nm), tedy zhruba tisícinou tloušťky lidského vlasu. Strukturními prvky nanotechnologie jsou molekuly i samotné atomy.

Využití nanomateriálů a nanotechnologií má široké spektrum. Nanotechnologie se uplatňují často v elektronice (bioelektronika) ve strojírenství (obráběcí stroje), v chemickém a elektrotechnickém průmyslu (nanotrubice) či v optice (optické filtry). Také se užívají v průmyslu textilním, vojenském nebo automobilovém. Jejich význam roste také ve zdravotnictví a farmacii, kde slouží například k cílené dopravě léčiv. V této diplomové práci jsem se zabýval granulometrií nanočástic z kopolymerů alifatických hydroxykyselin, jako je např. PLGA.

2. Zadání

Téma předložené k řešení mělo návaznost na systematické studium procesů přípravy nanočásticových systémů z biodegradabilních polyesterů s cílem minimalizace velikosti částic. Jako nosič bylo zadáno použít lineární PLGA a PLGA větvící centrální molekulu tripentaerytritolu nebo kyseliny polyakrylové. Do těchto nosičů měl být inkorporován terbinafin v různých koncentracích. Studovanou metodou měla být běžně dostupná a využívaná metoda emulzní s možností měnit koncentraci vnitřní fáze emulze. Úkolem bylo vyzkoušet několik emulgátorů osvědčených v dříve realizovaných experimentech a několik rozpouštědel polymerů samotných nebo v dosud nevyzkoušených směsích. Dále bylo zadáno otestovat robustnost metody přípravy a odolnost disperze k procesním i vnějším vlivům, jako je doba dispergace a následného míchání, ředění vnější fáze soustavy, centrifugace a uchovávání po dobu jednoho až tří dní.

3. Teoretická část

3.1 Nanomateriál

V současné době neexistuje jednotná a všeobecně uznávaná definice nanomateriálu či nanočástic, vymezení tohoto pojmu je však důležité pro legislativu upravující zacházení s nanomateriály. Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization, ISO) formuluje „nanomateriál“ jako „materiál s jakýmkoliv vnějšími rozměry velikosti v řádu nanometrů nebo s vnitřní strukturou nebo povrchovou strukturou v řádu nanometrů“, přesněji 1-100 nm.[1]

Doporučení Evropské komise z roku 2011 „nanomateriálem“ označuje přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený a obsahující částice v nesloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden či více vnějších rozměrů ve velikostním rozmezí 1-100 nm. „Částicí“ se rozumí malá část hmoty s definovanými fyzikálními hranicemi, „agregátem“ potom částice skládající se z pevně vázaných nebo sloučených částic. „Aglomerátem“ je označován shluk slabě vázaných částic nebo agregátů, jejichž konečný vnější povrch je podobný součtu povrchů jednotlivých složek.[2]

Podle Americké Agentury pro ochranu životního prostředí (United States Environmental Protection Agency, US EPA) jsou nanomateriály takové materiály, jež mají alespoň jeden rozměr menší než 100 nm. Patří sem US EPA i nanočástice, které mají nejméně dva rozměry mezi 1 a 100 nm. [3]

3.2 Původ nanočástic

Nanočástice vznikají jednak vlivem přírodních procesů a dále také jako důsledek řízené nebo neřízené lidské činnosti. Přírodní nanočástice mohou být velmi rozmanité. Vznikají sopečnou činností, bývají přítomny v prachu i jemném mořském aerosolu, písku a půdních koloidech. Mezi přírodní nanočástice patří také viry, pyl, apod. [4]

Nanočástice, které jsou vyráběny řízenou lidskou činností, jsou mnohem lépe definované a více uniformní. Naopak antropogenní nanočástice vznikající náhodným procesem jsou ve své struktuře i velikosti velmi variabilní. Nejrozšířenějšími nekontrolovanými procesy vzniku nanočástic jsou spalování v dieslových motorech, důlní činnost, svařování atd. Dominantním zdrojem antropogenních nanočástic je tedy automobilová doprava. [5] Nanočástice jsou generovány nejen mechanickou destrukcí

větších částic, ale také nukleárními, koagulačními nebo kondenzačními procesy prakticky od atomární úrovně. [6]

3.3 Nanočástice a jejich využití

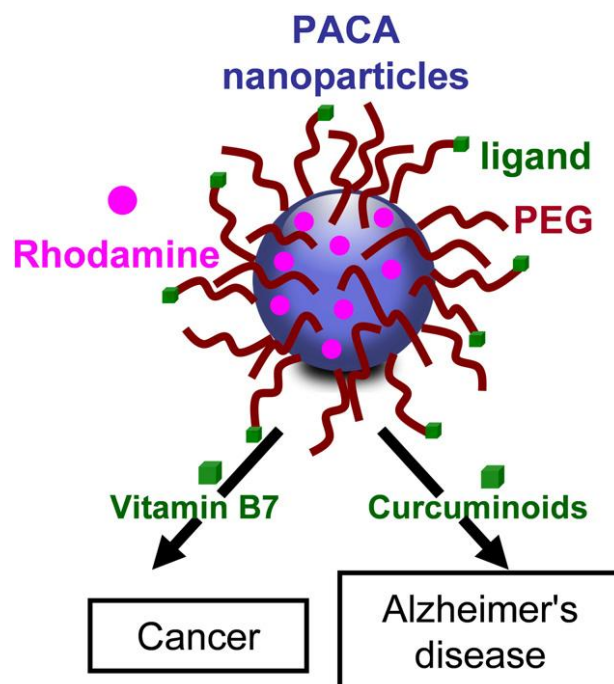
V současnosti vzrůstá produkce a využití nanočástic prakticky ve všech odvětvích lidské činnosti – v potravinářství, při výrobě pesticidů, kosmetiky a léčiv nebo dekontaminaci životního prostředí. Nanomateriály, ať už původu přírodního či antropogenního, se tak postupně stávají běžnou součástí našeho životního prostředí. Chemické látky ve formě nanočástic mají často odlišné toxikologické vlastnosti než jejich makroskopická forma. Účinek nanočástic na organismus závisí na místě vstupu, velikosti nanočástice, druhu zvoleného materiálu, kontaminaci povrchu nebo například na pH v jednotlivých orgánech a tkáních lidského těla. Působení nanočástic může ovlivnit např. funkci centrálního nervového nebo kardiovaskulárního systému. [7]

3.3.1 Využití ve farmacii

Jak je již zmíněno výše, nanomateriál je využíván také ve farmacii. Nanomateriály mohou poskytnout značnou výhodu u různých léčiv či terapeuticky využitelných molekul, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny, zlepšením jejich účinnosti a snížením potenciálních toxických a vedlejších účinků. Biologicky rozložitelné nanočástice nabízí možnosti jak chránit terapeutické látky proti degradaci, kontrolovat jejich uvolnění, překonat biologické bariéry apod. [8]

Nanočástice jsou rovněž označovány jako farmaceutické nosiče léčivých látek. Uplatňují se při léčbě různých onemocnění, v poslední době se centrum pozornosti zaměřuje na jejich použití při léčbě vybraných typů rakoviny, dále k přípravě vakcín, které aktivují imunitní systém a taky k rozpoznání určitých nemocí jako je artritida nebo Alzheimerova choroba (viz Obr. 1). [9]

V dnešní době nanočástice vykazují obrovský zájem farmaceutických společností k přípravě nosičů některých léčiv. Jejich využití má totiž spoustu výhod, především možnost řízeného uvolňování léčiv s odpovídající cestou podání. Dále snižují výskyt nežádoucích reakcí a vedlejších účinků, jelikož působí přímo v dané tkáni. [10]



Obr. 1: Příklad polymerních nanočástic s PACA jádrem, kde slouží vitamín B7 ke specifickému rozpoznání různých rakovinných buněk nebo kurkuminoidy jako beta peptid, marker Alzheimerovy choroby. (zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13002950>)

3.4 Typy nanočástic

Existuje široká škála velikostí, tvarů a složení nanočástic (viz Obr. 2). Léčiva s vázanými nanočásticemi mohou být ve svých mnoha formách nalezeny v různých fázích farmaceutického “pipeline”. Některé byly již schváleny pro klinické použití, zatímco jiné jsou testovány a procházejí schvalovacím procesem. [11]

3.4.1 Polymery na bázi uhlíku

Polymery na bázi uhlíku reprezentují významnou oblast výzkumu nanočástic. Patří sem polymery, jako jsou fullereny, uhlíkové tečky, nanodiamanty, apod. Nejstabilnější známý fullerén se skládá ze šedesáti uhlíkových atomů. [12]

Uhlíkové nanotrubičky jsou jednoduché vrstvy grafitu modifikované do tvaru válce. Jejich buněčná penetrace a konjugační vlastnosti z nich dělají vhodného kandidáta pro in vivo podávání léčiv. Co se týká biologické kompatibility, uhlíkové nanotrubičky aktivují systém komplementu klasickými nebo alternativními cestami. Dále bylo zjištěno, že tyto nanotrubičky mohou za některých podmínek nadměrně stimulovat komplementový systém, což vede k zánětu a k tvorbě granulomů. Dalšími faktory, které

mohou bránit použití nanotrubic na bázi uhlíku u lidí, jsou oxidační stres, apoptóza, toxicita kovových zbytků ze syntézy nanotrubic, peroxidace lipidů, mitochondriální dysfunkce, změny v buněčné morfologii a shlukování krevních destiček. Někteří vědci se domnívají, že modifikace uhlíkových nanotrubic utlumí nežádoucí účinky a umožní jejich rozšíření ve formě transportních lékových systémů. [12]

Grafen je materiál, jehož základní struktura se vyskytuje v přírodě ve formě grafitu. Grafen může být použit pro jiný různý rozsah biomedicínských aplikací díky své chemické flexibilní struktuře. Z tohoto důvodu se z grafenu stal potenciální kandidát pro multifunkční biomedicínské účely, používá se experimentálně například jako biosenzor nebo v protinádorové terapii. [12]

3.4.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou tvořeny ze syntetických polymerů, přírodních polymerů (např. proteinů) a pseudosyntetických polymerů (např. syntetických polypeptidů). Nejdůležitější faktory ovlivňující efektivitu transportu lékových nosičů jsou stavba polymeru, jeho složení, stabilita a rozpustnost ve vodě. [13]

Stavba polymeru má vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti nosičů, rychlost uvolňování léčiva a biodistribuci. Polydisperzní charakter polymeru, který je definován jako heterogenní kombinace řetězců různé délky, má velký význam pro biologické vlastnosti závislé na molární hmotnosti. Polymery mají schopnost poskytovat prodloužené uvolňování léčiv, chránit léčiva před enzymatickým a degenerativním poškozením a mohou také bránit vzniku rakoviny. Dále mohou být využity ke zlepšení nízké rozpustnosti některých léčiv ve vodě, například chemoterapeutik. Jelikož bývají polymery často pohlcovány buňkami imunitního systému, musí být jejich imunokompatibilita a jejich aplikace v organismu pečlivě zhodnocena. [14, 15, 16]

Z vědeckých studií vyplývá, že polykationty nemusí být pouze cytotoxické, ale mohou také vyvolat hemolýzu a aktivaci komplementu. Bylo rovněž zjištěno, že polyanionty jsou méně cytotoxické, ale přesto mohou vyvolat antikoagulaci a uvolnění cytokinů. Další studie prokázaly, že nanočástice vyrobené z N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu byly schopné zmírnit mnoho z podstaty toxického účinku léku proti rakovině – doxorubicinu. Dále bylo odhaleno, že HPMA-vázaný doxorubicin aktivuje imunitu proti rakovině u myši; až 80% vyléčených myši bylo schopno přežít smrtelnou dávku rakovinných buněk. S ohledem na biologickou

kompatibilitu důkazy naznačují, že HPMA neindukuje významnou reakci v těle, což vede k závěru, že HMPA kopolymery jsou ve skutečnosti "imunologicky bezpečné".[14, 17]

Oblast, ve které je třeba dále bádát, je vývoj metod pro vizualizaci nanočástic na bázi polymerů. Dokonce i citlivé metody jako skenování a transmisní elektronová mikroskopie jsou velice limitovány. [18]

3.4.3 Dendrimery

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené polymery, jejichž tvar, velikost, větvení, hustota a povrchové funkce jsou dobře definované a ovladatelné. Jsou specifické vysokým počtem funkčních skupin na jejich povrchu a velkým prostorem uvnitř dendrimery. Tyhle uzavřené struktury umožňují fyzické zachycení nebo zapouzdření léčiv. Kromě toho se mohou záporně nabitě látky spojovat prostřednictvím elektrostatických interakcí s aminovými skupinami v rámci dendritů. Navíc mohou být léky chemicky připojeny k povrchu skupin na polymerní struktuře. Dendrimery podléhají úpravě povrchu skupin a mohou být přizpůsobeny s cílem usnadnit cílení a zlepšit biokompatibilitu. Například dendrimery s pozitivně nabitými povrchovými skupinami mohou způsobit buněčnou lýzu. Dendrimery, jako většina nanočástic, slouží k cílenému podávání léčiva, zmírňují toxické účinky léků s následným nahromaděním v nádorech. Velikost dendrimery ovlivňuje rozpustnost a cytotoxicitu. Dendrimery mají navíc protinádorové, protivirové a antibakteriální účinky a schopnost zvýšit membránovou permeabilitu. [19, 20, 21]

Výše uvedené vlastnosti vyvolaly zájem o dendrimery v oblasti bakteriálního buněčného zabíjení a transmembránového transportu. Micely využívají zapouzdřený materiál ve svých stěnách a fungují na principu amfifilní monovrstvy. Vnitřní jádro micel bývá hydrofobní a umožňuje zapouzdření nerozpustných léčiv, zatímco hydrofilní vnější jádro činí zapouzdřený materiál rozpustný. V současné době jsou nanonosiče nahrazeny tradičními systémy micel, jelikož mohou stabilně zapouzdřovat a uvolňovat léčiva na cílené místo důsledkem vnějších podnětů jako je pH, teplota, redoxní reakce a světlo. Vzhledem k jejich toxicitě je však pouze málo z nich použito do klinických studií. [20, 22]

3.4.4 Nanočástice na bázi lipidů

Tyto nanočástice jako liposomy představují další kategorii nanostruktur pro přenos léčiv. Liposomy, jež by neměly být zaměňovány za micely, pro které je charakteristická monovrstva, se obvykle skládají z jedné nebo více dvojvrstev alifatické lipidové molekuly uspořádaných do měchýřků. Tato formace váčků umožňuje zapouzdření léčiv, vakcín nebo jiných materiálů v jejich stěnách nebo zachycení v jejich vrstvách. Velké množství liposomů se využívá k léčbě nádorových onemocnění, meningitidy a infekcí, ve stádiu vývoje je také potenciální uplatnění jako terapeutických vakcín. Liposomy se dělí na takové, které vyvolávají imunitní odpověď na antigen nebo ty, jejichž povrch je potažen PEG nebo obdobným polymerem, jež zmírňuje nebo potlačuje imunitní odezvu. Obecně platí, že liposomy s pozitivně nabitými povrchy jsou více náchylné k vyvolání imunitní odpovědi než ty se záporně nabitými či neutrálními povrchy. Možnou nevýhodou liposomů jako farmaceutických nosičů je jejich selektivita s ohledem na funkční kompatibilitu léků. [21, 23]

3.4.5 Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou nanočástice, které charakterizuje struktura složená z polovodičového materiálu. Mezi nejpopulárnější patří kvantové tečky ze sulfidu kademnatého nebo selenidu kademnatého. Tyto částice, objevené roku 1980, mají jedinečné optické vlastnosti, díky kterým jsou využívány pro zobrazovací účely. Kromě toho mohou být kvantové tečky použity pro detekci a léčbu rakoviny či jako počítačové aplikace s využitím světla ke zpracování signálů. [21, 24]

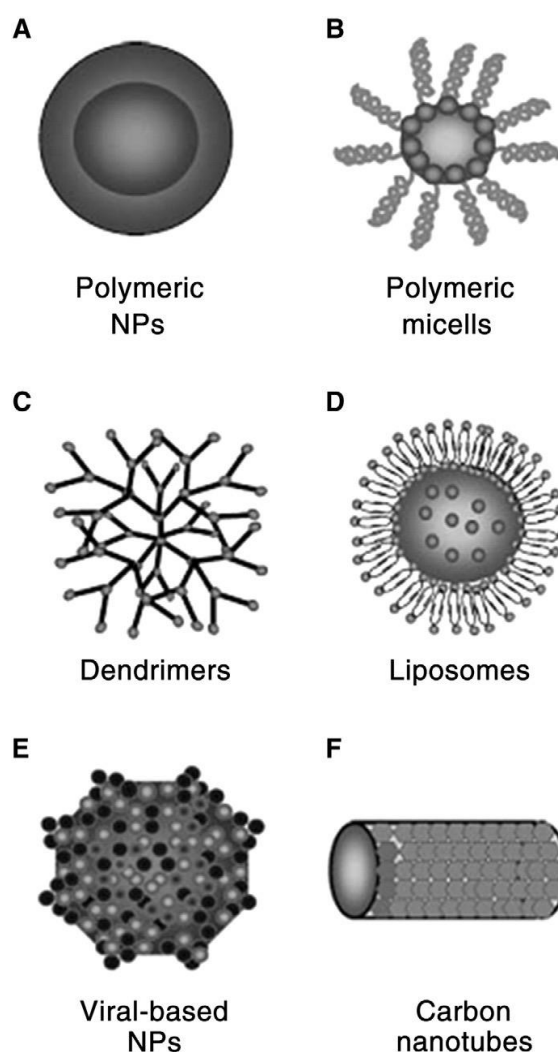
Stejně jako všechny nanočástice navržené pro použití v lidském těle, tak i kvantové tečky jsou testovány na biokompatibilitu. Přirozené vlastnosti materiálu jsou určeny adsorpcí, distribucí, metabolismem, vylučováním a toxicitou, stejně tak jako podmínkami prostředí, ve kterém je částice umístěna. Studie ukázaly, že kvantové tečky mohou vyvolat toxické účinky jako poškození plasmatické membrány, mitochondrií a jader. Z tohoto důvodu jsou tyto nanočástice často na povrchu potažené; to však může vyvolat další toxicitu. Také bylo zjištěno, že toxicita kvantových teček je ovlivněna nejen svou povrchovou chemií, ale také materiálem jádra. Nicméně, vhodně potažené a pasivované tečky neprojevují akutní toxicitu in vivo. Upravené kvantové tečky by umožnily krátký screening nanonosičů, aniž by docházelo k nescifickým nepříznivým

účinkům. Toxicita je tedy nedílnou součástí tradičních kvantových teček, stále se však hledají méně škodlivé látky v rámci probíhajícího výzkumu. [20, 25]

3.4.6 Kovové nanočástice

Tyto částice jsou využitelné jak v diagnostickém zobrazování, tak v cílené aplikaci léčiv. Jsou často dodávány v pevné koloidní formě a mají za cíl zvýšit terapeutický index protinádorových léčiv přes pasivní nebo aktivní cílení a současně zmírnit toxické účinky omezením expozice léku na zdravé buňky a tkáň. Částice na bázi kovů mají předpoklady k přenášení velkých dávek léků, jakož i zvyšování svého biologického poločasu. [26]

Například využití koloidního zlata v medicíně pozorovat již v roce 1920, kdy se používalo pro léčbu tuberkulózy. Od té doby byly nanočástice z koloidního zlata široce zkoumány jako prostředek pro podávání léčiv a genů. Mohou být syntetizovány v různých formách a jsou snadno detekovatelné v mikromolárních koncentracích, které vysvětlují jejich použití v zobrazovacích aplikacích. S ohledem na biologickou kompatibilitu bylo prokázáno, že nanočástice ze zlata jsou bez cytotoxických účinků. Kovové nanočástice, včetně koloidního zlata, jsou nadále aktivně zkoumány za účelem podávání léčiva a dalších aplikací. Očekává se, že výzkum v této oblasti bude v příštích několika desetiletích růst. [20, 26, 27]



Obr. 2: Různé typy nanočástic (Zdroj: <http://www.tissueeng.net/lab/papers/S0168365912008553.pdf>)

3.5 Biodegradabilní polymery

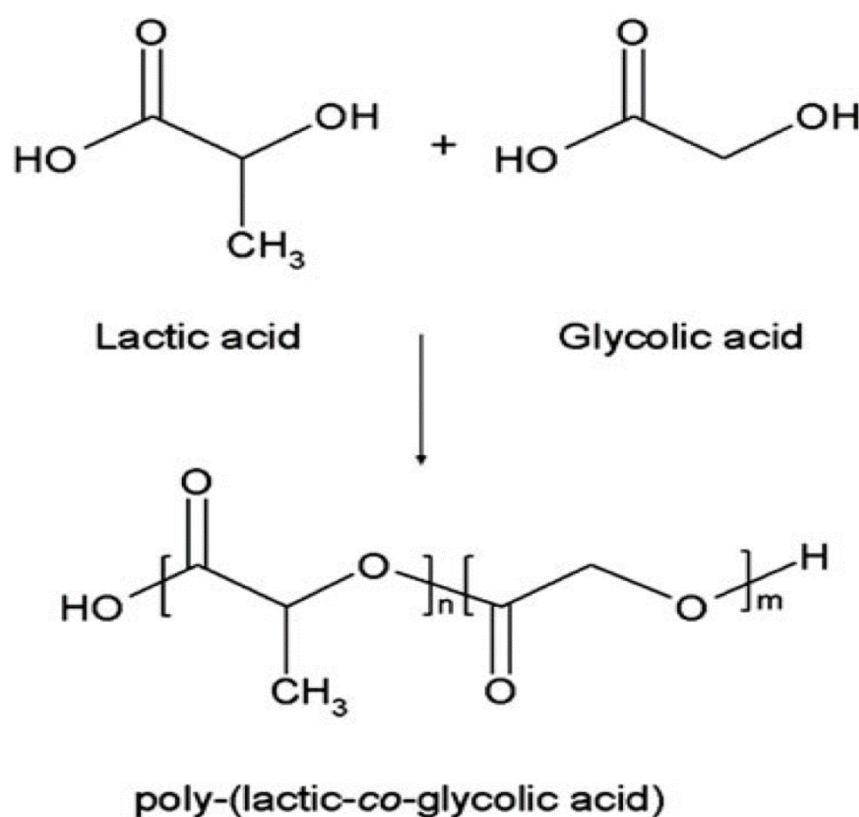
Během posledních dvou desetiletí byl zaznamenán obrovský pokrok ve vývoji a výzkumu biologicky rozložitelných polymerních materiálů k biomedicínským účelům. Biodegradabilní polymerní materiály jsou preferovány jako kandidáti pro rozvoj terapeutických přístrojů a pomůcek, jako jsou dočasné protézy, trojrozměrné porézní struktury či prostředky podávání léčiv s kontrolovaným uvolňováním. Každá z těchto aplikací vyžaduje materiály s konkrétními fyzikálními, chemickými, biologickými, biomechanickými a degradačními vlastnostmi, poskytující účinnou terapii. Z tohoto důvodu existuje široká škála přírodních nebo syntetických polymerů schopných podstoupit degradaci hydrolytickou nebo enzymatickou cestou a tyto polymery jsou neustále zkoumány a zdokonalovány pro biomedicínské využití. [28]

Poslední dobou jsou předmětem bádání jak syntetické, tak i přírodní (nebo biologicky odvozené) polymery. Biologický rozklad polymerních biomateriálů zahrnuje štěpení hydrolyticky nebo enzymaticky citlivých vazeb v polymeru, což vede k jeho erozi. V závislosti na způsobu degradace mohou být polymerní biomateriály dále rozděleny na hydrolyticky rozložitelné polymery a enzymaticky rozložitelné polymery. Většina přirozeně se vyskytujících polymerů se podrobuje enzymatické degradaci. [28, 29]

Přírodní polymery jsou považovány za první klinicky používané biologicky odbouratelné biomateriály. Míra degradace in vivo enzymaticky rozložitelných polymerů se však výrazně liší v závislosti na místě implantace, jež v některých případech záleží na dostupnosti a koncentraci enzymů. Chemická modifikace těchto polymerů také může významně ovlivnit jejich rychlost degradace. Přírodní polymery mají řadu předností, jako jsou biologická aktivita, schopnost prezentovat receptorové ligandy vázající se na buňky, citlivost na buňky aktivované proteolytickou degradací a přírodní remodelací. Vlastní bioaktivita těchto přírodních polymerů má své nevýhody. Patří mezi ně silná imunogenní odezva spojená s většinou polymerů, složitosti spojené s jejich čištěním a možností přenosu onemocnění. Syntetické biomateriály jsou na druhé straně všeobecně biologicky inertní a mají více předvídatelné vlastnosti. [28]

3.5.1 PLGA – kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny mléčné

Polyester PLGA (viz Obr. 3) je kopolymer mléčné (PLA) a glykolové kyseliny (PGA). Je to nejlepší definovaný biomateriál k dispozici pro podávání léků s ohledem na design a výkon. Kyselina polymléčná obsahuje asymetrický α -uhlík, který je obvykle v D nebo L formě za klasických stechiometrických podmínek a někdy jako R a S forma, v daném pořadí. Enantiomerní formy polymeru PLA jsou poly-D-mléčná kyselina (PDLA) a poly L-mléčné kyselina (PLLA). PLGA je obecně zkratka pro poly (D, L-mléčnou-ko-glykolovou) kyselinu, kde D- a L-formy kyseliny mléčné jsou přibližně ve stejném poměru. [30]



Obr. 3: Chemická struktura PLGA a jeho monomery (Zdroj: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/3/3640/htm>)

Aby bylo možné navrhnout lepší řízený systém pro podání léčiva, je důležité pochopit fyzikální, chemické a biologické vlastnosti PLGA. Fyzikálně-chemické vlastnosti opticky aktivní PDLA a PLLA jsou téměř stejné. Obecně platí, že polymer PLA může být ve vysoce krystalické formě (PLLA), nebo zcela amorfní (PDLA) v důsledku neuspořádaných polymerních řetězců. PGA je prostě jakýchkoliv methylových postranních skupin a ukazuje vysoce krystalickou strukturu na rozdíl od PLA. PLGA mohou být zpracovány do téměř jakéhokoliv tvaru a velikosti a mohou zapouzdřit

molekuly prakticky libovolné velikosti. Je rozpustný v širokém rozsahu běžných rozpouštědel, včetně chlorovaných rozpouštědel, tetrahydrofuranu, acetonu nebo ethylacetátu. Přítomnost methylových postranních skupin v PLA je činí více hydrofobní než PGA a tím je laktid bohatý na PLGA kopolymery méně hydrofilní, absorbuje méně vody a následně se rozkládá pomaleji. Změna vlastností PLGA během biodegradace polymeru ovlivňuje míru uvolňování a odbourávání začleněných molekul léků. Fyzikální vlastnosti PLGA závisí na mnoha faktorech, včetně počáteční molekulové hmotnosti, poměru laktidu ke glykolidu, velikosti lékové formy, vystavení působení vody (tvar povrchu) a skladovací teploty. Mechanická pevnost PLGA je ovlivněna fyzikální vlastností, jako je molekulová hmotnost a index polydisperzity. Mechanická pevnost, bobtnání, schopnost podrobit se hydrolyze a následně biodegradaci jsou přímo ovlivněny stupněm krystalizace PLGA, která je dále závislá na typu a molárním poměru jednotlivých monomerních složek v řetězci kopolymeru. [30, 31, 32, 33]

PLGA musí mít jako nosič léčiv vhodné farmakokinetické parametry, tedy odpovídající dobu podávání léčiva, biodistribuci a koncentraci pro požadovaný terapeutický účinek. Biodistribuce a farmakokinetika PLGA má nelineární a na dávce závislý profil. Studie naznačují, že krevní clearance a příjem mononukleárním fagocytárním systémem mohou být závislé na dávce a kompozici PLGA. Některé formulace PLGA, například nanočástice, se hromadí rychle v játrech, kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině a peritoneálních makrofázích. Degradace nosiče PLGA je rychlá v počáteční fázi (asi 30%) a nakonec se zpomaluje. [34]

V poslední době dochází k vývoji nových typů blokových kopolymerů polyesteru s polyethylenglykolem (PEG). PLGA/PEG kopolymery byly zpracovány jako dvojblokové či trojblokové molekuly jak s ABA a BAB typy. V dvojblokových molekulách jsou PEG řetězce orientovány směrem k zevní vodní fázi v micelách, které obklopují zapouzdřené partikule. Tato vrstva PEG působí jako překážka a snižuje interakce s cizími molekulami. Avšak přídavek PEG do systému má taky za následek snížení účinnosti zapouzdření pro drogy a proteiny a to i s nejvhodnějšími výrobními technologiemi. Triblokové kopolymery ABA a BAB typů mohou působit jako termogel s A-blokem kovalentně spojeným s B-blokem pomocí esterové vazby. Tento kopolymer je obvykle při nízké teplotě volně tekoucí roztok a při tělesné teplotě může tvořit vysoce viskózní gel. Při nižších teplotách vodíkových vazeb mezi hydrofilními PEG segmenty a molekulami vody dominuje vodnému roztoku, což vede k jejich rozpuštění ve vodě. Při nižších teplotách u vodíkových vazeb mezi hydrofilními PEG segmenty a

molekulami vody převládá vodný roztok, což vede k jejich rozpuštění ve vodě. Se stoupající teplotou se vodíkové vazby se stávají slabší, zatímco hydrofobní síly mezi segmenty PLGA jsou zesíleny, což vede k přeměně roztoku na gel. Léčivá látka či protein se z takovýchto kopolymerů uvolňuje dvěma mechanismy – difuzí z hydrogelu v počáteční fázi a uvolněním léčiva erozí hydrogelového materiálu během finální fáze. [35]

Drogy a proteiny jsou velmi rychle rostoucí třídou léčiv, u které je řízené nebo cílené uvolňování použito ke zvýšení specifity, snížení toxicity a rizika spojeného s léčbou. Nicméně stabilita a další nároky spojené s těmito látkami mají za důsledek omezený počet výrobků uvedených na trh. Bývá výhodné, když se nosiče léčiv vyskytují v pevném stavu, jelikož léčiva a peptidy dosáhnou požadovaného účinku bez hydrolytického štěpení, které by tomu zabránilo. Někdy však bývá nutné parenterální podání, aby se předešlo štěpení v gastrointestinálním traktu a first-pass metabolismu. Biodegradabilní a biokompatibilní PLGA částice (mikročástice, mikrokapsle, nanokapsle, nanosféry) mohou zabránit použití velkých implantátů a také mohou být použity pro řízené uvolňování. PLGA mohou být snadno zpracovány a vyrobeny v různých formách a velikostech. [36]

PLGA nosiče jsou připravovány různými metodami. Jedná se o metody přípravy mikročástic, nanočástic, implantátů a další. Mezi techniky přípravy mikročástic patří metoda odpařování rozpouštědla (jednoduchá emulzní metoda či dvojitý emulzní proces), fázová separace (koacervace) a sprejové sušení. K technikám přípravy nanočástic patří například vysolování. Metody přípravy implantátů zahrnují odlévání rozpouštědla a lisování a extruzi. Dají se však použít i jiné metody, například metoda za použití superkritického CO₂ apod. [30]

PLGA kopolymer podléhá degradaci hydrolyzou nebo biodegradací esterových vazeb na oligomery a následně monomery. Tato skutečnost byla prokázána jak in vivo, tak in vitro pro různé typy drog a proteinů s různými poměry polymerů. Degradace PLGA kopolymeru je kolektivní proces hromadné difúze, povrchové difúze, hromadné eroze a povrchové eroze. Jelikož existuje mnoho proměnných, které ovlivňují proces degradace, je rychlost uvolňování často nepředvídatelná. Rychlost biodegradace kopolymerů PLGA závisí na molárním poměru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v polymerním řetězci, molekulové hmotnosti polymeru, na stupni krystalinity a T_g polymeru. Úloha enzymů v biodegradaci PLGA je nejasná. Většina literatury ukazuje,

že biologický rozklad PLGA nezahrnuje žádnou enzymatickou aktivitu a děje čistě prostřednictvím hydrolyzy. Nicméně někteří výzkumníci zjistili jistou enzymatickou úlohu v rozpadu PLGA založeném na rozdílu degradačních rychlostí in vitro a in vivo. [30]

Degradaci PLGA ovlivňuje několik faktorů. Prvním z nich je vliv složení polymeru, jelikož polymerní kompozice je nejdůležitějším činitelem pro stanovení hydrofility a rychlosti rozkladu zavaděcí matrice, která ovlivňuje rychlost rozkladu. Dále záleží na účinku krystalinity (nebo Tg), na účinku průměrné molekulové hmotnosti či druhu drogy (léčiva). Na posledním zmíněném závisí především mechanismus degradace polymerní matrice léčiva a parametry rychlosti uvolňování léku. Velký vliv má taky velikost a tvar matrice. Poměr plochy povrchu k objemu se ukázal být významným faktorem pro degradaci, stejně tak jako vyšší povrchová plocha vede k vyšší degradaci matrice. Nezanedbatelný vliv má taky pH a působení enzymů. [30]

Toxikologické studie s PLGA naznačují, že se mohou vyskytnout lokální reakce tkáně v místě aplikace. I když jsou tyto reakce obecně velmi mírné a bylo prokázáno, že PLGA je velmi bezpečný jako materiál pro makroskopické a mikročásticové systémy, může docházet k úvahám ohledně použití nanočástic při aplikacích. Některé výzkumy naznačují, že nanočástice z jakéhokoliv materiálu mohou vytvářet specifickou biologickou distribuci a toxikologické profily. [37]

3.5.2 Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu

Tento polymer, někdy označován jako 3T (nebo T3) je polyester kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové. Jedná se o větvený terpolymer, který kromě dvou výše zmíněných kyselin obsahuje také jako větvicí monomer tripentaerythritol.

3.6 Terbinafin

Allylamin terbinafin je pravděpodobně jedno z nejčastěji předepisovaných systémových antimykotik k léčbě dermatomykóz a onychomykóz. Podle německých zákonů je terbinafin schválen pro pacienty, kteří jsou starší 18 let. Nicméně tato antifungální látka se stále více používá mimo schválené indikace pro léčení onychomykózy a tinea capitis u dětí. Terbinafin interaguje jen s minimem jiných léků, což je důvod, proč může být obecně bez problémů použit u starších a polymorbidních pacientů. Znamé jsou jen některé potenciální interakce

terbinafinu s léčivými látkami ze skupiny antidepresiv/antipsychotik a některých kardiovaskulárních léčiv. Při kombinování terbinafinu s tricyklickými antidepresivy nebo inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a selektivními inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu/serotoninu musí být sledovány klinické odpovědi a potenciální vedlejší účinky. Problematické je použití terbinafinu při současné léčbě tamoxifenem. Podávání účinných inhibitorů CYP2D6 vede ke snížené účinnosti tamoxifenu, jelikož jeden z nejdůležitějších aktivních metabolitů – endoxifen – není dostatečně k dispozici. Z tohoto důvodu je třeba se vyhnout kombinaci tamoxifenu a terbinafinu. Závěrem lze říci, že počet a identita látek, které jsou schopné způsobit klinicky významné interakce při současném podávání terbinafinu, je objasněna a měla by být zvládnutelná v dermatologickém pracovišti s odpovídajícím monitoringem. [38]

4. Experimentální část

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy KERN AES-N, max 220g, d=0,1mg

Váhy KERN 440-35, max 400g, d=0,01g

Váhy KERN 1200-2N, max=1210g, d=0,01g

Homogenizátor Heidolph DIAX 900, 8000-26000 otáček/minutu, 6 pásem

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT, 100-1000 otáček/minutu

Zetasaizer ZS, Malvern Industries, UK Zetasizer ZS 90

Centrifuga UNIVERSAL 16A

Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON

Vakuová sušárna BINDER

4.2 Použité chemikálie

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu (T3), KFT, FaF UK HK

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové 50:50 (PLGA), KFT, FaF UK HK

Terpolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větven na 2% kyselině polyakrylové (A2), KFT, FaF UK HK

Terpolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větven na 4% kyselině polyakrylové (A4), KFT, FaF UK HK

Ethylmethylketon (EMK), Lachema a.s., Neratovice

Dimethylsulfoxid (DMSO), PENTA, Chrudim

Dichlormethan (DCM), Lachema a.s., Neratovice

Aceton, PENTA, Chrudim

Aqua purificata, KFT, FaF UK HK

Báze terbinafinu připravena alkalizací vodného roztoku hydrochloridu a filtrací sraženiny (viz. 3.1) (BT), KFT, FaF UK HK

Methanol (MeOH), PENTA, Chrudim

Cetrimid (N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid), Merck, SRN

Laurylsíran sodný (NaLS), Merck, Praha

Lecithin hydrogenovaný (LEC), Merck, Praha

Polysorbát 20 (PSB), Dr.Kulich Pharma, HK

Poloxamer 407 (POLOX), Sigma-Aldrich

Amoniak, vodný roztok, Lachema, Neratovice

4.3 Postup přípravy a měření vzorků

4.3.1 Příprava báze terbinafinu

Do kádinky se na analytických vahách navážilo 20g čistého terbinafinu. Ke 20g terbinafinu se dolila destilovaná voda do 4000g. Pro jednodušší rozpuštění terbinafinu se roztok zahříval. Po rozpuštění se přidal roztok amoniaku do pH 7-8 (pH se kontrolovalo pomocí indikačních papírků) a terbinafin se nechal vysrážet přes noc. Druhý den se 0,5% báze terbinafinu přefiltrovala a nechala se vysušit ve vakuové sušárně.

4.3.2 Příprava vnější fáze

Potřebné množství emulgátoru bylo naváženo na analytických vahách do 100ml kádinky a rozpuštěno ve vodě. Jako emulgátor byly použity Cetrimid, NaLS, PSB, LEC+PSB nebo POLOX v koncentracích 0,025-1%. U vybraných vzorků se ještě vnější fáze sytila 2% DCM. Složení vnější fáze je konkrétně popsáno v tabulce složení vzorků.

4.3.3 Příprava vnitřní fáze

Pomocí analytických vah se do kádinky navážilo dané množství polymeru (T3, PLGA, A2, A4) a za míchání a použití ultrazvuku se rozpustilo v stanoveném množství organického rozpouštědla (EMK, DMSO, DCM, Aceton). Připravily se 1% a 3% vzorky polymeru

v rozpouštědle. Dále byla u vybraných vzorků navážena i báze terbinafinu v koncentraci 10% a 30%. U vybraných vzorků se přidal aceton nebo methanol v daných koncentracích. Složení vnitřní fáze je konkrétně popsáno v tabulce složení vzorků.

4.3.4 Příprava nanočástic

Kádinka s vnější fází se umístila pod turbínu homogenizátoru. Turbína se nastavila tak, aby dosahovala 0,5 cm ode dna kádinky. Potom se zapnul homogenizátor na nejnižší stupeň a najednou se přidala celá vnitřní fáze. Množství jednotlivých fází bylo určeno typem emulzních soustav. Poté se homogenizátor nastavil na nejvyšší otáčky (maximum 6) a vzorek se nechal homogenizovat 30-120 s. Čas se měřil na stopkách. Po daném čase se snížily otáčky na minimum a přístroj byl vypnut. Poté se kádinka odložila na magnetickou míchačku, kde se nechala 30-120 minut míchat. Některé vzorky (č. 62-80) se po 30 minutách míchání zředily na dvojnásobek roztokem cetrimidu 0,2% a nechaly se míchat dalších 120minut. Po uplynutí času se měřila velikost částic na přístroji Zetasaizer ZS. Vybrané vzorky se navíc měřily znovu po centrifugaci (25minut při 4000 ot/min) nebo se měřily znovu po delší době (uchovávány v lednici).

Tab. 1: Složení emulzních soustav (50g vzorku)

Emulzní soustava	Vnější fáze	Vnitřní fáze
5%	47,5 g	2,5 g
10%	45 g	5 g
20%	40 g	10 g

Tab. 2: Příprava nanočástic

Označení přípravy	Čas homogenizace	Čas na magnetické míchačce
1	30 s	60 min
2	120 s	60 min
3	60 s	30 min > 2x zředit > 120 min
4	30 s	30 min
5	30 s	120 min

Tab. 3: Další práce se vzorkem po přípravě

Označení přípravy	Další měření vzorku
A	po 25 min centrifugace
B	po 1,5 hod míchání
C	po 3 hod míchání
D	po 1 dni stání
E	po 3 dnech stání
F	po 3 dnech stání + 25 min centrifugaci

4.3.5. Měření velikosti částic

Pro měření na přístroji Zetasaizer se vzorek musel nalít do speciálních kyvet. Kyvety se plnily do předurčené výšky. Poté se vložily do Zetasaizeru a provedlo se měření při 25°C. K vyhodnocení výsledků měření docházelo na PC připojenému k přístroji.

5. Výsledky

Všechny výsledky jsou uvedeny v příložených tabulkách a k nim náležících grafech.

Tab. 4a: Složení vzorků 1-4

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s EMK [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
1	1		20	CET 0,2%	1
2		1	20	CET 0,2%	1
3	1		20	NaLS 0,025%	1
4		1	20	NaLS 0,025%	1

Tab. 4b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1% T3 nebo PLGA) a emulgátoru (0,025% NaLS nebo 0,2% cetrimid) na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
1	700,5	0,617	445,6	104,4	0	91,8	8,2	0
2	2521	0,705	4778	387,1	0	83,0	17,0	0
3	2593	1	320,7	0	0	100	0	0
4	2496	0,394	2401	0	0	100	0	0

Tab. 5a: Složení vzorků 5-13

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s EMK [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
5		1	20	10	CET 0,2%	1
6		1	20	30	CET 0,2%	1
9	1		20	10	CET 0,2%	1
13	1		20	30	CET 0,2%	1

Tab. 5b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1% PLGA nebo T3) a koncentrace BT (10 nebo 30 %) na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
5	542	0,513	626,9	245,1	0	63,2	36,8	0
6	529,1	0,401	884,8	276,1	5373	67,3	31,3	1,5
9	1220	0,409	1181	0	0	100	0	0
13	714,3	0,412	737	167,9	0	92,9	7,1	0

Tab. 6a: Složení vzorků 17-27

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s EMK [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
17		3	20	10	CET 0,2%	2
18		3	20	30	CET 0,2%	2
20	3		20	10	CET 0,2%	2
21	3		20	30	CET 0,2%	2
22		3	20	10	CET 0,2%	2A
23		3	20	30	CET 0,2%	2A
24	3		20	10	CET 0,2%	2A
25	3		20	30	CET 0,2%	2A
26		3	20	10	CET 0,2%	2C
27		3	20	30	CET 0,2%	2C

Tab. 6b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
17	405,5	0,830	373,4	0	0	100	0	0
18	1050	0,644	560,3	3893	0	50,5	49,5	0
20	374,5	0,045	391,2	0	0	100	0	0
21	1143	0,587	1375	375,8	4508	44,1	28	27,9
22	280	0,097	314,8	0	0	100	0	0
23	372,1	0,024	387,8	0	0	100	0	0
24	322,8	0,127	368,9	0	0	100	0	0
25	374,0	0,150	420	0	0	100	0	0
26	826,3	0,224	1071	0	0	100	0	0
27	769,7	0,590	1959	289,2	0	73,1	26,9	0

Tab. 7a: Složení vzorků 28-38

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s EMK [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
28	3		20	10	CET 0,2%	2C
29	3		20	30	CET 0,2%	2C
30		3	20	10	CET 0,2%	2E
31		3	20	30	CET 0,2%	2E
32	3		20	10	CET 0,2%	2E
34	3		20	30	CET 0,2%	2E
35		3	20	10	CET 0,2%	2F
36		3	20	30	CET 0,2%	2F
37	3		20	10	CET 0,2%	2F
38	3		20	30	CET 0,2%	2F

Tab. 7b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
28	744	0,338	1324	278,1	0	78,5	21,5	0
29	1514	0,741	480,8	0	0	100	0	0
30	486,8	0,436	345	2000	0	55,1	44,9	0
31	606,2	0,118	705,8	0	0	100	0	0
32	669,9	0,486	633,9	0	0	100	0	0
34	532	0,258	429	1234	0	56,3	43,7	0
35	208,9	0,093	231	0	0	100	0	0
36	256,5	0,168	279,5	4773	0	97,8	2,2	0
37	235,3	0,054	253,3	0	0	100	0	0
38	423,7	0,231	584,9	5136	0	99,4	0,6	0

Tab. 8a: Složení vzorků 39-97

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
96		3	20	0	CET 0,2%	1
39		3	20	10	CET 0,2%	1
40		3	20	30	CET 0,2%	1
97	3		20	0	CET 0,2%	1
41	3		20	10	CET 0,2%	1
42	3		20	30	CET 0,2%	1
43		3	20	10	CET 0,2%	1A
44		3	20	30	CET 0,2%	1A
51	3		20	10	CET 0,2%	1A
52	3		20	30	CET 0,2%	1A

Tab. 8b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (0, 10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
96	208,4	0,070	226	0	0	100	0	0
39	270,2	0,310	318,4	4775	0	95,1	4,9	0
40	317,4	0,341	432,5	4851	0	96,9	3,1	0
97	170,9	0,033	179,9	0	0	100	0	0
41	236,1	0,131	264,8	0	0	100	0	0
42	252,7	0,185	262,1	5165	0	98	2	0
43	219,9	0,164	326	4800	0	97,7	2,3	0
44	257,3	0,235	297,5	5012	0	97,7	2,3	0
51	225,6	0,185	250,7	4987	0	98,3	1,7	0
52	225,5	0,068	244,2	0	0	100	0	0

Tab. 9a: Složení vzorků 53-60

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
53		3	20	10	CET 0,2%	1E
54		3	20	30	CET 0,2%	1E
55	3		20	10	CET 0,2%	1E
56	3		20	30	CET 0,2%	1E
57		3	20	10	CET 0,2%	1F
58		3	20	30	CET 0,2%	1F
59	3		20	10	CET 0,2%	1F
60	3		20	30	CET 0,2%	1F

Tab. 9b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
53	262,4	0,240	310,2	4783	0	97,1	2,9	0
54	330,8	0,438	292,6	5510	0	97,8	2,2	0
55	243	0,050	259	0	0	100	0	0
56	254	0,197	268	5222	0	98,4	1,6	0
57	212,4	0,147	248,3	0	0	100	0	0
58	243,1	0,217	331,2	0	0	100	0	0
59	225,5	0,092	251,8	0	0	100	0	0
60	218,7	0,046	234,2	0	0	100	0	0

Tab. 10a: Složení vzorků 62-72

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DCM [%]	TB [%]	Emulgátor	Sycení DCM [%]	Příprava vzorku
62	1	5	0	CET 0,2%	2	3
63	1	5	10	CET 0,2%	2	3
64	1	5	30	CET 0,2%	2	3
66	1	5	0	CET 0,2%	0	3
67	1	5	10	CET 0,2%	0	3
68	1	5	30	CET 0,2%	0	3
69	1	5	10	CET 0,2%	2	3A
70	1	5	30	CET 0,2%	2	3A
71	1	5	10	CET 0,2%	0	3A
72	1	5	30	CET 0,2%	0	3A

Tab. 10b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace BT (0, 10 nebo 30%), sycení vnější fáze DCM (0 nebo 2%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
62	290	0,189	273,1	0	0	100	0	0
63	261,6	0,120	298,2	0	0	100	0	0
64	268,8	0,172	324,6	0	0	100	0	0
66	340,1	0,314	349,5	0	0	100	0	0
67	337,4	0,330	666,7	0	0	100	0	0
68	296,8	0,131	328,3	0	0	100	0	0
69	175	0,134	204,6	0	0	100	0	0
70	173,4	0,107	195	0	0	100	0	0
71	175,9	0,129	203,6	0	0	100	0	0
72	181,4	0,110	205,1	0	0	100	0	0

Tab. 11a: Složení vzorků 75-80

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DCM [%]	TB [%]	Emulgátor	Sycení DCM [%]	Příprava vzorku
75	1	5	0	CET 0,2%	2	3E
76	1	5	10	CET 0,2%	2	3E
77	1	5	30	CET 0,2%	2	3E
78	1	5	0	CET 0,2%	0	3E
79	1	5	10	CET 0,2%	0	3E
80	1	5	30	CET 0,2%	0	3E

Tab. 11b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace BT (0, 10 nebo 30%), sycení vnější fáze DCM (0 nebo 2%) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
75	255,1	0,145	287,1	0	0	100	0	0
76	250,3	0,168	306,9	76,36	0	96,7	3,3	0
77	250,2	0,181	269,3	4934	0	97,7	2,3	0
78	267,3	0,132	293	0	0	100	0	0
79	265	0,184	329,1	0	0	100	0	0
80	271,9	0,147	320,6	0	0	100	0	0

Tab. 12a: Složení vzorků 84-91

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DCM [%]	Emulze s Aceton [%]	TB [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
84	1		10	0	CET 0,2%	5
85	1		10	10	CET 0,2%	5
86	1		10	30	CET 0,2%	5
89	1	10		0	CET 0,2%	5
90	1	10		10	CET 0,2%	5
91	1	10		30	CET 0,2%	5

Tab. 12b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv rozpouštědla (DCM nebo aceton) a koncentrace BT (0, 10 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
84	198,3	0,077	216,8	0	0	100	0	0
85	206,2	0,049	219,6	0	0	100	0	0
86	237,4	0,090	262,5	0	0	100	0	0
89	399,2	0,383	994	253,6	0	55,7	44,3	0
90	306,9	0,164	362,1	0	0	100	0	0
91	283,9	0,145	336,5	0	0	100	0	0

Tab. 13a: Složení vzorků 98-107

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
98		1	5	CET 0,2%		4
99		1	5	CET 0,2%	4% MeOH	4
100		1	5	CET 0,2%	4% Acet	4
101	1		5	CET 0,2%		4
102	1		5	CET 0,2%	4% MeOH	4
103	1		5	CET 0,2%	4% Acet	4
104		1	5	CET 0,2%		4B
105		1	5	CET 0,2%	4% MeOH	4B
106		1	5	CET 0,2%	4% Acet	4B
107	1		5	CET 0,2%		4B

Tab. 13b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1% PLGA nebo T3), aditiva k vnitřní fázi (4% MeOH nebo aceton) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
98	131,7	0,122	151,6	0	0	100	0	0
99	141,4	0,148	152,8	0	0	100	0	0
100	132	0,100	149,2	0	0	100	0	0
101	113,6	0,082	125,4	0	0	100	0	0
102	156,6	0,251	194,5	4704	0	97,4	2,6	0
103	107,6	0,096	119,5	0	0	100	0	0
104	132,1	0,114	150,2	0	0	100	0	0
105	140,2	0,131	162,1	0	0	100	0	0
106	132,4	0,104	149,6	0	0	100	0	0
107	110,7	0,100	124	0	0	100	0	0

Tab. 14a: Složení vzorků 108-119

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
108	1		5	CET 0,2%	4% MeOH	4B
109	1		5	CET 0,2%	4% Acet	4B
110		1	5	CET 0,2%		4D
111		1	5	CET 0,2%	4% MeOH	4D
112		1	5	CET 0,2%	4% Acet	4D
113	1		5	CET 0,2%		4D
118	1		5	CET 0,2%	4% MeOH	4D
119	1		5	CET 0,2%	4% Acet	4D

Tab. 14b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1%PLGA nebo T3), aditiva k vnitřní fázi (4% MeOH nebo aceton) a zacházení se vzorkem na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
108	114,3	0,107	125,5	0	0	100	0	0
109	152,1	0,233	205	0	0	100	0	0
110	124,4	0,116	141,7	0	0	100	0	0
111	132,8	0,120	152,9	0	0	100	0	0
112	124,8	0,107	139,8	0	0	100	0	0
113	111,1	0,091	122,7	0	0	100	0	0
118	113,5	0,055	121,3	0	0	100	0	0
119	106,9	0,092	118,9	0	0	100	0	0

Tab. 15a: Složení vzorků 122-130

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
122	1	5	CET 0,2%	10% Acet	4
123	1	5	CET 0,2%	50% Acet	4
124	1	5	CET 0,2%	100% Acet	4
125	1	5	CET 0,2%	10% MeOH	4
126	1	5	CET 0,2%	50% MeOH	4
127	1	5	CET 0,2%	20% MeOH	4
128	1	5	CET 0,2%	10% Acet	4B
129	1	5	CET 0,2%	50% Acet	4B
130	1	5	CET 0,2%	100% Acet	4B

Tab. 15b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50,100% aceton) a zacházení se vzorkem u 5% emulze na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
122	116,7	0,086	128,8	0	0	100	0	0
123	140,1	0,107	157,1	0	0	100	0	0
124	161,8	0,123	176,9	0	0	100	0	0
125	126,3	0,113	139,6	0	0	100	0	0
126	123,4	0,077	135	0	0	100	0	0
127	114	0,086	125	0	0	100	0	0
128	113,7	0,103	127,4	0	0	100	0	0
129	141,3	0,114	160,6	0	0	100	0	0
130	152,9	0,079	167,3	0	0	100	0	0

Tab. 16a: Složení vzorků 131-139

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
131	1	5	CET 0,2%	10% MeOH	4B
132	1	5	CET 0,2%	50% MeOH	4B
133	1	5	CET 0,2%	20% MeOH	4B
134	1	5	CET 0,2%	10% MeOH	4D
135	1	5	CET 0,2%	50% MeOH	4D
136	1	5	CET 0,2%	20% MeOH	4D
137	1	5	CET 0,2%	10% Acet	4D
138	1	5	CET 0,2%	50% Acet	4D
139	1	5	CET 0,2%	100% Acet	4D

Tab. 16b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50,100% aceton) a zacházení se vzorkem u 5% emulze na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
131	125,6	0,148	137,3	0	0	100	0	0
132	124,9	0,089	138,8	0	0	100	0	0
133	114,3	0,136	117,3	0	0	100	0	0
134	139,5	0,153	154,9	0	0	100	0	0
135	126,2	0,080	138,2	0	0	100	0	0
136	118,7	0,098	131,4	0	0	100	0	0
137	118	0,113	134,7	0	0	100	0	0
138	141,3	0,099	158,2	0	0	100	0	0
139	153,7	0,100	173,2	0	0	100	0	0

Tab. 17a: Složení vzorků 140-152

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
140	1	10	CET 0,2%	10% MeOH	4
141	1	10	CET 0,2%	20% MeOH	4
142	1	10	CET 0,2%	50% MeOH	4
143	1	10	CET 0,2%	10% Acet	4
144	1	10	CET 0,2%	50% Acet	4
146	1	10	CET 0,2%	100% Acet	4
147	1	10	CET 0,2%	10% MeOH	4B
148	1	10	CET 0,2%	20% MeOH	4B
149	1	10	CET 0,2%	50% MeOH	4B
150	1	10	CET 0,2%	10% Acet	4B
151	1	10	CET 0,2%	50% Acet	4B
152	1	10	CET 0,2%	100% Acet	4B

Tab. 17b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50,100% aceton) a zacházení se vzorkem u 10% emulze na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
140	156,9	0,065	168,1	0	0	100	0	0
141	158,2	0,112	179	0	0	100	0	0
142	178,5	0,071	195,6	0	0	100	0	0
143	146,5	0,095	161,7	0	0	100	0	0
144	169,4	0,106	187,9	0	0	100	0	0
146	195,8	0,089	215,4	0	0	100	0	0
147	158,1	0,080	173,7	0	0	100	0	0
148	155,3	0,048	164,4	0	0	100	0	0
149	171,3	0,087	186,6	0	0	100	0	0
150	144,2	0,089	160,6	0	0	100	0	0
151	170,3	0,103	190,4	0	0	100	0	0
152	191,2	0,102	212,2	0	0	100	0	0

Tab. 18a: Složení vzorků 153-165

Vzorek č.	T3 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Aditivum	Příprava vzorku
153	1	20	CET 0,2%	10% MeOH	4
155	1	20	CET 0,2%	20% MeOH	4
156	1	20	CET 0,2%	50% MeOH	4
157	1	20	CET 0,2%	10% Acet	4
158	1	20	CET 0,2%	50% Acet	4
159	1	20	CET 0,2%	100% Acet	4
160	1	20	CET 0,2%	10% MeOH	4B
161	1	20	CET 0,2%	20% MeOH	4B
162	1	20	CET 0,2%	50% MeOH	4B
163	1	20	CET 0,2%	10% Acet	4B
164	1	20	CET 0,2%	50% Acet	4B
165	1	20	CET 0,2%	100% Acet	4B

Tab. 18b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50,100% aceton) a zacházení se vzorkem u 20% emulze na velikost částic

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
153	176,1	0,106	193,9	0	0	100	0	0
155	181,8	0,106	201,2	0	0	100	0	0
156	185,6	0,086	203	0	0	100	0	0
157	168,3	0,091	186,2	0	0	100	0	0
158	218,4	0,101	242,6	0	0	100	0	0
159	237,9	0,065	255,5	0	0	100	0	0
160	177,8	0,074	194,2	0	0	100	0	0
161	182,3	0,066	197,5	0	0	100	0	0
162	188,7	0,083	207,3	0	0	100	0	0
163	166,5	0,090	185,3	0	0	100	0	0
164	215,7	0,101	234	0	0	100	0	0
165	234,7	0,079	256,5	0	0	100	0	0

Tab. 19a: Složení vzorků 166-213

Vzorek č.	T3 [%]	PLGA [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
166		1	5	CET 0,05%	4
167		1	5	CET 0,5%	4
168		1	5	CET 1%	4
204	1		5	CET 0,05%	4
210	1		5	CET 0,5%	4
211	1		5	CET 1%	4
212	1		5	CET 0,35%	4
213	1		5	CET 0,75%	4

Tab. 19b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace cetrimidu (0,05%, 0,5% nebo 1%) na velikost částic s 1% PLGA

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
166	159,4	0,116	181,9	0	0	100	0	0
167	132,6	0,094	147,9	0	0	100	0	0
168	122,8	0,100	136,7	0	0	100	0	0

Tab. 19c: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace cetrimidu (0,05%, 0,2%, 0,35%, 0,5%, 0,75% nebo 1%) na velikost částic s 1% T3

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
204	128,4	0,093	142,5	0	0	100	0	0
101	113,6	0,082	125,4	0	0	100	0	0
212	113,7	0,102	128,0	0	0	100	0	0
210	104,4	0,082	114,7	0	0	100	0	0
213	132,3	0,096	147,5	0	0	100	0	0
211	114,3	0,070	124,3	0	0	100	0	0

Tab. 20a: Složení vzorků 215-221

Vzorek č.	A2 [%]	A4 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
215	1		5	CET 0,2%	4
216	1		5	CET 0,5%	4
217	1		5	CET 1%	4
218		1	5	CET 0,2%	4
220		1	5	CET 0,5%	4
221		1	5	CET 1%	4

Tab. 20b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace cetrimidu (0,2%, 0,5% nebo 1%) na velikost částic u polymeru (1% A2 nebo A4)

Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
215	178,6	0,107	202,4	0	0	100	0	0
216	154,6	0,078	169,3	0	0	100	0	0
217	153,9	0,066	167,3	0	0	100	0	0
218	168,7	0,137	195,2	0	0	100	0	0
220	181,4	0,104	204,1	0	0	100	0	0
221	173,8	0,121	200,6	0	0	100	0	0

Tab. 21a: Složení vzorků 222-230

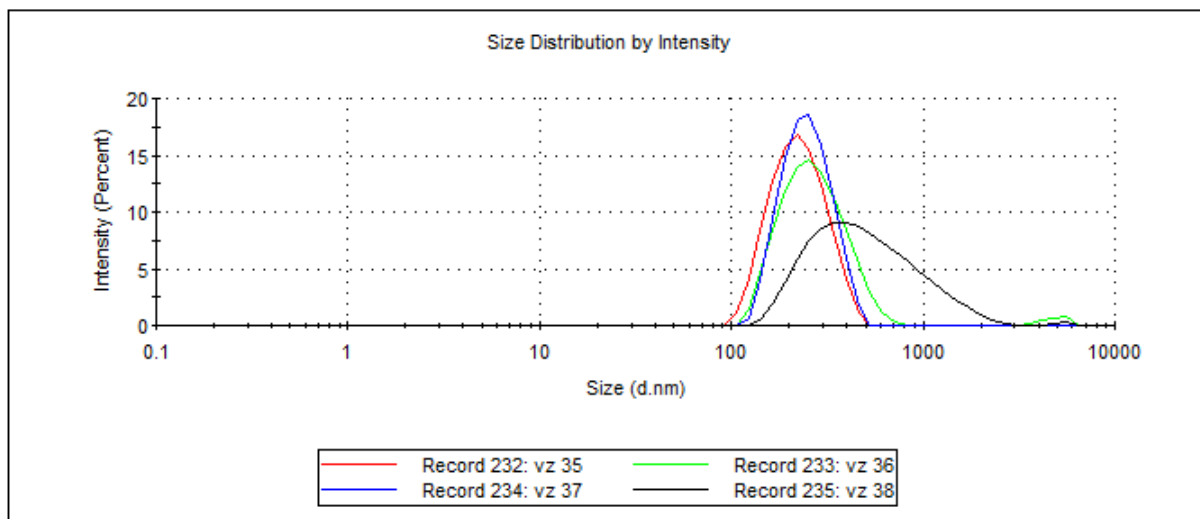
Vzorek č.	A2 [%]	Emulze s DMSO [%]	Emulgátor	Příprava vzorku
222	1	5	PSB 0,2%	4
223	1	5	PSB 0,5%	4
224	1	5	PSB 1%	4
225	1	5	LEC+PSB 0,2%	4
226	1	5	LEC+PSB 0,5%	4
227	1	5	LEC+PSB 1%	4
228	1	5	POLOX 0,2%	4
229	1	5	POLOX 0,5%	4
230	1	5	POLOX 1%	4

Tab. 21b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,2%, 0,5% nebo 1%) a druhu (PS, LEC+PS nebo POLOX) emulgátoru na velikost částic

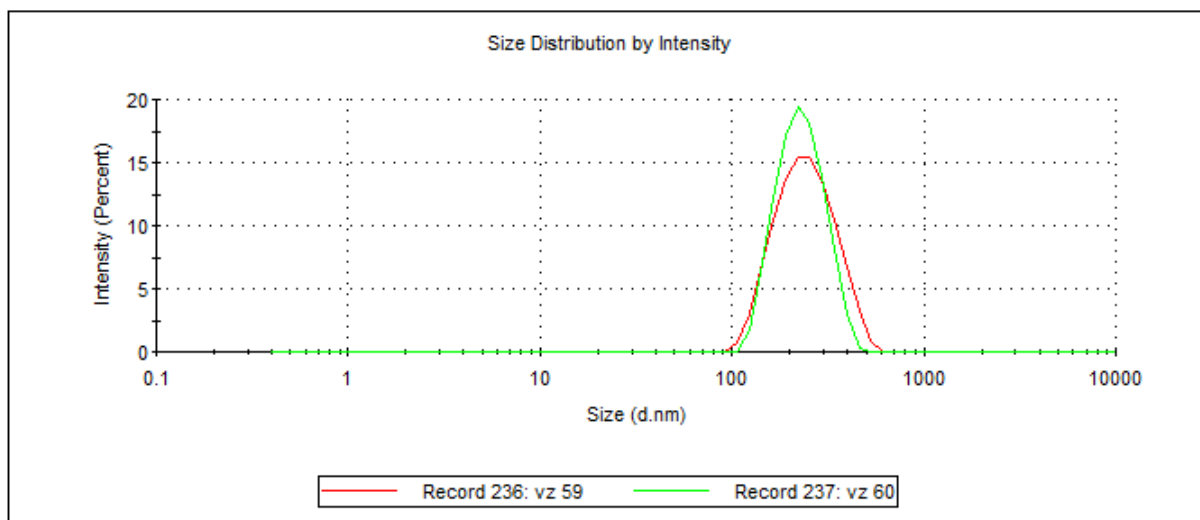
Vzorek	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
222	62,69	0,083	68,54	0	0	100	0	0
223	64,56	0,115	73,1	0	0	100	0	0
224	62,91	0,165	75,39	0	0	100	0	0
225	177,2	1	748,7	68,66	0	69,7	30,3	0
226	372,5	0,485	949,2	230,8	0	68,7	31,3	0
227	233,6	0,534	442,5	4112	25,26	92,8	5,6	1,7
228	60,12	0,084	65,73	0	0	100	0	0
229	58,13	0,027	60,98	0	0	100	0	0
230	73,01	0,080	80,25	0	0	100	0	0

6. Obrázky

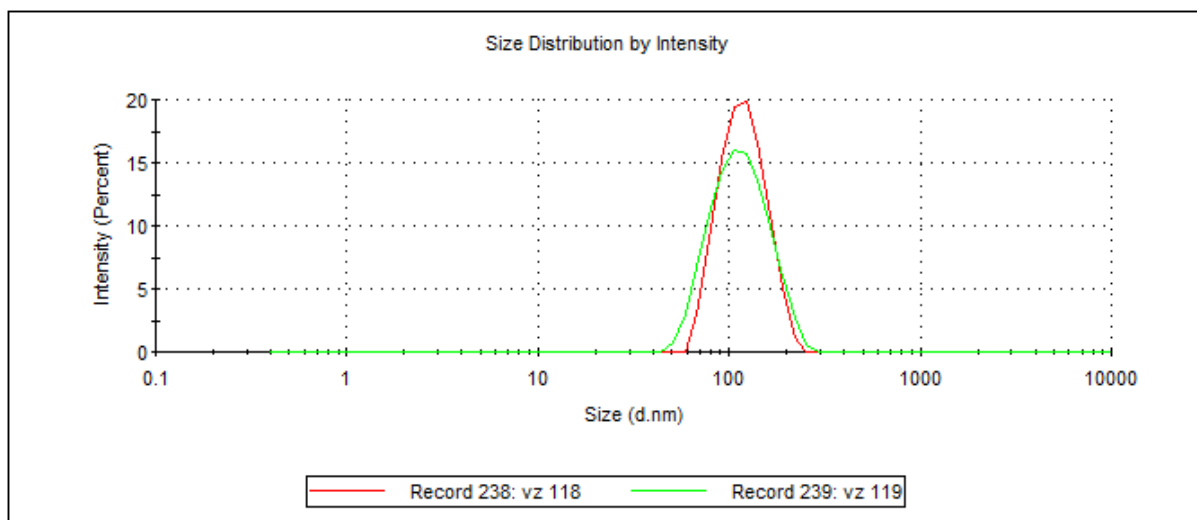
Obr. 4: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 35-38 (složení: 3% PLGA nebo T3, koncentrace BT 10 nebo 30%, 20% emulze, rozpouštědlo EMK, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 2F



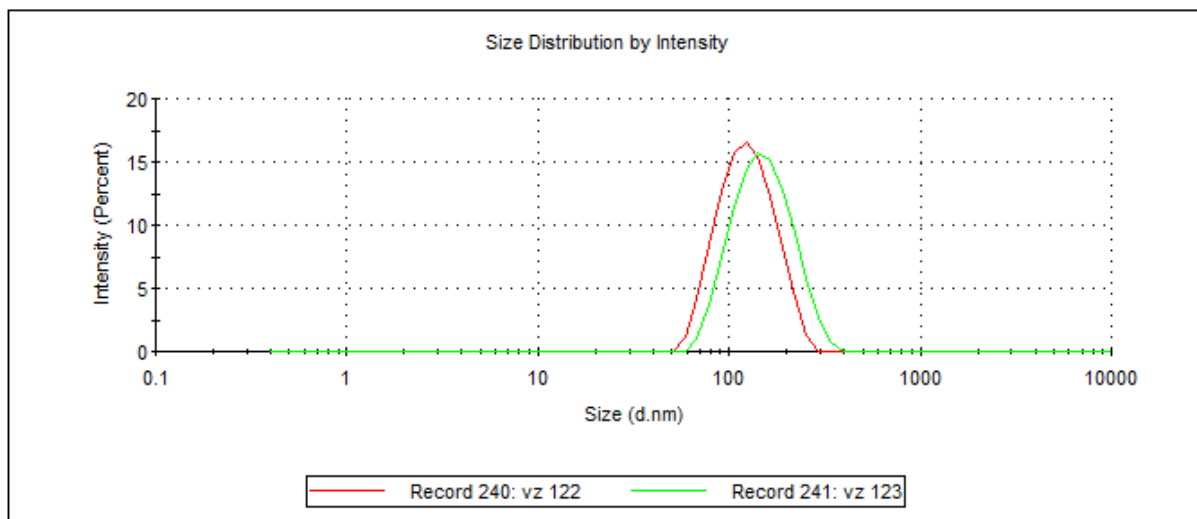
Obr. 5: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 59-60 (složení: 3% T3, koncentrace BT 10 nebo 30%, 20% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 1F



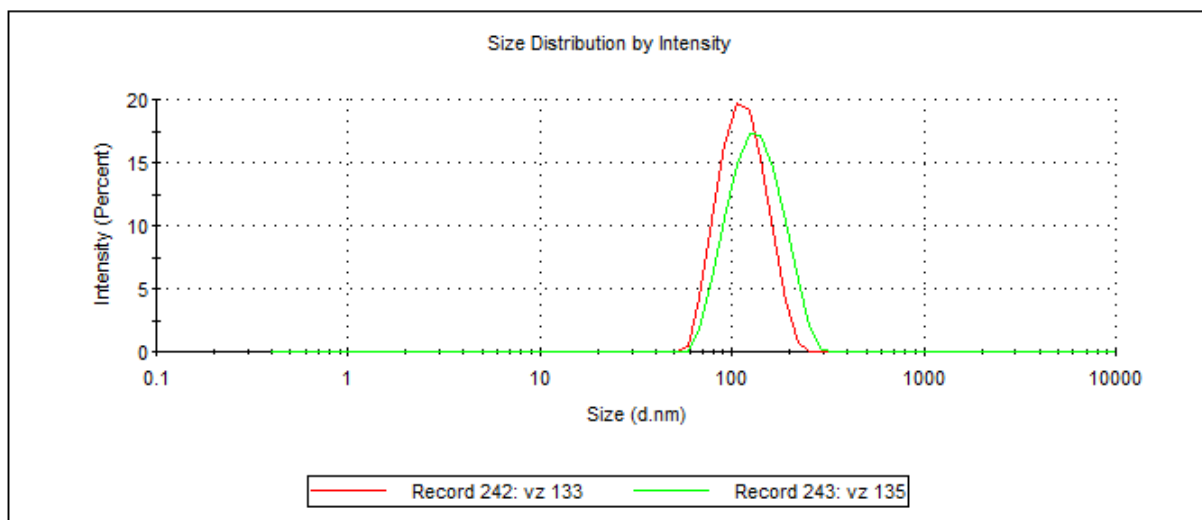
Obr. 6: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 118 a 119 (složení: 1% T3, aditivum 4% MeOH nebo aceton, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4D



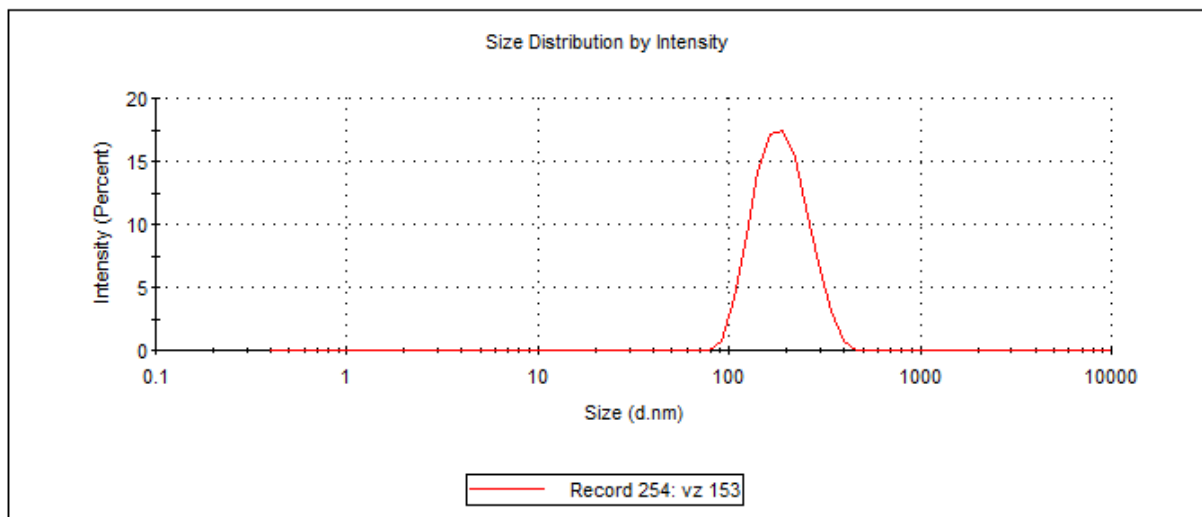
Obr. 7: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 122 a 123 (složení: 1% T3, aditivum 10% nebo 50% aceton, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4



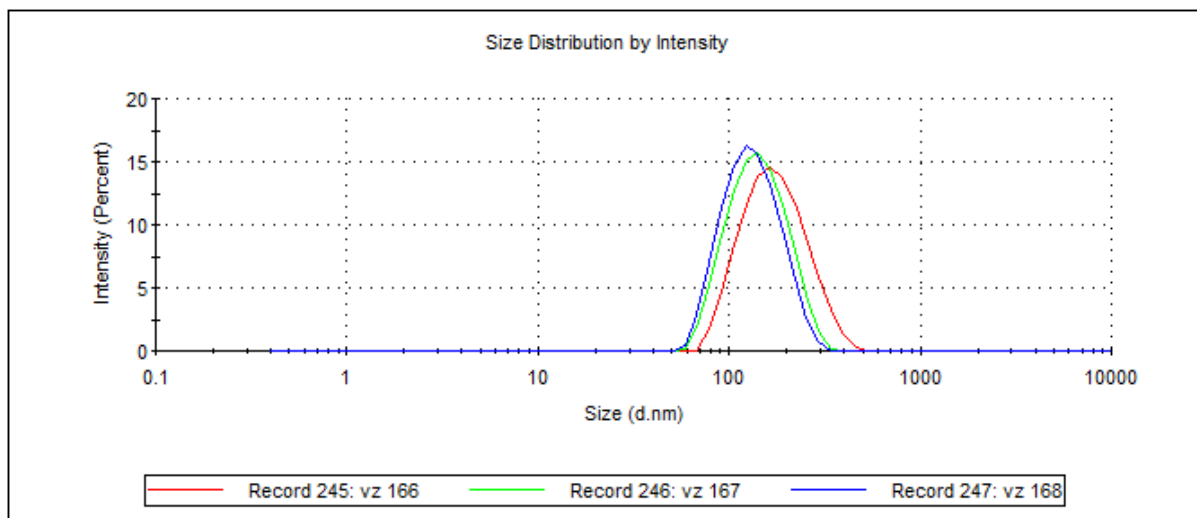
Obr. 8: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 133 a 135 (složení: 1% T3, aditivum 20% nebo 50% MeOH, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4B nebo 4D



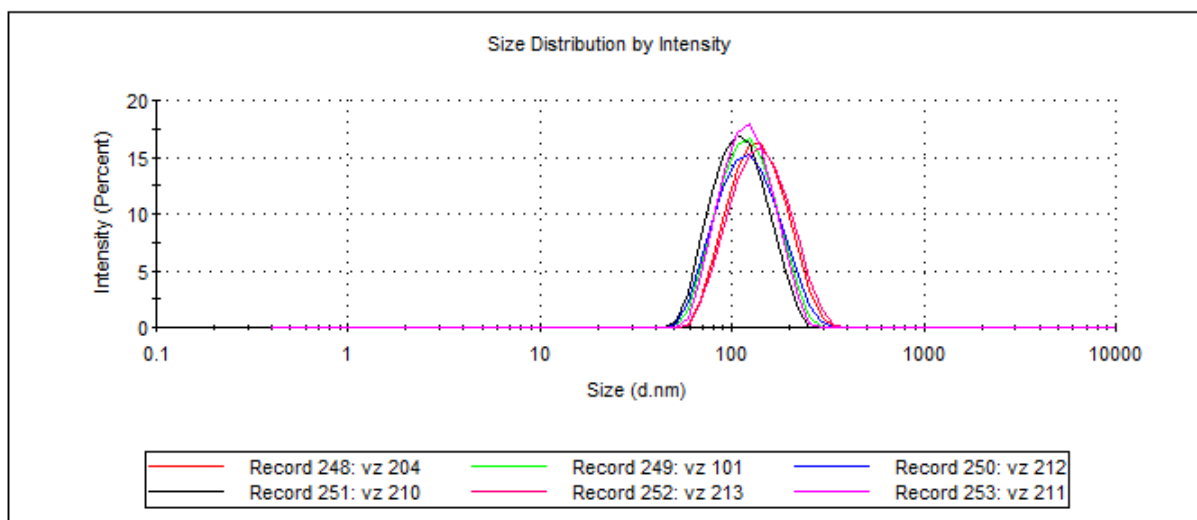
Obr. 9: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 153 (složení: 1% T3, aditivum 10% MeOH, 20% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4



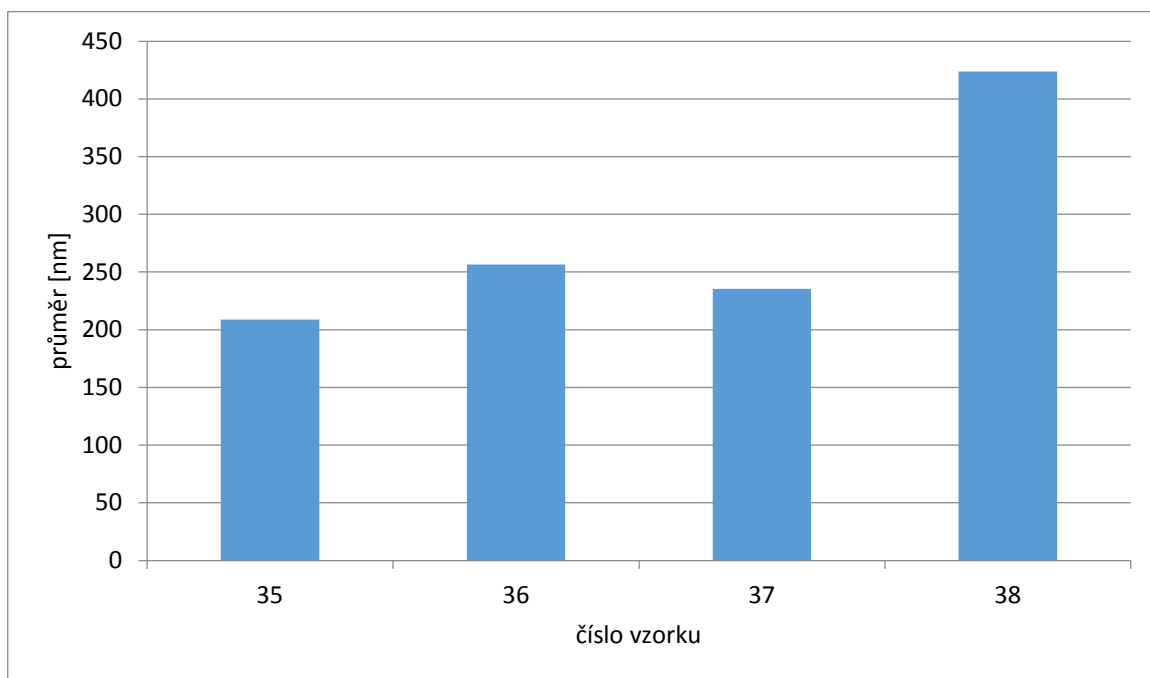
Obr. 10: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 166-168 (složení: 1% PLGA, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,05-1%). Metoda přípravy 4



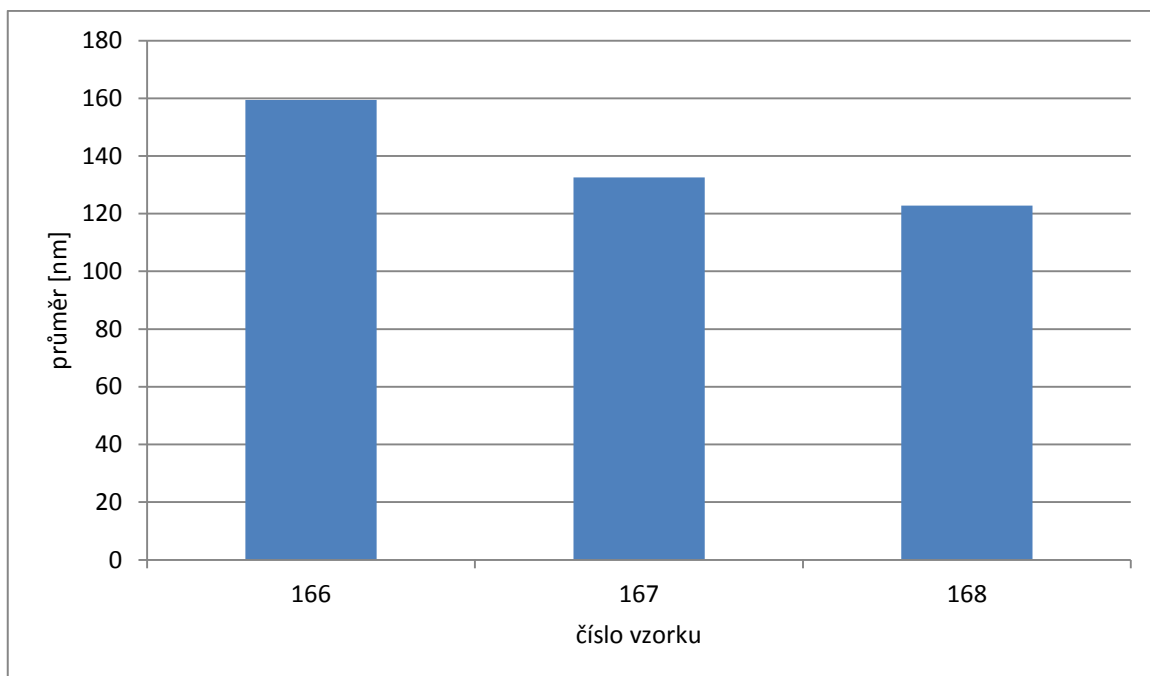
Obr. 11: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 101, 204, 210-213 (složení: 1% T3, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,05-1%). Metoda přípravy 4



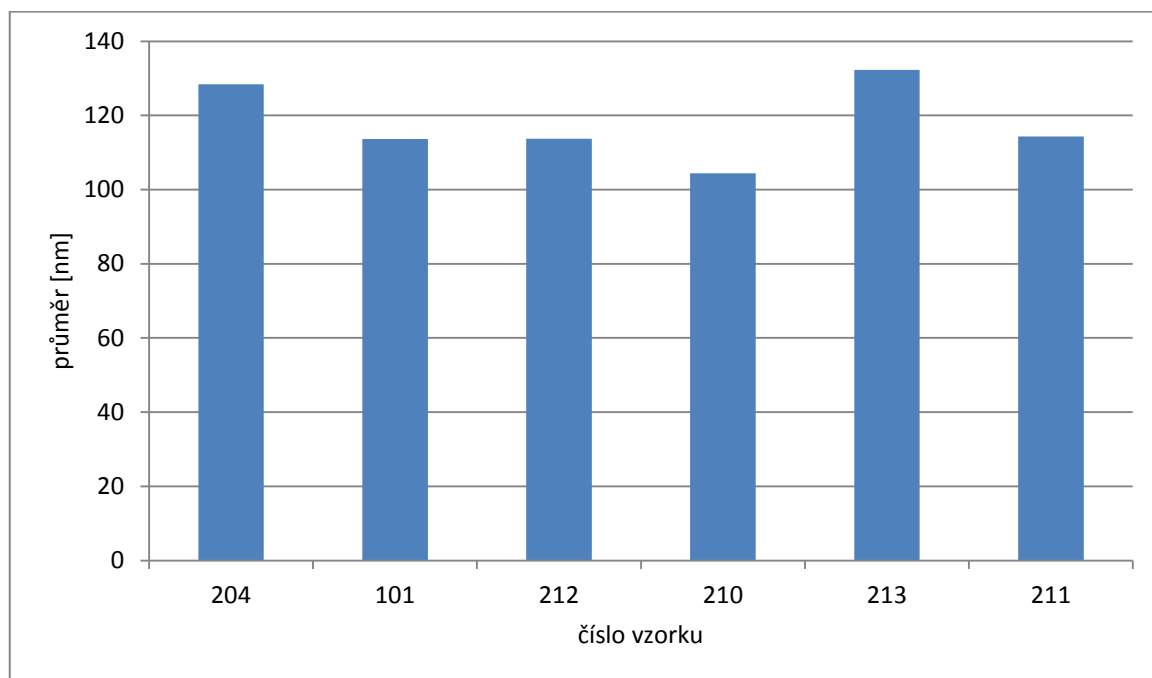
Obr. 12: Vliv druhu polymer (3% PLGA nebo T3) a koncentrace BT (10 nebo 30%) na velikost částic po 3 dnech stání a centrifugaci. Popis vzorků v Tab. 7a



Obr. 13: Vliv koncentrace cetrimidu (0,05-1%) na velikost částic po 30 minutách míchání na magnetické míchačce. Popis vzorků v Tab. 19a



Obr. 14: Vliv koncentrace cetrimidu (0,05-1%) na velikost částic po 30 minutách míchání na magnetické míchačce. Popis vzorků v Tab.13a a 19a



7. Diskuse

7.1 K použitému typu emulgátoru

V první fázi byly vyzkoušeny dva velmi aktivní emulgátory odlišné z hlediska náboje. Cetrimid hydrobromid se osvědčil v dříve realizovaných experimentech, laurylsíran sodný byl vysoce účinný při dispergaci, při vyšších koncentracích však solubilizoval nosiče, proto byl použit ve velmi nízké koncentraci. V tab. 4 jsou uvedeny detailní podmínky složení disperzní soustavy a parametry připravených disperzí. Krátká doba dispergace vnitřní fáze tvořené roztoky polymerů v ethylmethylketonu a relativně vysoká koncentrace emulze byly příčinou příliš velkých a velmi polydisperzních částic. Částice s povrchově vázaným cetrimidem měly bimodální distribuci velikosti, částice s laurylsíranem sodným byly neměřitelné jednak z hlediska vysoké polydisperzity a patrně také z důvodu jejich zmenšování při jejich postupné solubilizaci. Solubilizace laurylsíranem se týkala především větveného nosiče T3.

7.2 K inkorporaci terbinafinu

Při přípravě 20% emulze ethylmethylketonového roztoku vybraných nosičů PLGA a T3 byl do této vnitřní fázi inkorporován terbinafin v 10% a v 30% koncentraci. Jak je patrné z tab. 5, byly získány velké částice. Větší byly při použití nosiče T3, což je patrně způsobeno vlivem jeho vyšší hodnoty molekulové hmotnosti. V případě tohoto nosiče mělo zvýšení koncentrace terbinafinu vliv na dosažení menší velikosti částic, u PLGA nebyla tato závislost pozorována.

Tab. 6 obsahuje soubor vzorků, které se lišily nejen polymerním nosičem a koncentrací báze terbinafinu, ale také vyšší koncentrací roztoku polymeru, případně i centrifugací dlouhodobějším mícháním. Bylo prokázáno, že dispergace vnitřní fáze z roztoku v ethylmethylketonu vede k relativně větším částicím. Jejich velikost se zvýší po zvýšení koncentrace terbinafinu. Dlouhodobé míchání disperze stabilizované cetrimidem má důsledek ve standardizaci velikosti patrně pokračujícím procesem aglomerace. Centrifugace vede k podstatnému snížení polydisperzity odstraněním velkých částic s dosažením středního rozměru 280 až 375 nm ovlivněného typem polymeru a koncentrací terbinafinu.

7.3 Ke stabilitě disperze s terbinafinem

Vnitřní fáze emulze byla při přípravě tvořena roztokem polymeru PLGA nebo T3 a terbinafinu v koncentraci 10% nebo 30% v ethylmethylnketonovém rozpouštědle. Disperze připravené dvouminutovým mícháním byly podrobeny stresovým podmínkám tříhodinového míchání nebo třídenního uchovávání při 5°C či kombinací třídenního uchovávání a následné centrifugace. Výsledky testování jsou v tab. 7 a obr. 4 a 12. Bylo prokázáno, že částice z nosiče T3 se po uchovávání zmenšily. Centrifugace disperzí se osvědčila především u polymeru PLGA. U polymeru T3 mohlo dojít při centrifugaci i při dlouhodobějším stání k částečné aglomeraci vzorků s vyšší (30%) koncentrací terbinafinu.

7.4 Ke stabilitě disperzí připravených z roztoků v dimethylsulfoxidu

Dimethylsulfoxid je dobré rozpouštědlo polymerů, od ethylmethylnketonu se liší neomezenou mísitelností s vodou. Proto je vysoce pravděpodobné, že částice vznikají nejen v důsledku střížných sil při intenzivním míchání, ale také vlivem spontánního intenzivního turbulentního toku rozpouštědla z vnitřní do vnější fáze.

Vliv polymerního nosiče a koncentrace terbinafinu na velikost částic jsou uvedeny v tab. 8. Pozitivně je možno hodnotit značně menší velikost částic. Zvyšování koncentrace terbinafinu vede ke zvyšování velikosti i polydisperzity velikosti částic. Pozitivní skutečností je odolnost disperzí k centrifugaci.

V tab. 9 a obr. 5 je obdobný soubor vzorků jako v tab. 8 hodnocený z hlediska třídenní stability. Pozoruhodná je velmi malá polydisperzita velikosti zvláště v případě nosiče T3. Zmenšení částic po třídenním uchovávání může mít příčinu v rozdělování rozpouštědla nebo v degradaci a rozpouštění nosiče. Vliv koncentrace terbinafinu na velikost částic byl prokázán u nosiče T3, v případě PLGA nebyl.

7.5 Ke stabilitě disperzí připravených z roztoků v dichlormethanu

Dichlormethan je možno pokládat za klasické rozpouštědlo alifatických polyesterů při výrobě mikročástic. Příkladem může být přípravek Lupron Depot. V tab. 10 jsou údaje týkající se postupu přípravy vzorků obvyklým postupem dispergace roztoků polymeru T3 a terbinafinu ve vodné fázi a dispergací ve vnější vodné fázi s 2% příměsí dichlormethanu. Disperze byla těsně po dispergaci dvojnásobně zředěna vodou. Byl prokázán pozitivní vliv sycení vnější fáze. Se zvyšováním koncentrace terbinafinu byla prokázána tendence ke zmenšování částic. Centrifugace vedla k oddělení větších

částic, průměrná velikost se snížila téměř na polovinu, snížila se i polydisperzita velikosti. Po třídním uchovávání disperze byl prokázán menší rozměr částic připravených disperzací ve vnější fázi sycené dichlormethanem. Vliv koncentrace terbinafinu na velikost částic se neprojevil (tab. 11).

7.6 Srovnání vlivu dichlormethanu a acetonu jako rozpouštědel polymeru T3 a terbinafinu na velikost částic

Vliv byl hodnocen na vzorcích připravených z 10% emulze obsahující 1% roztok polymeru a odstupňovanou koncentrací terbinafinu. V tab. 12 bylo jednoznačně prokázáno, že aceton jako rozpouštědlo vede k přípravě menších částic s menší polydisperzitou než dichlormethan. Vliv rostoucí koncentrace terbinafinu byl opačný. Zatímco při použití acetonu se částice s rostoucí koncentrací zvětšovaly, v dichlormethanu tomu bylo opačně. Vysvětlení je patrně možno hledat v různé viskozitě vnitřní fáze emulze.

7.7 Srovnání vlivu methanolu a acetonu jako příměsí dimethylsulfoxidu ve vnitřní fázi na velikost částic

Účelem bylo vyzkoušet vliv změny viskozity vnitřní fáze a různé rychlosti rozdělování rozpouštědla z vnitřní do vnější fáze. Z tab. 13 je patrné, že u obou polymerních nosičů přísada methanolu má vliv na získání větších částic, aceton se neprojevil. Dimethylsulfoxid byl tedy vhodnějším rozpouštědlem než jeho směsí. Vzorky neobsahovaly terbinafin.

Obdobné vzorky byly podrobeny jednak dlouhodobějšímu míchání, jednak jednodennímu uchovávání při snížené teplotě. Výsledky prezentované v tab. 14 a obr. 6 vedou k závěru o nevhodnosti methanolu a acetonu jako aditiv v dané koncentraci. Jako pozitivní skutečnost je možno hodnotit stálost velikosti částic bez prokázané aglomerace nebo bobtnání.

Další vzorky byly připravené s výrazně vyšším podílem methanolu nebo acetonu v dimethylsulfoxidu. Vzorky jsou popsány v tab. 15. Jako překvapivý výsledek je možno hodnotit vliv acetonu na zvětšení částic a prakticky nulový vliv methanolu na velikost částic.

Stabilita disperzí z granulometrického hlediska je zhodnocena v tab. 16 a obr. 8. Výsledky měření potvrzují stabilní disperze s velmi nízkými hodnotami indexu polydisperzity. S rostoucí koncentrací acetonu dochází k růstu granulometrické

charakteristiky. Optimální koncentrace methanolu ve směsi s dimethylsulfoxidem byla 20%.

Po zvýšení koncentrace emulze z 5% na 10% byly získány značně větší částice, které se zvětšovaly se zvyšující se koncentrací acetonu i metanolu (tab. 17). Největší částice připravené v samotném 100% acetonu byly těsně pod hranicí 200 nm. Charakteristiky analogických vzorků částic připravených ve 20% emulzi jsou popsány v tab. 18. Zvýšení koncentrace emulze na dvojnásobek vedlo k dalšímu zvětšení částic (tab. 18). V případě samotného acetonu byla překročena hranice 200 nm. Při jeho nejnižší vyzkoušené 10% koncentraci ve směsi s dimethylsulfoxidem byly získány nejmenší částice s intenzitním průměrem necelých 170 nm.

7.8 Vliv koncentrace cetrimidu na velikost částic z PLGA, T3, A2 a A4

V tab. 19b jsou parametry vzorků z PLGA. Z naměřených hodnot velikostního parametru jednoznačně vyplývá, že při velmi nízké polydisperzitě dochází k výraznému snížení hodnot střední velikosti částic se zvyšující se koncentrací cetrimidu v rozpětí jeho koncentrací od 0,05% do 1,00% (viz. obr.10 a 13).

Z polymeru T3 byl připraven dvojnásobný počet vzorků ve stejném rozpětí koncentrací. V tomto případě nebyl prokázán jednoznačný trend vlivu změny koncentrace emulgátoru na velikost částic (obr. 11 a 14). Největší částice byly připraveny nejen při 0,05% koncentraci, ale také při 0,75% koncentraci. Jako optimální koncentrace se jevila hodnota 0,5%.

Dalšími polymery vybranými pro testování účinnosti emulgátoru byly sloučeniny získané větvením PLGA na polyakrylové kyselině. Jak je z tab. 20 patrné, u nosiče označeného jako A2 se dispergační účinnost zvýšila po zvýšení koncentrace z 0,2% na 0,5%. Je zajímavé, že u polymeru A4 tomu bylo opačně, nejvhodnější koncentrace byla 0,2%.

7.9 Vliv koncentrace polysorbátu 20, směsi polysorbátu s lecithinem a poloxameru 470 na velikost částic z A2

Polymer označený písmenem A se vyznačoval koncovými karboxyly. Každý ze tří výše uvedených emulgátorů byl vyzkoušen ve třech úrovních koncentrací. Rozpouštědlem byl dimethylsulfoxid. Vzhledem k dřívějším zkušenostem s jinými rozpouštědly než byl dimethylsulfoxid, byla velmi překvapivým výsledkem výrazně nejnižší účinnost směsi stejných dílů lecithinu a polysorbátu (tab. 21). Částice získané

pomocí stejných koncentrací samotného polysorbátu byly výrazně menší, stejně tak jako částice připravené ve vnější fázi s poloxamerem. Tyto dva tenzidy neionického typu mohou být vhodnou alternativou ke kationickým tenzidům samotným nebo ke studiu možností využití jejich směsí s kationickými tenzidy.

8. Závěry

- A) Emulzní metoda přípravy nanočástic z biodegradabilních polyesterů je velmi flexibilní z hlediska možností měnit koncentraci složek při přípravě a dostatečně robustní při manipulaci s disperzemi a při jejich uchovávání.
- B) Jako rozpouštědlo polymerů ve vnitřní fázi emulze se projevil jako nejvhodnější dimethylsulfoxid, méně vhodný je aceton, jako nevhodný se projevil dichlormethan a překvapivě ethylmethyketon.
- C) Směsi dimethylsulfoxidu s acetonem nebo methanolem v široké škále koncentrací složek nejsou výhodnější než samotný dimethylsulfoxid.
- D) Vhodným emulgátorem je cetrimid, který je dostatečně účinný v koncentraci 0,05%, jeho optimální koncentrace je v rozmezí 0,2 až 0,5 %.
- E) Byla prokázána vysoká účinnost polysorbátu 20 a poloxameru 407 s možností použití jejich směsí s kationickými tensidy pro modifikaci charakteristik povrchu nanočástic.
- F) Inkorporace terbinafinu v koncentraci do 30% neovlivní výrazně velikost částic.
- G) Nanodisperze polyesterových částic jsou dostatečně odolné k aglomeraci při jejich několikanásobném uchovávání a při jejich frakcionaci centrifugací.

9. Seznam použitých zkratek

Z-Ave	zeta průměr – střední průměr velikosti částic ve vzorku	
Pdl	index polydisperzity – určuje velikost částic ve vzorku a má hodnoty v rozmezí 0 až 1; pokud je 0, tak jsou všechny částice velikostně stejné	
Pk	Mean	výška píku
Intensity		
Pk	Area	plocha píku
Intensity		
T3	terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu	
PLGA	kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové 50:50	
A2	terpolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větven na 2% kyselině polyakrylové	
A4	terpolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větven na 4% kyselině polyakrylové	
EMK	ethylmethylketon	
DMSO	dimethylsulfoxid	
DCM	dichlormethan	
BT	Báze terbinafinu připravena alkalizací vodného roztoku hydrochloridu a filtrací sraženiny (viz 3.1)	
MeOH	Methanol	
Cetrimid	N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid	
NaLS	laurylsíran sodný	
LEC	lecithin hydrogenovaný	
PSB	polysorbát 20	
POLOX	poloxamer 407	
Acet	aceton	

10. Seznam použitých tabulek

Tab. 1: Složení emulzních soustav (50g vzorku)	24
Tab. 2: Příprava nanočástic.....	24
Tab. 3: Další práce se vzorkem po přípravě.....	25
Tab. 4a: Složení vzorků 1-4.....	26
Tab. 4b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1% T3 nebo PLGA) a emulgátoru (0,025% NaLS nebo 0,2% cetrimid) na velikost částic.....	26
Tab. 5a: Složení vzorků 5-13.....	27
Tab. 5b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (1% PLGA nebo T3) a koncentrace BT (10 nebo 30 %) na velikost částic.....	27
Tab. 6a: Složení vzorků 17-27.....	28
Tab. 6b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic...28	
Tab. 7a: Složení vzorků 28-38.....	29
Tab. 7b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic...29	
Tab. 8a: Složení vzorků 39-97.....	30
Tab. 8b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (0, 10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic.....	30
Tab. 9a: Složení vzorků 53-60.....	31
Tab. 9b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (3% PLGA nebo T3), koncentrace BT (10 nebo 30%) a zacházení se vzorkem na velikost částic...31	
Tab. 10a: Složení vzorků 62-72.....	32
Tab. 10b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace BT (0, 10 nebo 30%), sycení vnější fáze DCM (0 nebo 2%) a zacházení se vzorkem na velikost částic.....	32
Tab. 11a: Složení vzorků 75-80.....	33
Tab. 11b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace BT (0, 10 nebo 30%), sycení vnější fáze DCM (0 nebo 2%) a zacházení se vzorkem na velikost částic.....	33
Tab. 12a: Složení vzorků 84-91.....	34

Tab. 12b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv rozpouštědla (DCM nebo aceton) a koncentrace BT (0, 10 nebo 30%) na velikost částic.....	34
Tab. 13a: Složení vzorků 98-107.....	35
Tab. 13b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (1% PLGA nebo T3), aditiva k vnitřní fázi (4% MeOH nebo aceton) a zacházení se vzorkem na velikost částic.....	35
Tab. 14a: Složení vzorků 108-119.....	36
Tab. 14b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymer (1% PLGA nebo T3), aditiva k vnitřní fázi (4% MeOH nebo aceton) a zacházení se vzorkem na velikost částic.....	36
Tab. 15a: Složení vzorků 122-130.....	37
Tab. 15b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50, 100% aceton) a zacházení se vzorkem u 5% emulze na velikost částic.....	37
Tab. 16a: Složení vzorků 131-139.....	38
Tab. 16b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50, 100% aceton) a zacházení se vzorkem u 5% emulze na velikost částic.....	38
Tab. 17a: Složení vzorků 140-152.....	39
Tab. 17b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50, 100% aceton) a zacházení se vzorkem u 10% emulze na velikost částic.....	39
Tab. 18a: Složení vzorků 153-165.....	40
Tab. 18b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv aditiva k vnitřní fázi (10, 20, 50% MeOH nebo 10, 50, 100% aceton) a zacházení se vzorkem u 20% emulze na velikost částic.....	40
Tab. 19a: Složení vzorků 166-213.....	41
Tab. 19b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace cetrimidu (0,05%, 0,5% nebo 1%) na velikost částic s 1% PLGA.....	41
Tab. 20a: Složení vzorků 215-221.....	42
Tab. 20b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace cetrimidu (0,2%, 0,5% nebo 1%) na velikost částic u polymeru (1% A2 nebo A4).....	42
Tab. 21a: Složení vzorků 222-230.....	43

Tab. 21b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,2%, 0,5% nebo 1%) a druhu(PS, LEC+PS nebo POLOX) emulgatoru na velikost částic.....43

11. Seznam použitých obrázků

Obr. 1: Příklad polymerních nanočástic s PACA jádrem, kde slouží vitamín B7 ke specifickému rozpoznání různých rakovinných buněk nebo kurkuminoidy jako beta peptid, marker Alzheimerovy choroby.....	11
Obr. 2: Různé typy nanočástic.....	15
Obr. 3: Chemická struktura PLGA a jeho monomery.....	17
Obr. 4: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 35-38 (složení: 3% PLGA nebo T3, koncentrace BT 10 nebo 30%, 20% emulze, rozpouštědlo EMK, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 2F.....	44
Obr. 5: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 59-60 (složení: 3% T3, koncentrace BT 10 nebo 30%, 20% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 1F.....	44
Obr. 6: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 118 a 119 (složení: 1% T3, aditivum 4% MeOH nebo aceton, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4D.....	45
Obr. 7: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 122 a 123 (složení: 1% T3, aditivum 10% nebo 50% aceton, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4.....	45
Obr. 8: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 133 a 135 (složení: 1% T3, aditivum 20% nebo 50% MeOH, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4B nebo 4D.....	46
Obr. 9: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 153 (složení: 1% T3, aditivum 10% MeOH, 20% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,2%). Metoda přípravy 4.....	46
Obr. 10: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 166-168 (složení: 1% PLGA, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,05-1%). Metoda přípravy 4.....	47
Obr. 11: Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 101, 204, 210-213 (složení: 1% T3, 5% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor CET 0,05-1%). Metoda přípravy 4.....	47
Obr. 12: Vliv druhu polymeru (3% PLGA nebo T3) a koncentrace BT (10 nebo 30%) na velikost částic po 3 dnech stání a centrifugaci. Popis vzorků v Tab.7a.....	48

Obr. 13: Vliv koncentrace cetrimidu (0,05-1%) na velikost částic po 30 minutách míchání na magnetické míchačce. Popis vzorků v Tab.19a.	48
Obr. 14: Vliv koncentrace cetrimidu (0,05-1%) na velikost částic po 30 minutách míchání na magnetické míchačce. Popis vzorků v Tab.13a a 19a.	49

12. Seznam použité literatury

1. ISO Standard 80004-4: Nanotechnologies – Vocabulary–Part 4: Nanostructured materials. International Organisation for Standardisation, Geneva, Švýcarsko (2011).
2. Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu 2011/696/EU, 2011.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:CS:P>
DF, staženo 24. března 2015.
3. Technical fact sheet – nanomaterials (EPA - United States Environmental Protection Agency, 2014. http://www2.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan_2014_final.pdf, 24. března 2015.
4. Sanderson P, Delgado-Saborit J M, Harrison M R: A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles. *Atmospheric Environment* 2014; 94: 353-365.
5. Goel A, Kumar P: A review of fundamental drivers governing the emissions, dispersion and exposure to vehicle-emitted nanoparticles at signalised traffic intersections. *Atmospheric Environment* 2014; 97: 316- 331.
6. Zhu Y, Hinds W C, Kim S, Shen S, Sioutas C: Seasonal Trends of Concentration and Size Distribution of Ultrafine Particles Near Major Highways in Los Angeles
Special Issue of Aerosol Science and Technology on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program. *Aerosol Sci. Technol.* 2004; 38: 5-13.
7. Dohnalová L, Dohnal V: Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické Listy* 2015; 109: 444–450.
8. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P: Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014; 71: 86–97.
9. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug

delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 75: 1-18.

10. Diab R, Jaafar-Malej C, Fessi H, Maincent P: Engineered nanoparticulate drug delivery systems: the next frontier for oral administration? *AAPS J* 2012; 14: 688-702.

11. Dobrovolskaia M A, McNeil S E: Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2: 469–478.

12. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P: Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J. Controlled Release* 2013; 166: 182–194.

13. L. Qiu L, Bae Y, Bae Y, Bae H: Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1–30.

14. Duncan R: The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 347–360.

15. Li X, Yang Z, Yang K, Zhou Y, Chen X, Zhang Y, Wang F, Liu Y, Ren L: Self-assembled polymeric micellar nanoparticles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drug etaselen. *Nanoscale Res. Lett.* 2009; 4: 1502–1511.

16. Wissing S A, Kayser O, Muller R H: Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1257–1272.

17. Rihova B, Kovar M: Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62: 184–191.

18. Dobrovolskaia M A, McNeil S E: Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2: 469–478.

19. Goldberg M, Langer R, Jia X: Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007; 18: 241- 268.

20. De Jong W H, Borm P J: Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3: 133–149.

21. Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C: Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005; 19: 311–330.
22. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z G, Shin D M: Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1310–1316.
23. Zolnik B S, Sadrieh N: Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61: 422–427.
24. Juzenas P, Chen W, Sun Y P, Coelho M A, Generalov R, Generalova N, Christensen I L: Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 1600–1614.
25. Probst C E, Zrazhevskiy P, Bagalkot V, Gao X: Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.036>, In press.
26. Ahmad M Z, Akhter S, Jain G K, Rahman M, Pathan S A, Ahmad F J, Khar R K: Metallic nanoparticles: Technology overview & drug delivery applications in oncology. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010; 7: 927–942.
27. Fadeel B, Garcia-Bennett A E: Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62: 362–374.
28. Nair LS, Laurencin CT: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007; 32: 762-798.
29. Katti DS, Lakshmi S, Langer R, Laurencin CT. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 933–61.
30. Makadia H K, Siegel S J: Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011; 3(3): 1377-1397.
31. Siegel S J, Kahn J B, Metzger K, Winey K I, Werner K, Dan N: Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 64(3): 287-93.

- 32.** Houchin M L, Topp E M: Physical properties of PLGA films during polymer degradation. *J Appl Polym Sci.* 2009; 114: 2848–2854.
- 33.** Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S, Shakesheff K M: Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev.* 1999; 99(11): 3181-98.
- 34.** Panagi Z, Beletsi A, Evangelatos G, Livaniou E, Ithakissios D S, Avgoustakis K: Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm.* 2001; 221(1-2): 143-52.
- 35.** Pai S S, Tilton R D, Przybycien T M: Poly(ethylene glycol)-modified proteins: Implications for poly(lactide-co-glycolide)-based microsphere delivery. *AAPS J* 2009; 11: 88-98. [PubMed: 19199044]
- 36.** Anderson J M, Shive M S: Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 28: 5–24.
- 37.** Olivier J C, Fenart L, Chauvet R, Pariat C, Cecchelli R, Couet W: Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm Res.* 1999; 16: 1836–1842.
- 38.** Krishnan-Natesan S: Terbinafine: a pharmacological and clinical review. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009; 10: 2723–2733.