



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

*ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ  
ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ  
ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ*

*Διπλωματική Εργασία*

*Αφροδίτη Γαϊτανάρου*

*Επιβλέπουσα:*

**Δρ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ**

*Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΜΠ*

**ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2013**

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012 – 2013.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ Αναστασία Δέτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την άψογη συνεργασία, την καθοδήγησή της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και πιο συγκεκριμένα:

Την Δρ. Σταματίνα Βουγιούκα, Λέκτορα Ε.Μ.Π., για την πολύτιμη βοήθειά της και τις χρήσιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, και τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Κ. Δ. Παπασπυρίδη, για τη συνεισφορά του στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τη Μαρίνα Ρουσσάκη, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, την υπομονή και τη συμπαράσταση που μου έδειξε σε κάθε βήμα της ερευνητικής αυτής εργασίας. Χωρίς τη βοήθειά της και τις πολύτιμες υποδείξεις της, η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευαγγελία Παυλάτου, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και τον Λέκτορα ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα, για τη διάθεση της φυγοκέντρου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το φιλικό κλίμα και την ομαδικότητα που έδειξαν, καθιστώντας ευκολότερη τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

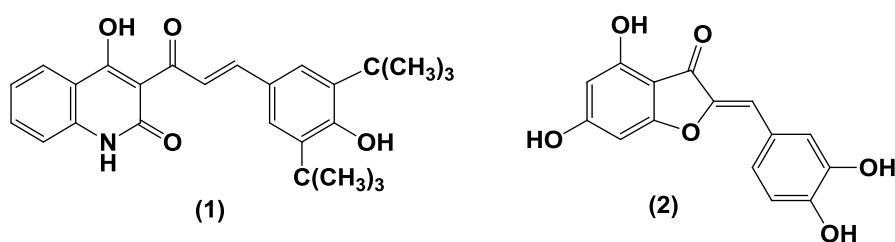
Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη συνεχή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου για την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

*Στη μνήμη του Πατέρα μου*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού βιοδραστικών μορίων έχουν ευρύ φάσμα δυνατοτήτων, καθώς βελτιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών ουσιών, βοηθούν στη στόχευση και ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων, καθώς και στην προστασία ασταθών ενώσεων. Σήμερα διεξάγεται έρευνα για την ανάπτυξη περισσότερων από 100 ειδών νανοσωματιδιακών δομών εγκλεισμού και μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών.

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι να μελετηθεί η δυνατότητα εγκλεισμού σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA) δυο ενώσεων που παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και έχουν μελετηθεί για τη βιολογική τους δράση. Για τη μελέτη, επιλέχθηκαν η κινολινυλο-χαλκόνη **1**, η οποία εμφανίζει ισχυρή αντιπαρασιτική δράση, αλλά είναι κυτταροτοξική και εμφανίζει πολύ περιορισμένη διαλυτότητα στους κοινούς οργανικούς διαλύτες ενώ είναι αδιάλυτη στο νερό, και η ωρεοσιδίνη **2**, μια φυσική ωρόνη με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.



Πραγματοποιήθηκε αρχικά η σύνθεση των δυο ενώσεων και στη συνέχεια ο εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια PLA, σύμφωνα με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση των παραγόντων της διεργασίας στα χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων και την απόδοση του εγκλεισμού (encapsulation efficiency). Απώτερος σκοπός των πειραμάτων αυτών είναι η αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων *in vivo* κι η μείωση της κυτταροτοξικότητάς τους, χωρίς την παράλληλη μείωση της δραστηριότητάς τους.

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων αναφορικά με το μέγεθος, το ζ-δυναμικό και τον δείκτη πολυδιασποράς τους, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Οι μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων επαναλήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με σκοπό να μελετηθεί η σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε συνθήκες αποθήκευσης. Ο προσδιορισμός της ικανότητας εγκλεισμού των μορίων στα νανοσωματίδια, πραγματοποιήθηκε εμμέσως, με φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), μέσω προσδιορισμού των μη εγκλεισμένων ενώσεων. Τέλος, ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

*Επιστημονικό Πεδίο: Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ενώσεων*

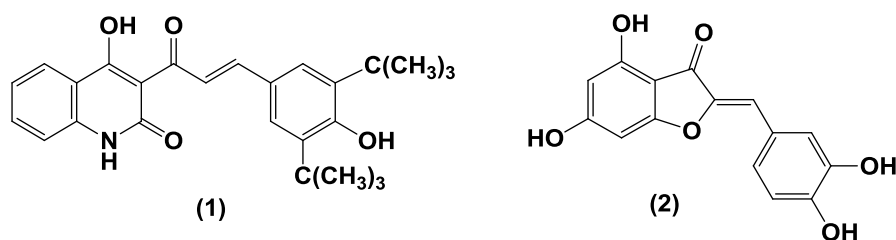
*Λέξεις κλειδιά: Χαλκόνες, ωρόνες, εγκλεισμός, νανοσωματίδια*

## ABSTRACT

---

Encapsulation of active ingredients in nanoparticles has tremendous potential in the pharmaceutical and cosmetics industry as it can enhance penetration for a better efficacy, help target specific cells, thus resulting in better drug delivery, as well as protect unstable compounds. Currently, over a 100 kinds of nanoparticles are being under various stages of development and their efficacy evaluation.

The present work focuses on the study of the encapsulation of two bioactive organic compounds synthesized in the Laboratory of Organic Chemistry, namely the antiparasitic quinolinyl-chalcone **1** and the antioxidant natural product aureusidin **2**, in nanoparticles comprised by poly(lactic acid) (PLA).



The compounds **1** and **2** were synthesized and encapsulated in PLA nanoparticles, using the emulsification - solvent evaporation methodology. Our aim is to investigate the parameters that could control the efficient encapsulation of these compounds in PLA nanoparticles, so as to overcome the problems related to solubility and toxicity without compromising their biological activity.

Size, polydispersity index and  $\zeta$ -potential determinations were performed by dynamic light scattering methods (DLS). The measurements concerning the size were run repeatedly during the project, in order to evaluate the storage stability of the nanoparticles. The encapsulation efficiency (EE) of compounds **1** and **2** in PLA nanoparticles was determined indirectly using UV-Vis spectrometry, by quantification of the non-encapsulated compound, which is retained in the aqueous phase after

nanoparticle recovery. Finally, the reproducibility of the technique was verified.

*Scientific Area: Nanoencapsulation of bioactive compounds*

*Keywords: chalcones, aurones, encapsulation, nanoparticles*

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
1.1. ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ .....	1
1.1.1. Γενικές Έννοιες – Ορισμοί.....	1
1.1.2. Σκοπός και Εφαρμογές του Νανοεγκλεισμού.....	3
1.1.3. Εφαρμογές Στη Φαρμακευτική.....	5
1.1.3.1. Ελεγχόμενη Χορήγηση Φαρμακευτικών Ουσιών .....	5
1.1.3.2. Συστήματα Δέσμευσης – Αποδέσμευσης Φαρμακευτικών Ουσιών.....	7
1.1.3.3. Βιοδιασπώμενα Πολυμερικά Συστήματα .....	8
1.1.3.4. Μηχανισμοί Αποδέσμευσης Ενεργών Μορίων .....	12
1.1.4. Τεχνικές Εγκλεισμού Μορίων Σε Νανοσωματίδια .....	15
1.1.5. Γαλακτωματοποίηση - Εξάτμιση του Διαλύτη .....	18
1.1.5.1. Παράγοντες της Διεργασίας.....	20
1.1.6. Φυσικοχημικές Ιδιότητες Νανοσωματιδίων.....	22
1.1.7. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων .....	23
1.2. ΧΑΛΚΟΝΕΣ - ΚΙΝΟΛΙΝΟΝΕΣ - ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ .....	25
1.3. ΩΡΟΝΕΣ .....	27
1.3.1. Δομή και Βιολογικές Ιδιότητες .....	27
1.3.2. Ωρεοσιδίνη .....	29
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>31</b>
2.1. ΌΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ .....	31
2.2. ΥΛΙΚΑ .....	31
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ .....	32
2.3.1. Σύνθεση των Βιοδραστικών Ενώσεων.....	32
2.3.1.1. Σύνθεση της κινολινυλο-χαλκόνης (1).....	32
2.3.1.2. Σύνθεση της ωρεοσιδίνης (2) .....	34
2.3.2. Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός Ενώσεων.....	38
2.3.3. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων .....	42
2.3.4. Μελέτη Σταθερότητας των Νανοσωματιδίων .....	44
2.3.5. Μελέτη της Επαναληψιμότητας της Μεθόδου .....	45
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>46</b>
3.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ .....	46
3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ .....	49
3.2.1. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, Z-Δυναμικό.....	49
3.2.1.1. Σύγκριση μεταξύ κινολινυλο-χαλκόνης 1 και ωρεοσιδίνης 2 .....	59
3.2.2. Απόδοση Εγκλεισμού των Βιοδραστικών Ενώσεων.....	63



3.2.2.1. Κινολιτυλο-χαλκόνη.....	63
3.2.2.2. Ωρεοσιδίνη .....	71
3.2.2.3. Σύγκριση της ικανότητας εγκλεισμού της κινολιτυλο-χαλκόνης και της ωρεοσιδίνης.....	76
3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ .....	77
3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	83
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>88</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ .....</b>	<b>90</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>92</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>97</b>

## Ευρετήριο Εικόνων

	Σελ.
Εικόνα 1.1. Δομές Βιοαποδομήσιμων Νανοσωματιδίων	2
Εικόνα 1.2. Επίπεδα περιπλοκότητας συστημάτων ελεγχόμενης χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών	8
Εικόνα 1.3. Μηχανισμοί Διάσπασης Πολυμερών <i>in vivo</i>	10
Εικόνα 1.4. Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών συστατικών	14
Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου απλού γαλακτώματος	18
Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διπλού γαλακτώματος	19
Εικόνα 1.7. Γενική Δομή χαλκονών (a) και κινολινονών (b)	25
Εικόνα 1.8. Χημικός τύπος κινολινυλο-χαλκόνης 1	26
Εικόνα 1.9. Γενική δομή (Z)-ωρονών	27
Εικόνα 1.10. Χημικός τύπος ωρεοσιδίνης	30
Εικόνα 2.1. Χημική δομή μορίου πολυ(γαλακτικού οξέος)	32
Εικόνα 2.2. Shaker Gallenkamp	40
Εικόνα 2.3. Φυγόκεντρος Sorvall RC 28S	41
Εικόνα 2.4. Όργανο Malvern Zetasizer Nano	43
Εικόνα 2.5. Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	44
Εικόνα 3.1. Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) της κινολινυλο-χαλκόνης 1	46
Εικόνα 3.2. Απορρόφηση βινυλικών πρωτονίων της κινολινυλο-χαλκόνης 1	47
Εικόνα 3.3. Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ωρεοσιδίνης 2	48
Εικόνα 3.4. Αρωματική περιοχή φάσματος πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της ωρεοσιδίνης 2	48
Εικόνα 3.5. Φάσμα ορατού - υπεριώδους (UV-Vis) κινολινυλο-χαλκόνης 1	63
Εικόνα 3.6. Φάσμα ορατού υπεριώδους (UV-Vis) της ωρεοσιδίνης 2	71
Εικόνα Π.1. Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης 5a	97
Εικόνα Π.2. Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης 6a	98
Εικόνα Π.3. Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης 7	99
Εικόνα Π.4. Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης 8	100

<u>Ευρετήριο Πινάκων</u>	Σελ.
Πίνακας 1.1. Επίδραση παραμέτρων της διεργασίας στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων	21
Πίνακας 3.1. Πειράματα σχηματισμού νανοσωματιδίων PLA (τυφλά)	49
Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (τυφλά)	50
Πίνακας 3.3. Πειράματα σχηματισμού νανοεγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης 1	50
Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (κινολινυλο-χαλκόνη 1)	51
Πίνακας 3.4.b. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (πειράματα 1a , 1h, 1i)	54
Πίνακας 3.5. Πειράματα νανοεγκλεισμού της ωρεοσιδίνης 2	56
Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (ωρεοσιδίνη 2)	57
Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κινολινυλο-χαλκόνης (1)	64
Πίνακας 3.8. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis της κινολινυλο-χαλκόνης 1	65
Πίνακας 3.9. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ωρεοσιδίνης (2)	72
Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis ωρεοσιδίνης 2	73
Πίνακας 3.11. Μετρήσεις DLS, για τη σταθερότητα των μεγεθών των δειγμάτων	78
Πίνακας 3.12. Χαρακτηριστικά Νανοσωματιδίων (πειράματα 1b και 1b')	83
Πίνακας 3.13. Χαρακτηριστικά Νανοσωματιδίων (πειράματα PLA <sub>2</sub> και PLA <sub>2</sub> ')	85

## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Σελ.

Διάγραμμα 1. Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο μέγεθος των νανοσωματιδίων	53
Διάγραμμα 2. Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο δείκτη πολυδιασποράς	53
Διάγραμμα 3. Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο ζ-δυναμικό	53
Διάγραμμα 4. Επίδραση παραμέτρων στο μέγεθος νανοσωματιδίων PLA_χαλκόνη (1a-1i)	55
Διάγραμμα 5. Επίδραση παραμέτρων στην κατανομή των μεγεθών των νανοσωματιδίων PLA_χαλκόνη (1a-1i)	55
Διάγραμμα 6. Επίδραση παραμέτρων στο δυναμικό επιφανείας των νανοσωματιδίων PLA_χαλκόνη (1a-1i )	56
Διάγραμμα 7. Επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγεθος νανοσωματιδίων με εγλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη	59
Διάγραμμα 8. Επίδραση της θεωρητικής φόρτωσης (drug loading) στο μέγεθος νανοσωματιδίων με εγλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη	60
Διάγραμμα 9. Επίδραση της θεωρητικής φόρτωσης (drug loading) στον δείκτη πολυδιασποράς νανοσωματιδίων με εγλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη	60
Διάγραμμα 10. Κατανομή μεγέθους του δείγματος 1e	62
Διάγραμμα 11. Κατανομή του δυναμικού επιφανείας του δείγματος 1e	62
Διάγραμμα 12. Καμπύλη αναφοράς κινολινυλο-χαλκόνης 1	64
Διάγραμμα 13. Επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας στην απόδοση του νανοεγκλεισμού	66
Διάγραμμα 14. Επίδραση της αναλογίας των φάσεων του γαλακτώματος στην απόδοση του νανοεγκλεισμού	67
Διάγραμμα 15. Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του πολυμερούς στην ικανότητα εγκλεισμού	67
Διάγραμμα 16. Επίδραση της αύξησης το ρυθμού ανάδευσης στην ικανότητα εγκλεισμού	68
Διάγραμμα 17. Επίδραση της αύξησης της θεωρητικής φόρτωσης στην ικανότητα εγκλεισμού	68
Διάγραμμα 18. Θεωρητική και πραγματική φόρτωση νανοσωματιδίων (πειράματα 1a - 1i)	69
Διάγραμμα 19. Μεγέθη νανοσωματιδίων (πειράματα 1a - 1i)	69
Διάγραμμα 20. Καμπύλη αναφοράς ωρεοσιδίνης (2)	72
Διάγραμμα 21. Επίδραση των εξετασμένων παραγόντων στην απόδοση του εγκλεισμού	73
Διάγραμμα 22. Θεωρητική και πραγματική φόρτωση νανοσωματιδίων	74

(πειράματα 2a - 2c)	
Διάγραμμα 23. Μεγέθη νανοσωματιδίων (πειράματα 2a - 2c)	75
Διάγραμμα 24. Σύγκριση επίδρασης θερμοκρασίας και ποσοστού φόρτωσης στην κινολινυλο-χαλκόνη 1 και την ωρεοσιδίνη 2	76
Διάγραμμα 25. Μεταβολή των μεγεθών των νανοσωματιδίων κατά την αποθήκευσή τους στους 10°C	81
Διάγραμμα 26. Μεταβολή των δεικτών πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων κατά την αποθήκευσή τους στους 10°C	82
Διάγραμμα 27. Μετρήσεις DLS, κατανομή μεγεθών (πειράματα 1b και 1b')	84
Διάγραμμα 28. Μετρήσεις DLS, κατανομή επιφανειακών φορτίων νανοσωματιδίων (πειράματα 1b και 1b')	84
Διάγραμμα 29. Μετρήσεις DLS, κατανομή μεγεθών (πειράματα PLA <sub>2</sub> και PLA <sub>2</sub> ')	86
Διάγραμμα 30. Μετρήσεις DLS, κατανομή επιφανειακών φορτίων (πειράματα PLA <sub>2</sub> και PLA <sub>2</sub> ')	86

### Ευρετήριο Σχημάτων

	Σελ.
Σχήμα 2.1. Σύνθεση της κινολινυλο-χαλκόνης 1	33
Σχήμα 2.2. Σύνθεση της ωρεοσιδίνης 2	34
Σχήμα 3.2.1. Κατανομή μεγεθών σχηματισθέντων νανοσωματιδίων	58

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Νανοεγκλεισμός Βιοδραστικών Ουσιών

---

### 1.1.1. Γενικές Έννοιες – Ορισμοί

Ως νανοτεχνολογία ορίζεται το πεδίο των εφαρμογών της μηχανικής που χρησιμοποιεί δομές μεγέθους μορίου, οι οποίες μετρώνται σε νανόμετρα (nm), δηλαδή σε πολλαπλάσια του ενός δισεκατομμυριοστού του μέτρου. Ως επί το πλείστον, ενδιαφέρουν συνήθως οι δομές με μέγεθος μικρότερο των 300nm.

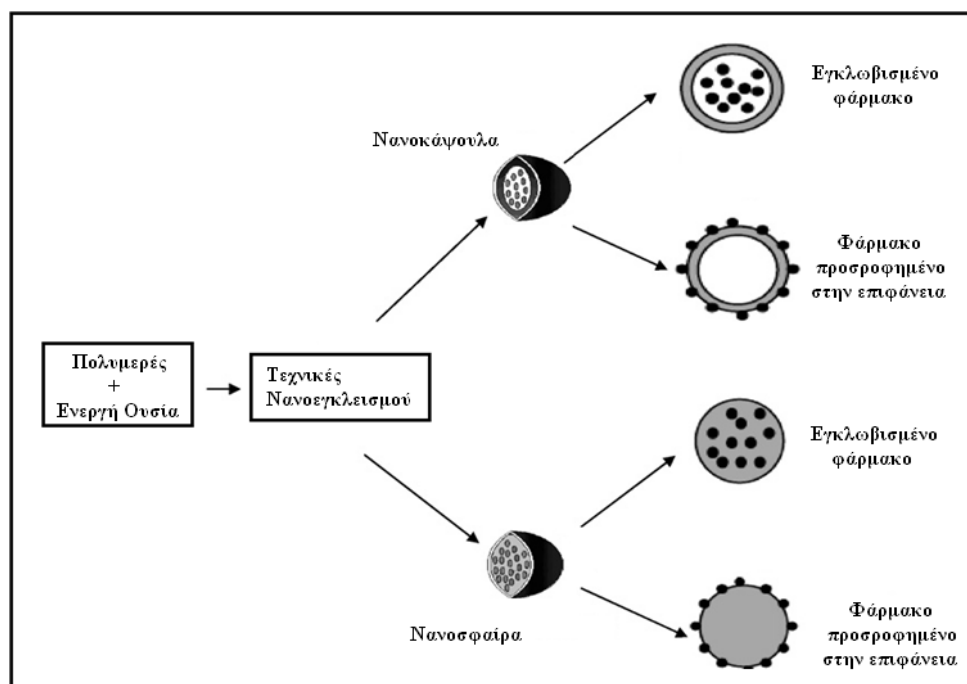
Η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έχει επηρεάσει θετικά σχεδόν όλους τους τομείς της βιομηχανίας συμπεριλαμβανομένου και της υγείας. Κύριος σκοπός της «νανοϊατρικής» είναι η βελτίωση της θεραπείας, της διάγνωσης, της απεικόνισης και του ελέγχου των λειτουργιών των βιολογικών συστημάτων, χρησιμοποιώντας τα επιτεύγματα της νανοτεχνολογίας [1].

Ο εγκλεισμός ουσιών σε νανოსωματίδια είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για να εγκλειστούν βιοδραστικά μόρια σε μια πολυμερική, συνήθως, μήτρα ή κέλυφος. Οι μικρο- ή νανο-κάψουλες (ή σφαιρίδια) που σχηματίζονται έχουν συνήθως σφαιρικό σχήμα και μπορούν να περικλείουν ουσίες σε αέρια, υγρή ή στερεή μορφή, υδρόφιλες ή και υδρόφοβες. Σε αντίθεση με τις τεχνικές επικάλυψης (film coating techniques), στον μικρο/νανο-εγκλεισμό ο σχηματισμός των σωματιδίων πραγματοποιείται σε ένα στάδιο [2].

Το περίβλημα των σωματιδίων αποτελείται από μια ουσία που χρησιμεύει ως «φράγμα» (barrier), συνήθως ένα βιοαποικοδομήσιμο ή βιοσυμβατό πολυμερές, και καθορίζει το ρυθμό αποδέσμευσης του δραστικού εγκλεισμένου μορίου. Το φράγμα αυτό μπορεί να έχει είτε τη μορφή μεμβράνης, όπου κι αναφερόμαστε σε συστήματα μεμβράνης (membrane ή reservoir systems), είτε πολυμερικής ή κηρώδους μήτρας

στην οποία είναι διασπαρμένη η φαρμακευτική ουσία και το σύστημα ονομάζεται τύπου μήτρας (matrix systems). Το υλικό της μεμβράνης ή της μήτρας μπορεί να είναι οργανικό ή ανόργανο πολυμερές ή ακόμα και κάποιο μέταλλο κι επιλέγεται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πυρήνα και την εφαρμογή για την οποία προορίζονται τα σωματίδια [3].

Οι όροι μικρο/νανο-σωματίδιο ή μικρο/νανο-σφαιρίδιο και μικρο/νανο-κάψουλα ορίζονται διαφορετικά από κάθε ερευνητή. Η επικρατούσα αντίληψη είναι ότι ο όρος «μικρο/νανο-κάψουλα» πρέπει να χρησιμοποιείται για την περιγραφή σωματιδίων τα οποία περιέχουν τη δραστική ουσία με τη μορφή ενός πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται πλήρως από ένα πολυμερικό κέλυφος (σύστημα μεμβράνης). Στο εσωτερικό των μικρο/νανο-καψουλών μπορεί να βρίσκεται ένας κρύσταλλος, ένα γαλάκτωμα ή ένα αιώρημα από μικρότερα σωματίδια και το υλικό του τοιχώματος μπορεί να είναι πορώδες ή μη πορώδες. Από την άλλη μεριά, ο όρος «μικρο/νανο-σφαιρίδιο» αναφέρεται σωματίδια τα οποία εμφανίζουν δομή τύπου μήτρας. Αυτά τα συστήματα «μονολιθικού» τύπου αναφέρονται και ως στερεά διαλύματα ή αιωρήματα ουσιών σε μικροκλίμακα ή νανοκλίμακα [2].



**Εικόνα 1.1.** Δομές Βιοαποδομήσιμων Νανοσωματιδίων

Η ενεργός ουσία είναι δυνατό είτε να εγκλειστεί στο εσωτερικό των σωματιδίων, είτε να απορροφηθεί στην επιφάνειά τους. (Εικόνα 1.1) [4]. Συγκεκριμένα για την περίπτωση ουσιών σε υγρή μορφή, ο νανοεγκλεισμός τις μετατρέπει σε στερεή μορφή (σκόνης) διατηρώντας την ενεργότητά τους, αυξάνοντας παράλληλα τη διάρκεια αποθήκευσής τους, ιδιαίτερα εάν πρόκειται για πτητικές ενώσεις. Σε κάθε περίπτωση, η ενεργός ουσία διατηρείται ανέπαφη μέσα στο νανοσωματίδιο και αποδεσμεύεται όποτε απαιτείται. Η ικανότητα του περιβλήματος να απομονώνει και να απελευθερώνει εκλεκτικά το περιεχόμενο εξαρτάται από το είδος των πολυμερών και το πάχος του τοιχώματος.

### **1.1.2. Σκοπός και Εφαρμογές του Νανοεγκλεισμού**

Ο νανοεγκλεισμός μορίων εφαρμόζεται με σκοπό τη βελτίωση ιδιοτήτων των δραστικών μορίων, καθώς και για να διευκολυνθούν η διαχείριση και η φύλαξη τοξικών ή ευαίσθητων ουσιών, αντίστοιχα. Ήδη σε αρκετούς τομείς, ο μικρο/νανο-εγκλεισμός έχει βρει εμπορικές εφαρμογές, όπως στους εξής:

- Βιομηχανία καλλυντικών
- Βιομηχανία τροφίμων
- Βιομηχανία λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων
- Γραφικές τέχνες, εκτυπωτικά και φωτογραφικά είδη
- Καύσιμα

Παράλληλα, η ανάπτυξη στον τομέα της επιστήμης και τεχνολογίας πολυμερών παρέχει επιπλέον δυνατότητες στη χρήση πολυμερών στις τεχνικές μικρο/νανο-εγκλεισμού.

Οι κυριότεροι λόγοι για τους οποίους εφαρμόζεται ο νανοεγκλεισμός μορίων παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω:



Ελεγχόμενη Αποδέσμευση: Η απόδοση της δραστικής ουσίας στο περιβάλλον ελέγχεται από μηχανισμούς διάχυσης μέσω του υλικού-φραγμού, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται διάφορα προφίλ αποδέσμευσης, ανάλογα με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Στον τομέα αυτό υπάρχουν πολλές χρήσεις του νανοεγκλεισμού βιοδραστικών ουσιών, οι οποίες είτε εφαρμόζονται ήδη είτε είναι δυνητικά εφαρμόσιμες.

Προστασία Ενεργών Μορίων: Ευαίσθητες ουσίες, όπως βιταμίνες, πρωτεΐνες και υδροσκοπικά μόρια, έχουν εγκλειστεί με στόχο την προστασία τους από αλλοιώσεις που μπορεί να προκληθούν από εξωτερικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ακτινοβολία, η θερμότητα, το οξυγόνο και η υγρασία της ατμόσφαιρας. Επιπλέον, οι χημικά ενεργές ουσίες με την τεχνική του μικρο/νανο-εγκλεισμού προστατεύονται και από χημική προσβολή.

Κάλυψη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων: Ιδιότητες της ενεργούς ουσίας, όπως η υψηλή πτητικότητα, τοξικότητα, καταλυτικές ιδιότητες, επίδραση στο pH κ.ά., μπορούν να καλυφθούν από το υλικό της μεμβράνης ή μήτρας, μέχρι να χρειαστεί η αποδέσμευση της ουσίας στο περιβάλλον ή στον οργανισμό. Κύριες εφαρμογές τέτοιου τύπου είναι η μείωση της τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και ο έλεγχος της αλλαγής χρώματος λευκοχρωστικών βαφών με τη μεταβολή του pH, η οποία αποτελεί και την πρώτη βιομηχανική εφαρμογή του μικροεγκλεισμού, με την παραγωγή αυτογραφικού χαρτιού. Επίσης ο εγκλεισμός πολλών αρωματικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα μεθυλεστέρα του σαλικυλικού οξέος και έλαιο μέντας έχει εφαρμοστεί για την αποφυγή της εξάτμισής τους.

Κάλυψη Ανεπιθύμητων Ιδιοτήτων: Ο εγκλεισμός φαρμακευτικών ουσιών σε μικρο/νανο-κάψουλες μπορεί να πραγματοποιηθεί για να καλύψει τη δυσάρεστη οσμή ή γεύση του φαρμάκου. Επιπλέον, ο εγκλεισμός φαρμακευτικών ουσιών, όπως ο θειικός σίδηρος και το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ, έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνονται οι γαστρικές και εντερικές

ενοχλήσεις που έχουν τέτοιου είδους ουσίες σαν παρενέργεια. Αυτό συμβαίνει επειδή η αποδέσμευση του φαρμάκου γίνεται σταδιακά και ελεγχόμενα στο πεπτικό σύστημα, σε σχέση με την ελεύθερη αποδέσμευση του μη εγκλεισμένου φαρμάκου.

Ασφαλής διαχείριση: Όσον αφορά σε τοξικές ουσίες, όπως παρασιτοκτόνα, φυτοφάρμακα και λιπάσματα, ο εγκλεισμός τους σε μικροκάψουλες έχει εφαρμοστεί με στόχο την ασφαλέστερη διαχείρισή τους από το χρήστη και της διάθεσής τους στο περιβάλλον.

#### Άλλοι Λόγοι:

Στην περίπτωση των υγροσκοπικών βιταμινών της ομάδας Β, όπως για παράδειγμα η υδροχλωρική θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη και η νιασίνη, οι ιδιότητες ροής των μιγμάτων τους με φωσφορικό σίδηρο βελτιώνονται εάν αυτές εγκλειστούν σε μικροκάψουλες, προτού συμπιεστούν σε δισκία. Η επιλογή κατάλληλων υλικών επικάλυψης μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την απόδοση των δισκίων, δηλαδή τη συμπίεση και τη διάλυσή τους, σε σχέση με τη χρήση των φαρμάκων χωρίς μικροεγκλεισμό.

Επίσης, ο εγκλεισμός αρωματικών ουσιών, που χρησιμεύει κυρίως στη μείωση της πτητικότητας των ουσιών, έχει εφαρμοστεί και για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του αρώματος. Ένα παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της τεχνικής επικάλυψης διαφημιστικού υλικού «ξύσε και μύρισε» (“scratch-and-sniff” coatings), όπου με μηχανική θραύση της δομής της μικροκάψουλας, απελευθερώνεται το άρωμα που σχετίζεται με το διαφημιζόμενο προϊόν [5].

### **1.1.3. Εφαρμογές Στη Φαρμακευτική**

#### **1.1.3.1. Ελεγχόμενη Χορήγηση Φαρμακευτικών Ουσιών**

Ο συμβατικός τρόπος χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών περιλαμβάνει την εισαγωγή της σε έναν οργανισμό είτε άμεσα, δηλαδή

κατευθείαν στο κυκλοφορικό σύστημα, είτε έμμεσα, μετά από μια διαδικασία απορρόφησης. Με την είσοδό της όμως στο οργανισμό, η ουσία κατανέμεται στα όργανα και τους ιστούς με αποτέλεσμα να μην μπορούν να καθοριστούν η συγκέντρωσή της και ο χρόνος διάθεσής της στην επιθυμητή θέση δράσης. Παράλληλα, η δράση του φαρμάκου στους υγιείς ιστούς μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες στον οργανισμό [6].

Η ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, όπως τον καθορισμένο ρυθμό διάθεσης του φαρμάκου στο σύστημα, την εφαρμογή σε περιοχή του επιθυμητού οργάνου όπου η φαρμακευτική ουσία αποδεσμεύεται με συγκεκριμένο ρυθμό ή με την εκλεκτική μεταφορά του στο στόχο. Ο τελευταίος τρόπος, δηλαδή η εκλεκτική μεταφορά της φαρμακευτικής ουσίας στο στόχο, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια κατάλληλου φορέα με τον οποίο συνδέεται το φάρμακο και στη συνέχεια συσσωρεύεται εκλεκτικά με παθητικό ή ενεργητικό τρόπο στην επιθυμητή περιοχή δράσης.

Η ελεγχόμενη χορήγηση έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. Σταθεροποίηση των επιπέδων της δραστικής ουσίας πάνω από τα θεραπευτικά επίπεδα για όσο χρόνο διαρκεί η θεραπεία και μικρότερες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης.
2. Ελάττωση των παρενεργειών.
3. Ελάττωση της ποσότητας του φαρμάκου που απαιτείται για τη θεραπεία.
4. Ελάττωση της συχνότητας χορήγησης των δόσεων και πιθανώς και της δυσκολίας χορήγησης
5. Αποτελεσματική χορήγηση βιοδραστικών ουσιών με μικρή βιολογική ημιπερίοδο ζωής, όπως τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες.

Παρά τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν, τα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης έχουν και κάποια μειονεκτήματα, ορισμένα από τα οποία είναι:

1. Αυξημένο κόστος παρασκευής σε σύγκριση με τις συμβατικές μορφές του φαρμάκου
2. Ενόχληση του ασθενούς από τη φαρμακομορφή ή από τον τρόπο χορήγησης
3. Κίνδυνος υπέρβασης των τοξικών επιπέδων του φαρμάκου από μη αναμενόμενη απότομη απελευθέρωση του εγκλεισμένου φαρμάκου (dose dumping effect)
4. Ανάπτυξη ανοχής από τη συνεχή παρουσία της δραστικής ουσίας στη θέση δράσης

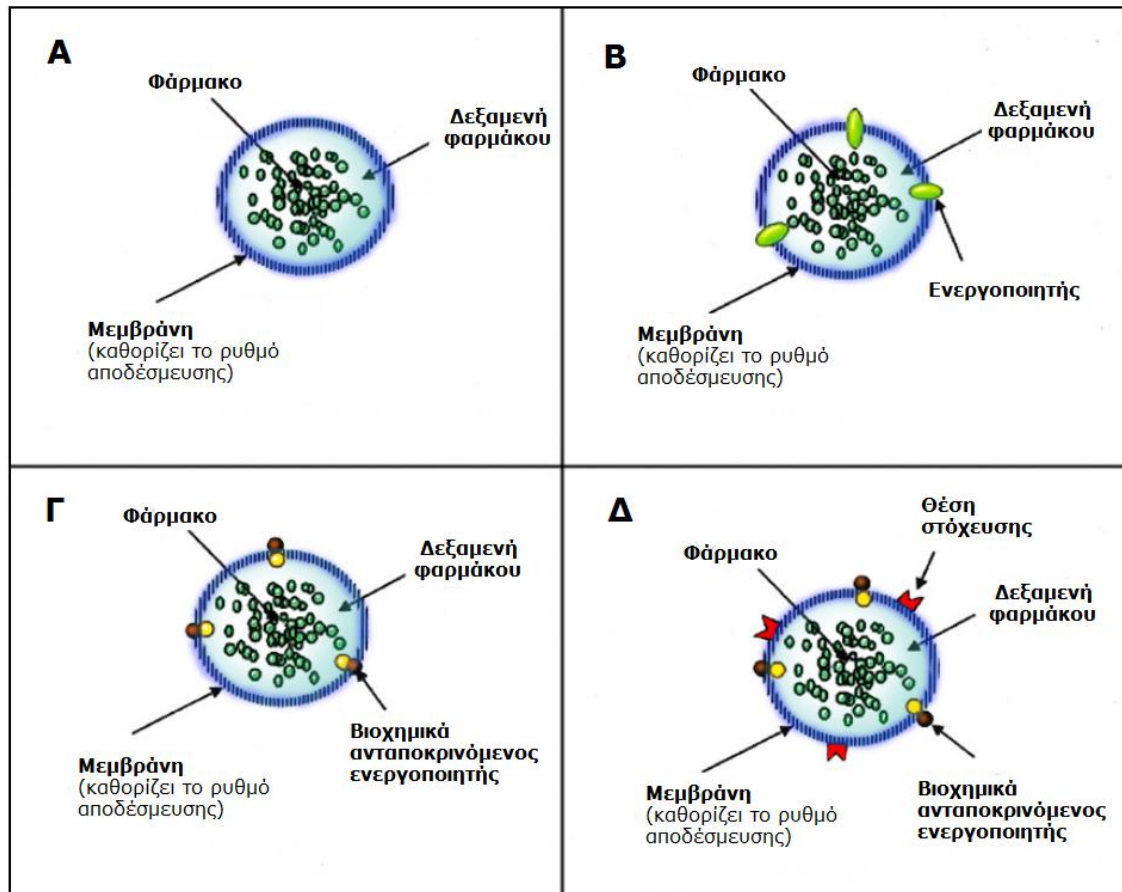
### **1.1.3.2. Συστήματα Δέσμευσης – Αποδέσμευσης Φαρμακευτικών Ουσιών**

Τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων μπορούν να καταταχτούν σε τέσσερις κατηγορίες με βάση την πολυπλοκότητά τους [6]. Στην απλούστερη περίπτωση (Εικόνα 1.2.A), πρόκειται για συστήματα των οποίων ο ρυθμός αποδέσμευσης είναι προκαθορισμένος λόγω της κατασκευής του συστήματος, καθορίζεται δηλαδή από το αν το σύστημα εγκλεισμού είναι σύστημα μεμβράνης, ή τύπου μήτρας.

Στο επόμενο επίπεδο (Εικόνα 1.2.B), βρίσκονται τα συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης, στα οποία η αποδέσμευση του φαρμάκου επιταχύνεται μέσω μιας φυσικής ή χημικής διεργασίας η οποία αποτελεί εξωτερική παρέμβαση. Τέτοιου είδους διεργασίες είναι μεταξύ άλλων η ωσμωτική πίεση, η εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, για εγκλεισμένα μαγνητικά σωματίδια [7], η ιοντοφόρηση, σε διαδερμικά συστήματα, η υδρόλυση και η pH-εξαρτώμενη υδρόλυση, οι οποίες προκαλούν την *in vivo* διάλυση της μήτρας ή της μεμβράνης, στην τελευταία περίπτωση εκλεκτικά ανάλογα με το pH.

Στη συνέχεια, ο έλεγχος της αποδέσμευσης μπορεί να πραγματοποιείται με μηχανισμό ανάδρασης (feed-back regulated systems),

δηλαδή από την *in vivo* ενεργοποίηση ενός βιοχημικού παράγοντα και εξάρτηση του ρυθμού αποδέσμευσης από τη συγκέντρωση αυτού του βιοχημικού παράγοντα (Εικόνα 1.2.Γ).



**Εικόνα 1.2.** Επίπεδα περιπλοκότητας συστημάτων ελεγχόμενης χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών

Στο ανώτατο επίπεδο πολυπλοκότητας βρίσκονται τα συστήματα στόχευσης (drug targeting systems), τα οποία επιχειρούν την εκλεκτική αποστολή του φαρμάκου στην επιθυμητή περιοχή δράσης (Εικόνα 1.2.Δ).

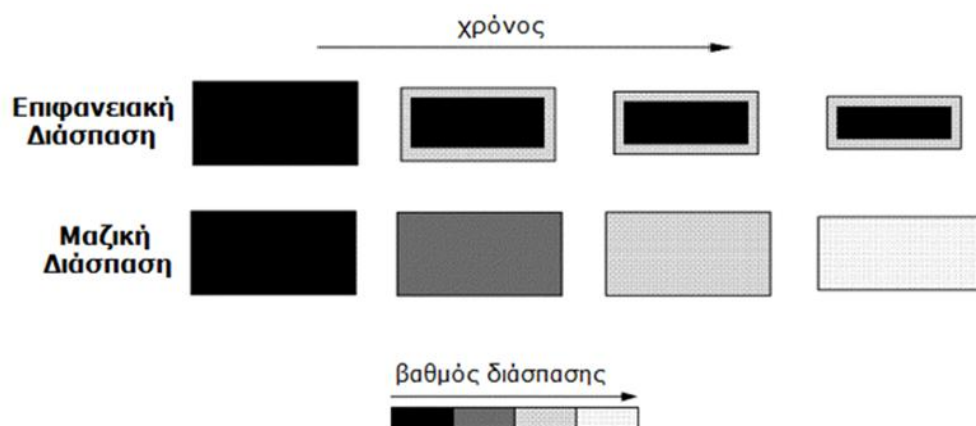
### 1.1.3.3. Βιοδιασπώμενα Πολυμερικά Συστήματα

Πολλά διαφορετικά πολυμερή χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική και την ιατρική, ως έκδοχα, σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, επιδέσμους, ράμματα κ.ά. Στις περιπτώσεις όπου η απομάκρυνση του

χρησιμοποιημένου πολυμερούς είναι αδύνατη ή απαιτεί χειρουργική επέμβαση, όπως για τη μεταφορά φαρμάκων και την ελεγχόμενη αποδέσμευσή τους, συμφέρει να χρησιμοποιούνται βιοδιασπάσιμα πολυμερή.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα βιοδιασπάσιμα πολυμερικά συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών προσφέρουν σωματίδια μεγέθους μικρότερου των κυττάρων και βιοσυμβατότητα με ιστούς και κύτταρα [8]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα συστήματα αυτά γενικά είναι σταθερά στο αίμα, δεν είναι τοξικά, δεν προκαλούν θρόμβους ή φλεγμονές και μπορούν να εφαρμοστούν για τον εγκλεισμό πολλών ειδών μορίων, όπως φαρμακευτικές ουσίες, πρωτεΐνες, πεπτίδια και νουκλεϊκά οξέα [9]. Επιπλέον, στην περίπτωση που οι ιδιότητες του συστήματος επιτρέπουν τον έλεγχο του ρυθμού βιοδιάσπασης, είναι δυνατή η επιλογή της κινητικής της αποδέσμευσης του φαρμάκου με τη ρύθμιση του ρυθμού βιοδιάσπασης, μετά από κατάλληλη επιλογή του πολυμερικού συστήματος. Απαιτείται όμως η βιοσυμβατότητα και η χαμηλή τοξικότητα, τόσο των βιοαποδομήσιμων πολυμερών, όσο και των προϊόντων διάσπασής τους.

Υπάρχουν δυο κύριοι μηχανισμοί διάσπασης πολυμερών *in vivo*, η μαζική ή ομοιόμορφη διάσπαση και η επιφανειακή διάσπαση. Η μαζική διάσπαση πραγματοποιείται ομοιόμορφα σε όλη τη μάζα του πολυμερούς. Η πρόσληψη νερού προηγείται της διάσπασης του πολυμερούς, η οποία πραγματοποιείται συνήθως με αντιδράσεις υδρόλυσης, με μια διαδικασία που οδηγεί στην κατάρρευση της δομής του πολυμερούς. Με τον τρόπο αυτό, το μοριακό βάρος του πολυμερούς μειώνεται σταδιακά, μέχρι τα προϊόντα της διάσπασης να είναι πλέον υδατοδιαλυτά. Το εσωτερικό των συστημάτων αυτών περιέχει τη φαρμακευτική ουσία, καθώς και προϊόντα διάσπασης, σε υδατικό περιβάλλον.



**Εικόνα 1.3.** Μηχανισμοί Διάσπασης Πολυμερών *in vivo*

Στην περίπτωση που το πολυμερές είναι υδρόφοβο αλλά υδρολύεται προς υδρόφιλα προϊόντα η διάσπαση περιορίζεται στη επιφάνεια του συστήματος. Η διάσπαση των δεσμών του πολυμερούς πραγματοποιείται είτε ενζυμικά είτε με υδρόλυση και στην ιδανική περίπτωση, το εσωτερικό παραμένει ανέπαφο και σε ξηρή κατάσταση, μέχρι την πλήρη διάσπαση του εξωτερικού στρώματος.

Σε πολλές περιπτώσεις, οι δυο μηχανισμοί συμβαίνουν παράλληλα, αλλά η σχετική έκταση στην οποία δρα ο κάθε μηχανισμός ποικίλει ανάλογα τη δομή του πολυμερούς. Ειδικότερα, ο μηχανισμός της διάσπασης εξαρτάται από το ρυθμό διείσδυσης του νερού σε σύγκριση με το ρυθμό διάσπασης δεσμών. Ανάλογα με το ρυθμό που είναι μεγαλύτερος, υπερισχύει ο μηχανισμός της μαζικής ή της επιφανειακής διάσπασης, αντίστοιχα. Η επιφανειακή διάσπαση θεωρείται πιο επιθυμητή, επειδή η κινητική της διάσπασης, και κατ' επέκταση η αποδέσμευση του φαρμάκου, είναι δυνατό να προβλεφθούν. Επιπλέον, η φαρμακευτική ουσία δε νεκτίζεται στο όξινο περιβάλλον που δημιουργούν τα προϊόντα της υδρόλυσης ορισμένων πολυμερών.

Τα νανοσωματίδια λόγω του μικρού μεγέθους τους διασπώνται ταχύτερα από τα σχετικά μεγαλύτερα μικροσωματίδια. Μια σχετικά ταχεία αποικοδόμηση των νανοσωματιδίων είναι επιθυμητή στην περίπτωση εφαρμογής αυτών στην χορήγηση φαρμάκων. Αυτό συμβαίνει διότι η ταχεία αποικοδόμηση *in vivo* θα είχε σαν αποτέλεσμα την ταχεία

απομάκρυνση του πολυμερούς από το σώμα, αποφεύγοντας έτσι την συσσώρευσή του ύστερα από επαναλαμβανόμενη χορήγηση νανοσωματιδίων.

Για την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών έχει ερευνηθεί πληθώρα βιοαποδομήσιμων πολυμερών. Η πιο ευρέως διερευνηθείσα κατηγορία πολυμερών όσον αφορά τοξικολογικά κλινικά δεδομένα είναι οι *πολυεστέρες*. Αυτοί περιλαμβάνουν αλειφατικούς πολυεστέρες που αποτελούνται συνήθως από μονομερή γαλακτικού και γλυκολικού οξέος. Τα αντίστοιχα πολυμερή, το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), πολυ(γλυκολικό οξύ) (PGA) και το συμπολυμερές πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA) έχουν βρει ευρεία εμπορική εφαρμογή. Ο μηχανισμός της αποδόμησης του πολυεστέρα ταξινομείται ως bulk (μαζική) αποικοδόμηση με τυχαία υδρολυτική σχάση των δεσμών εστέρα στον σκελετό του πολυμερούς. Σε μεγαλύτερες εφαρμογές, τα όξινα προϊόντα αποικοδόμησης μπορούν να συσσωρευτούν στο πολυμερές μήτρας λόγω μειωμένης διάχυση και αυτό οδηγεί σε μια αυτοκαταλυτική επίδραση στην αποικοδόμηση της κάψουλας.

Άλλο πολυμερές με εξαιρετική βιοσυμβατότητα είναι πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Ένας λόγος για αυτή την υψηλή βιοσυμβατότητα είναι ο υδρόφιλος χαρακτήρας της. Επιπλέον, συμπολυμερή PEG και PLA ή PLGA έχουν συντεθεί για τον εγκλεισμό πρωτεϊνών και φαρμακευτικών ουσιών.

Μία άλλη κατηγορία πολυμερών είναι οι πολυανυδρίτες. Οι πολυανυδρίτες είναι πιο υδρόφοβοι από τους πολυεστέρες, μολονότι περιέχουν ευαίσθητους στο νερό δεσμούς. Αυτό μειώνει την διαπερατότητα του ύδατος εντός της μάζας του πολυμερούς, και επομένως πιστεύεται πως οι πολυανυδρίτες κατά κύριο λόγο υφίστανται επιφανειακή διάβρωση με διάσπαση των δεσμών ανυδρίτη στην επιφάνεια της κάψουλας. Οι πιο ευρέως μελετηθέντες πολυανυδρίτες βασίζονται σε σεβακικό οξύ, p-(καρβοξυφαινοξυ) προπάνιο, και p-(καρβοξυφαινοξυ) εξάνιο [2].



#### **1.1.3.4. Μηχανισμοί Αποδέσμευσης Ενεργών Μορίων**

Παρά τις εκτεταμένες εφαρμογές του μικρο/νανο-εγκλεισμού και των τεχνολογιών ελεγχόμενης αποδέσμευσης σε πολλές βιομηχανίες, η πρόβλεψη του ρυθμού της απελευθέρωσης των εγκλεισμένων δραστικών συστατικών, ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα, εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Για τα τρόφιμα για παράδειγμα, επισημαίνεται πως στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT), η απελευθέρωση των εγκλεισμένων σε μικροκάψουλες συστατικών είναι μία συνάρτηση των φυσιολογικών συνθηκών, της παρουσίας τροφής καθώς και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της λαμβανόμενης δόσης. Συνεπώς, μια από τις βασικές απαιτήσεις για την πρόβλεψη των μηχανισμών απελευθέρωσης των μικροεγκλεισμένων δόσεων είναι ο προσδιορισμός των παραμέτρων που εμπλέκονται στη μεταφορά μάζας και την διάχυση των δραστικών ουσιών από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης/δοσολογίας, δηλαδή την κάψουλα, προς μία περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης, δηλαδή στο γύρω περιβάλλον [10].

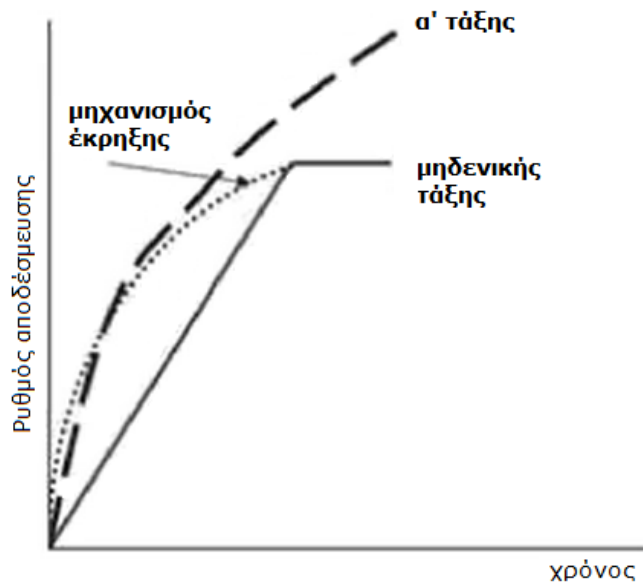
Στα πολυμερικά συστήματα, όσο μεγαλύτερο είναι το μέσο μοριακό βάρος του πολυμερούς, τόσο πιο αργά πραγματοποιείται η *in vitro* αποδέσμευση του εγκλεισμένου συστατικού [11]. Ο κυριότερος όμως παράγοντας που καθορίζει το προφίλ της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας είναι η δομή του συστήματος. Όπως προαναφέρθηκε, μπορούν να διακριθούν δύο γενικές κατηγορίες συστημάτων εγκλεισμού, τα συστήματα τύπου μεμβράνης ή δεξαμενής (μικρο/νανο-κάψουλες) και τα συστήματα τύπου μήτρας (μικρο/νανο-σφαιρίδια).

Τα συστήματα τύπου δεξαμενής είναι ικανά να αναπτύξουν ρυθμούς απελευθέρωσης μηδενικής τάξης υπό τον όρο όμως ότι στο εσωτερικό της επικάλυψης διατηρείται σταθερή θερμοδυναμική δραστηριότητα. Αυτά τα συστήματα όμως υπόκεινται σε μεταπτώσεις σε έναν μηχανισμό "εκρηκτικής" απελευθέρωσης (burst release) αν υπάρχουν μικρές ατέλειες στη μεμβράνη.

Από την άλλη πλευρά, τα συστήματα τύπου μήτρας ή μονολιθικά συστήματα απελευθέρωσης απαιτούν μικρότερο έλεγχο της ποιότητας και, ως εκ τούτου, έχουν χαμηλότερο κόστος παραγωγής. Στην πράξη απαντώνται και συστήματα μικροέγκλεισης που ακολουθούν ένα μικτό σύστημα εγκλεισμού, δηλαδή μικρο/νανο-σφαιρίδια που στη συνέχεια επικαλύπτονται με πρόσθετη μεμβράνη επικάλυψης. Αυτή η τεχνική είναι πιο χρήσιμη για την κατασκευή προφίλ εξαιρετικά καθυστερημένης απελευθέρωσης [2], [10].

Σχετικά με την κινητική της απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών, εντοπίζονται δύο κύριες μορφές απελευθέρωσης, μηδενικής τάξης και πρώτης τάξης. Κατά το σχεδιασμό μικρο/νανο-σωματιδίων με σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, είναι κρίσιμο να προσδιοριστεί το επιθυμητό προφίλ απελευθέρωσης, έτσι ώστε να μπορούν να επιλεγούν τα κατάλληλα υλικά και η τεχνολογία παρασκευής.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός "εκρηκτικής" απελευθέρωσης (Burst Release Mechanism). Η εκρηκτική απελευθέρωση μπορεί να περιγραφεί από μια υψηλή αρχική χορήγηση της δόσης της παγιδευμένης δραστικής ουσίας, έως ότου η απελευθέρωση φτάσει ένα σταθερό προφίλ, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματική διάρκεια ζωής του συστήματος και περιπλέκοντας τον έλεγχο απελευθέρωσης. Μολονότι η απελευθέρωση έκρηξης μπορεί να προτιμάται σε εφαρμογές για υψηλή ένταση γεύσης, σε άλλες περιπτώσεις ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε αναποτελεσματική χορήγηση της δραστικής ουσίας ή και τοξικές δόσεις.



**Εικόνα 1.4.** Μηχανισμοί αποδέσμευσης δραστικών συστατικών

Οι απελευθερώσεις έκρηξης πιο συχνά λαμβάνουν χώρα σε συστήματα δεξαμενής, αν και συμβαίνουν και σε συστήματα μήτρας. Οι λόγοι για την εμφάνιση αυτού του φαινομένου περιλαμβάνουν από ρωγμές στο προστατευτικό κέλυφος της κάψουλας ως το «φαινόμενο αποθήκευσης» (storage effect), όπου η μεμβράνη γίνεται κορεσμένη με τις δραστικές ουσίες, ή και λόγω πολύ υψηλής φόρτωσης (loading) δραστικής ουσίας στην κάψουλα. Επίσης, όταν η μικρο/νανο-κάψουλα τοποθετείται σε ένα μέσο απελευθέρωσης, η ενεργός ουσία μπορεί να αρχίσει να διαχέεται γρήγορα έξω από την επιφάνεια της μεμβράνης προκαλώντας εκρηκτική αποδέσμευση.

Χαμηλού μοριακού βάρους δραστικές ουσίες υφίστανται συχνά το φαινόμενο της εκρηκτικής απελευθέρωσης, λόγω της υψηλής οσμωτικής πίεσης και αυξημένης βαθμίδας συγκέντρωσης. Άλλοι λόγοι για εκρηκτική αποδέσμευση περιλαμβάνουν: τις συνθήκες επεξεργασίας, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του υλικού υποδοχής, η γεωμετρία του δείγματος, αλληλεπίδραση με το περιβάλλον υποδοχής, η μορφολογία και η πορώδης δομή του υλικού.

Ως λύσεις για την αποφυγή της εκρηκτικής αποδέσμευσης προτείνεται κυρίως η εφαρμογή ενός επιπρόσθετου υλικού επικάλυψης πάνω από ένα μονολιθικό μικρο/νανο-σωματίδιο, δομή η οποία μπορεί να βοηθήσει την εξάλειψη της εκρηκτικής αποδέσμευσης, αν και θα μπορούσε να αλλάξει αρκετά το προφίλ απελευθέρωσης. Άλλες λύσεις περιλαμβάνουν το πλύσιμο των μικρο/νανο-σωματιδίων για να αφαιρεθούν σταγονίδια δραστικών ουσιών από την επιφάνειά τους [10].

#### **1.1.4. Τεχνικές Εγκλεισμού Μορίων σε Νανοσωματίδια**

Ο εγκλεισμός ενεργών ουσιών σε νανοσωματίδια μπορεί να πραγματοποιηθεί γενικά με δυο τρόπους, είτε με ενσωμάτωση του δραστικού συστατικού σε διάλυμα του πολυμερούς και ταυτόχρονο σχηματισμό νανοσωματιδίων, είτε με απορρόφησή του μετά το σχηματισμό των σωματιδίων [12].

Αρκετές τεχνικές έχουν προταθεί για τον εγκλεισμό ουσιών σε νανοσωματίδια πολυμερούς και μπορούν να καταταχθούν σε δυο κύριες κατηγορίες ανάλογα με το μέσο στο οποίο παράγονται οι νανοκάψουλες, τις μεθόδους υγρού συνεχούς μέσου και τις μεθόδους όπου το συνεχές μέσο είναι ο αέρας [5].

Στην κατηγορία *υγρού συνεχούς μέσου*, βασικό στοιχείο είναι ο σχηματισμός ενός γαλακτώματος ή διασποράς μεταξύ δυο μη αναμίξιμων φάσεων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν:

- *Ο Διαχωρισμός Φάσεων Κολλοειδών Διαλυμάτων*, όπου ένα ομογενές διάλυμα πολυμερούς, στο οποίο βρίσκεται διεσπαρμένη η ενεργός ουσία, διαχωρίζεται υπό την επίδραση μεταβολής στη θερμοκρασία, το pH ή προσθήκης ουσιών, σχηματίζοντας μικρο-νανοκάψουλες.
- *Ο Διεπιφανειακός Πολυμερισμός*, όπου πραγματοποιείται μια αντίδραση πολυσυμπύκνωσης μεταξύ ενός χλωριδίου διοξειδίου και

μιας διαμίνης ή διόλης, στη διεπιφάνεια δύο μη αναμιξιμων φάσεων. Η ενεργός ουσία μαζί με το ένα μονομερές είναι διεσπαρμένα σε μια από τις δυο φάσεις και προστίθεται το δεύτερο μονομερές.

- *Ο Πολυμερισμός in-situ*, διεργασία παρόμοια με την προηγούμενη, με τη διαφορά ότι ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των σωματιδίων.
- *Ο Πολυμερισμός Γαλακτώματος*, όπου τα μονομερή και η ενεργός ουσία διασπείρονται σε κάποιο υδατικό μέσο που περιέχει γαλακτωματοποιητή κι ακολουθεί η προσθήκη εκκινητή της αντίδρασης πολυμερισμού, η οποία πραγματοποιείται στο εσωτερικό των σχηματιζόμενων σωματιδίων.
- *Η Γαλακτωματοποίηση - Εξάτμιση του Διαλύτη*, όπου η οργανική φάση που αποτελείται από το διάλυμα της ενεργούς ουσίας και του πολυμερούς, διασπείρεται σε μια συνεχή υδατική φάση που περιέχει το σταθεροποιητή και αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης του πολυμερούς.
- *Η Δικτύωση σε Αιώρημα*, όπου η ενεργός ουσία και το πολυμερές διαλύονται σε νερό (υδατική φάση), αναμιγνύονται με μια ελαιώδη φάση που περιέχει το σταθεροποιητή και προστίθεται ένα μέσο δικτύωσης για τη σκλήρυνση των σταγόνων του πολυμερούς.
- *Η Πήξη σε Αιώρημα*, όπου η ενεργός ουσία και το πολυμερές διασπείρονται σε μια συνεχή φάση και οι σταγόνες του αιωρήματος μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια με πήξη.

Στην κατηγορία αερίου συνεχούς μέσου, πραγματοποιείται η εκνέφωση μιας υγρής φάσης, και ανήκουν οι εξής τεχνικές:

- *Η Ξήρανση με Εκνέφωση*, όπου ένα αιώρημα της ενεργούς ουσίας σε διάλυμα του πολυμερούς διέρχεται μέσω ειδικού ακροφυσίου και ρεύματος θερμού αέρα, με αποτέλεσμα να εξατμίζεται ο διαλύτης του πολυμερούς

- *Η Πήξη με Εκνέφωση*, διεργασία παρόμοια με την προηγούμενη, με τη διαφορά ότι αντί για διάλυμα του πολυμερούς, η ενεργός ουσία διασπείρεται σε τήγμα του.
- *Η Μέθοδος Ρευστοστερεάς Κλίνης*, η οποία αποτελείται από ένα τμήμα ψεκασμού και ένα τμήμα εκτόνωσης. Με την τεχνική αυτή, τα σωματίδια της ενεργούς ουσίας επικαλύπτονται με το πολυμερές που ψεκάζεται επάνω τους.
- *Ο Ηλεκτροστατικός Μικροεγκλεισμός*, όπου η ενεργός ουσία και το πολυμερές ψεκάζονται σε κοινό θάλαμο επικάλυψης, φορτίζονται με αντίθετα φορτία και οι μικροκάψουλες σχηματίζονται χάρη στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται.
- *Η Επικάλυψη σε Περιστρεφόμενο Κύλινδρο*, στο οποίο κινούνται με μεγάλη ταχύτητα σωματίδια της ενεργούς ουσίας και ψεκάζονται με το διάλυμα του πολυμερούς
- *Η Φυγοκεντρική Εκβολή*, όπου από δυο έγκεντρα ακροφύσια εκβάλλονται ταυτόχρονα η ενεργός ουσία και διάλυμα ή τήγμα του πολυμερούς, το οποίο περιβάλλει την ενεργό ουσία.

Η επιλογή της μεθόδου πραγματοποιείται με κριτήριο την εφαρμογή για την οποία προορίζονται οι μικρο/νανο-κάψουλες, το είδος της προς εγκλεισμό ουσίας και τα χαρακτηριστικά που τους αποδίδει η κάθε μέθοδος [13]. Για παράδειγμα με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση του διαλύτη, σχηματίζονται τα μικρότερου μεγέθους σωματίδια (0,1 – 1 μm), αν και σε κάθε τεχνική η κλίμακα μεγέθους των παραγόμενων σωματιδίων εξαρτάται από τις συνθήκες της διεργασίας, όπως τη συγκέντρωση του σταθεροποιητή, τη θερμοκρασία, το ρυθμό ανάδευσης, τη συγκέντρωση του πολυμερούς κ.ά.

### 1.1.5. Γαλακτωματοποίηση - Εξάτμιση του Διαλύτη

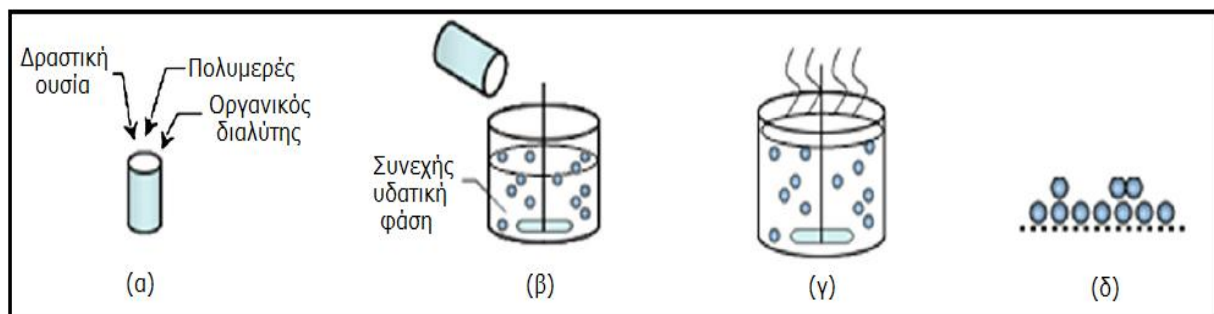
Η μέθοδος αυτή εμφανίζει δύο παραλλαγές ανάλογα με τη φύση του φαρμάκου

που πρόκειται να εγκλειστεί μέσα στις νανοσωματίδια:

- A. τεχνική απλού γαλακτώματος (ύδωρ σε έλαιο , w/o) και
- B. τεχνική διπλού γαλακτώματος (w/o/w)

#### A) Απλό γαλάκτωμα

Κατά την τεχνική αυτή, το υλικό επικάλυψης των σωματιδίων, συνήθως πολυμερές, διαλύεται σε πτητικό οργανικό διαλύτη. Το προς εγκλεισμό φάρμακο διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και το διάλυμα που προκύπτει αναμιγνύεται με το διάλυμα του πολυμερούς. Το μίγμα (διάλυμα ή αιώρημα) που προκύπτει γαλακτωματοποιείται εντός υγρού φορέα ο οποίος περιέχει γαλακτωματοποιητή και δεν διαλύει τα υλικά του πυρήνα ή το πολυμερές. Στη συνέχεια, οργανικός διαλύτης εξατμίζεται κάτω από ήπιες συνθήκες, όπως για παράδειγμα με ελαφριά θέρμανση ή εφαρμογή κενού, και ως αποτέλεσμα της πλήρους απομάκρυνσης του διαλύτη προκύπτει η σκλήρυνση του περιβλήματος. Τα μικρο/νανο-σωματίδια συλλέγονται με διήθηση (φιλτράρισμα) ή φυγοκέντρηση, επαναδιασπείρονται σε απεσταγμένο νερό και λυοφιλοποιούνται.

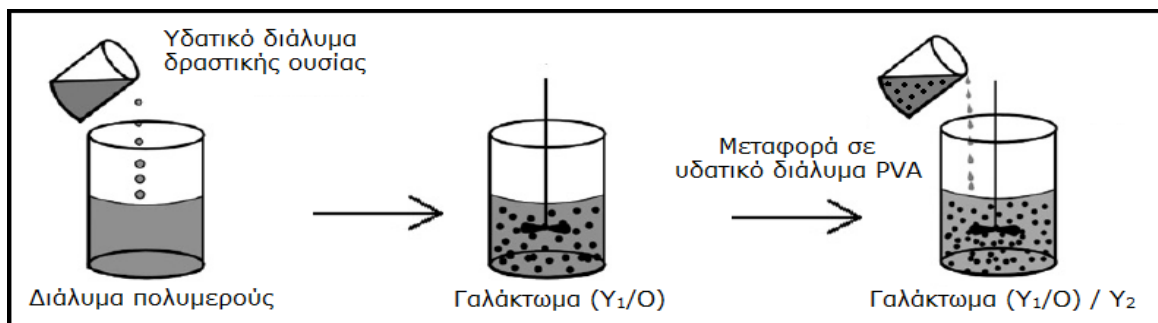


**Εικόνα 1.5.** Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου απλού γαλακτώματος

Η μέθοδος του απλού γαλακτώματος είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό φαρμάκων με μικρή υδατοδιαλυτότητα. Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται μια επιφανειοδραστική ουσία, συνήθως η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA) ή η πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη) (PEG), αλλά τελευταία έχουν χρησιμοποιηθεί και εκχυλίσματα φυτών ως σταθεροποιητές των νανοσωματιδίων [14]. Τα πρώτα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή ήταν τα νανοσωματίδια PLA φορτωμένα με τεστοστερόνη [15]. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής και roloxamer 188 ως γαλακτωματοποιητής και το μέσο μέγεθος των σωματιδίων που προέκυψαν ήταν 450 nm.

### B) Διπλό γαλάκτωμα

Η μέθοδος του διπλού γαλακτώματος είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό υδατοδιαλυτών φαρμάκων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Αρχικά το προς εγκλεισμό υλικό (φάρμακο) διαλύεται σε μια υδατική φάση ( $Y_1$ ). Η φάση αυτή γαλακτωματοποιείται εντός πτητικής οργανικής φάσης (O) στην οποία έχει διαλυθεί το πολυμερές. Το γαλάκτωμα ( $Y_1/O$ ) που προέκυψε στο προηγούμενο στάδιο διασπείρεται σε μεγαλύτερο όγκο μίας δεύτερης υδατικής φάσης  $Y_2$  για να σχηματιστεί ένα διπλό γαλάκτωμα ( $Y_1/O$ ) /  $Y_2$ . Στη συνέχεια, ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την μέθοδο του απλού γαλακτώματος, δηλαδή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και ανάκτηση των σχηματισθέντων μικρο/νανο-σωματιδίων.



**Εικόνα 1.6.** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διπλού γαλακτώματος



### 1.1.5.1. Παράγοντες της Διεργασίας

Σημαντικές μεταβλητές του νανοεγκλεισμού με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης - εξάτμισης του διαλύτη είναι:

1. Ο ρυθμός εξάτμισης του διαλύτη: γενικά, όσο πιο αργά πραγματοποιείται η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, τόσο μικρότερο το μέγεθος των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται.
2. Υλικά που χρησιμοποιούνται: έχει διαπιστωθεί ότι σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προκύπτουν έχουν τα υλικά που χρησιμοποιούνται. Αυτά περιλαμβάνουν το είδος της προς εγκλεισμό ένωσης, το είδος και το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το είδος της επιφανειοδραστικής ουσίας – γαλακτωματοποιητή, καθώς και ο οργανικός διαλύτης, ο οποίος επηρεάζει ανάλογα με την πτητικότητά του και την αναμιξιμότητά του με το νερό. Επιπλέον, η προσθήκη τυχόν αντιαφριστικών ουσιών επιδρά στις ιδιότητες των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων.
3. Παράμετροι: έχει παρατηρηθεί ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν παράμετροι όπως το ιξώδες της διεσπαρμένης φάσης, η αναλογία της οργανικής προς την υδατική φάση καθώς και οι συγκεντρώσεις τόσο του οργανικού διαλύματος πολυμερούς όσο και του υδατικού διαλύματος του γαλακτωματοποιητή.
4. Συνθήκες της διεργασίας: η θερμοκρασία, η πίεση, ο ρυθμός ανάμιξης, ακόμη και η γεωμετρία του αντιδραστήρα και του αναδευτήρα, έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν τα τελικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα συμπεράσματα για την επίδραση των παραμέτρων αυτών όπως έχουν προκύψει από τη βιβλιογραφία [16].

**Πίνακας 1.1.** Επίδραση παραμέτρων της διεργασίας στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων

	Παράγοντες	Επίδραση τις ιδιότητες των μικρο/νανο-σωματιδίων		
		Διάμετρος	Μορφολογία	Ικανότητα Εγκλεισμού
<b>Αύξηση των παραμέτρων</b>	ιξώδες διεσπαρμένης φάσης	<b>αύξηση</b>	<b>πιο λεία</b> επιφάνεια	<b>αύξηση</b> και πιο αργή αποδέσμευση
	αναλογία όγκων διεσπαρμένης προς υδατική φάση	<b>μείωση ή καμία επίδραση</b>		<b>αύξηση</b>
	ποσότητα του δραστικού συστατικού στη διεσπαρμένη φάση		<b>πιο πορώδες</b> και με ακανόνιστο σχήμα	<b>μείωση</b> όταν η ποσότητα της δραστικής ουσίας είναι υπερβολική
	συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας	<b>μείωση</b>		
<b>Συνθήκες της διεργασίας</b>	αύξηση ρυθμού ανάδευσης	<b>μείωση</b> και μεγαλύτερη ομοιογένεια	<b>πιο χονδροειδής</b> επιφάνεια, με μεγάλους πόρους	
	αύξηση θερμοκρασίας	<b>αύξηση</b>	<b>πιο χονδροειδής</b> επιφάνεια	<b>μείωση</b>
	μειωμένη πίεση (σε σχέση με την ατμοσφαιρική)	<b>μείωση ή καμία επίδραση</b>	<b>πιο λεία</b> επιφάνεια	<b>μείωση ή αύξηση</b> (έχουν παρατηρηθεί και τα δυο) και πιο αργή αποδέσμευση

Η επίδραση των παραγόντων που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα δεν είναι απόλυτη. Για παράδειγμα, με αύξηση της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής ουσίας, έχει παρατηρηθεί μείωση του μεγέθους των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Παρόλα αυτά, η μείωση αυτή δεν είναι απεριόριστη, αλλά σταματά σε μια μέγιστη οριακή τιμή, όπου υπάρχει πλέον πλήρης φόρτωση της επιφάνειας των σωματιδίων [17].

Το κατάλληλο σύστημα νανοεγκλεισμού για κάθε εφαρμογή προσδιορίζεται συνήθως με δοκιμή και σφάλμα, δεν υπάρχει δηλαδή κάποιος κανόνας στον οποίο να υπακούουν όλα τα υλικά [4].

### 1.1.6. Φυσικοχημικές Ιδιότητες Νανοσωματιδίων

Το μέγεθος και οι ιδιότητες επιφανείας όπως το φορτίο και η υδροφιλικότητα των κολλοειδών φορέων φαρμάκου, είναι χαρακτηριστικά τα οποία καθορίζουν την *in vivo* συμπεριφορά τους [18],[19].

Μέγεθος: Για να είναι εφικτή η κυκλοφορία των νανοσωματιδίων που ενίενται ενδοφλέβια μέσα ακόμη και στα μικρότερα τριχοειδή αγγεία θα πρέπει το μέγεθος των νανοσωματιδίων να μην υπερβαίνει τα 5  $\mu\text{m}$ . Επιπλέον απαιτείται να έχουν διάμετρο μικρότερη από 200 nm ώστε να αποφεύγουν την διήθησή τους από τον σπλήνα [20]. Το επιθυμητό μέγεθος εξαρτάται από την εκάστοτε εφαρμογή, και τον ιστό-στόχο και όπως προαναφέρθηκε εξαρτάται από τη δομή του πολυμερούς και του φαρμάκου, την μέθοδο και τις πειραματικές συνθήκες της παρασκευής τους. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50 και 300 nm. Θεωρητικά, νανοσωματίδια με μέγεθος μεταξύ 100 και 200 nm συνήθως έχουν τη δομή νανοσφαιρών, ενώ οι νανοκάψουλες κυμαίνονται μεταξύ 100 και 300 nm [21].

Z-δυναμικό: Η εμφάνιση φορτίου επιφανείας στα περισσότερα αιωρήματα σωματιδίων σε υδατικά μέσα οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων στα σωματίδια ή και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Τα σωματίδια είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα κι έλκουν από το διάλυμα θετικά ιόντα δημιουργώντας το ηλεκτροκινητικό ή ζ-δυναμικό που αποτελεί την διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων με την ηλεκτρικά ουδέτερη περιοχή του διαλύματος [22]. Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων και την σύνθεση του μέσου διασποράς. Το ζ-δυναμικό μπορεί να μετρηθεί με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφορητικές μετρήσεις).

Γενικά, τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από +20mV και αντίστοιχα μικρότερες από -20mV, συνεπάγονται σταθερά μικρο/νανο-σωματίδια. Τα νανοσωματίδια πρέπει να εμφανίζουν επαρκή σταθερότητα ώστε να διατηρούν τις βιολογικές τους ιδιότητες, για την παραμονή τους στη γενική κυκλοφορία μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, όπως αυτές επιλέχθηκαν με βάση τον σχεδιασμό των νανοσωματιδίων. Επίσης, προτιμώνται θετικές τιμές ζ-δυναμικού, καθώς προωθούν την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με την αντίθετα φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη και κατέπεκταση την ενσωμάτωσή τους σε αυτήν [23].

Οι τιμές του ζ δυναμικού *in vivo* αναμένεται να είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες που προκύπτουν από τις μετρήσεις *in vitro* εξαιτίας της σχετικά χαμηλής ιονικής ισχύος του χρησιμοποιούμενου μέσου *in vitro* (απιονισμένο νερό).

### **1.1.7. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων**

Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) ή φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) αποτελεί την ταχύτερη και την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μεγέθους, της διασποράς του μεγέθους και του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων. Μέσω μιας συνάρτησης, η οποία συσχετίζει το μέγεθος με την κινητικότητα των σωματιδίων λόγω της κίνησης Brown, ορίζεται ο ρυθμός με τον οποίο η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός (το σήμα του φωτοανιχνευτή) μεταβάλλεται με το χρόνο.

Η μέθοδος εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως, η ευκολία στον χειρισμό, και η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων καθώς κάθε μέτρηση διαρκεί λιγότερο από 1min γεγονός που επιτρέπει την μέτρηση πολλών δειγμάτων αλλά και την διεξαγωγή πολλών μετρήσεων. Επίσης η μέθοδος δεν είναι καταστροφική και επιτρέπει τον προσδιορισμό σχετικά μεγάλου

εύρους μεγεθών (1 nm έως 1  $\mu\text{m}$ ). Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η παρουσία ακόμη και μικρών ποσοτήτων άλλων σωματιδίων, όπως σωματιδίων σκόνης, μικροβιακή μόλυνση, σωματίδια από κρυστάλλωση κάποιων συστατικών ή συσσωμάτωση των τεμαχιδίων, επηρεάζει σημαντικά την μέτρηση.

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Αποτελεί μάλιστα την αμεσότερη μέθοδο χαρακτηρισμού των σωματιδίων, διότι επιτρέπει την παρατήρησή τους και κατά συνέπεια την λήψη συμπερασμάτων που αφορούν στο μέγεθος, αλλά επιπλέον στο σχήμα και στο είδος της επιφάνειας των σωματιδίων. Ανάλογα με την τάξη μεγέθους των σωματιδίων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε το μικροσκόπιο φωτός (light microscope), είτε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM), είτε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (Transmission Electron Microscope, TEM).

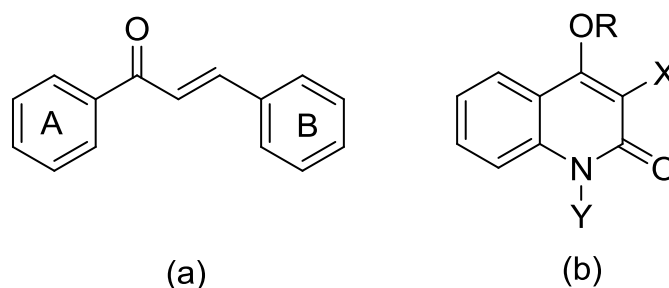
Οι βασικοί περιορισμοί για την παρατήρηση των κολλοειδών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δύο: α) το δείγμα πρέπει να ξηραθεί πριν τεθεί υπό παρατήρηση. Αυτή όμως η διαδικασία μπορεί να αλλάξει ουσιαστικά το δείγμα, όπως για παράδειγμα από επικάθιση βοηθητικών υλικών όπως επιφανειοδραστικά στο δείγμα, οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα, και β) το προς παρατήρηση υλικό μπορεί να καταστεί ασταθές από την επίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων, και να προκύψουν και πάλι λανθασμένα συμπεράσματα.

## 1.2. Χαλκόνες - Κινολινόνες - Υβριδικά Μόρια

---

Οι χαλκόνες (1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνες) είναι  $\alpha,\beta$ -ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις με μια χαρακτηριστική γέφυρα με τρία άτομα άνθρακα με ένα διπλό δεσμό (Εικόνα 1.7.a). Οι χαλκόνες εμφανίζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων και σημαντική αντιοξειδωτική δράση και αντιπαρασιτική δράση [24],[25].

Οι κινολινόνες είναι ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις οι οποίες απαντώνται σε μια πληθώρα φυσικών προϊόντων καθώς και συνθετικών αναλόγων (Εικόνα 1.7.b). Οι ενώσεις που περιέχουν ως δομική μονάδα το ετεροκυκλικό σύστημα της 4-υποκατεστημένης-2-κινολινόνης εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων και χρησιμοποιούνται στη σύνθεση μεγάλου αριθμού βιοδραστικών μορίων. Τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται ως ανθελονοσιακά φάρμακα, αντιπαρασιτικά, αντιικά, αντινεοπλασματικά, αντιαλλεργικά, αντιϋπερτασικά, αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη [26],[27],[28].

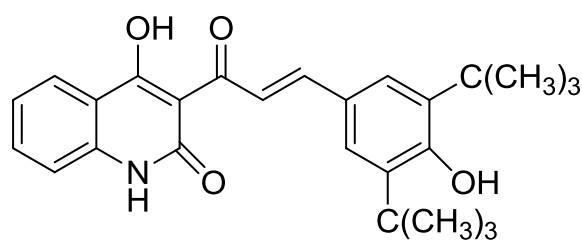


**Εικόνα 1.7.** Γενική Δομή χαλκονών (a) και κινολινονών (b)

Η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας ανάλογων χαλκονών που περιέχουν τον ετεροκυκλικό δακτύλιο της κινολινόνης έχει αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος σχετικά πρόσφατα, αποσκοπώντας στο συνδυασμό των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων σε ένα υβριδικό μόριο. Στο πλαίσιο αυτό, παρασκευάστηκε μια σειρά κινολινυλο-χαλκονών στην οποία ο αρωματικός δακτύλιος A της χαλκόνης έχει αντικατασταθεί από τον

ετεροκυκλικό δακτύλιο της 4-υδροξυ-2-κινολινόνης. Οι ενώσεις που συντέθηκαν αξιολογήθηκαν *in vitro* για τη δράση τους έναντι των παρασίτων *Leishmania infantum* και *Trypanosoma brucei*.

Από το σύνολο των κινολινυλο-χαλκόνων που εξετάστηκαν, η ένωση **1** (Εικόνα 1.8) εμφανίζει εντυπωσιακή αντιλείσμανιακή δράση και αξιόλογη αντιρυπανοσωμιακή δράση, είναι όμως ιδιαίτερα κυτταροτοξική και εμφανίζει πολύ περιορισμένη διαλυτότητα στους κοινούς οργανικούς διαλύτες.



(1)

**Εικόνα 1.8.** Χημικός τύπος κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Συγκεκριμένα, η κινολινυλο-χαλκόνη **1** βρέθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη της ενδοκυτταρικής μορφής του παρασίτου *Leishmania infantum* ( $IC_{50} = 1.27 \pm 0.09 \mu M$ ), και του παρασίτου *Trypanosoma brucei* ( $IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu M$ ). Και οι δυο τιμές είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικές σε σύγκριση με τα φάρμακα που χορηγούνται για τις ασθένειες που προκαλούν τα παράσιτα αυτά σήμερα. Παρόλα αυτά, η κινολινυλο-χαλκόνη **1** παρουσίασε υψηλή τοξικότητα έναντι των κυττάρων THP1, δηλαδή δείκτη  $IC_{50} \approx 10 \mu M$  [29],[30].

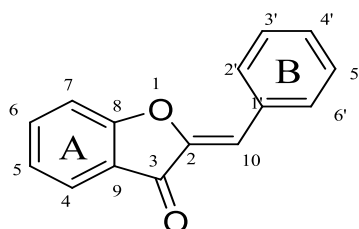
Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε προς εγκλεισμό η παραπάνω ένωση, καθώς παρουσιάζει σημαντική βιολογική δράση, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και τους κοινούς οργανικούς διαλύτες και υψηλή κυτταροτοξικότητα. Με τον εγκλεισμό της σε νανοσωμαίδια πολυμερούς επιδιώκεται η βελτίωση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, χωρίς όμως να μειωθούν οι φαρμακολογικές της ιδιότητες.

## 1.3. Ωρόνες

### 1.3.1. Δομή και Βιολογικές Ιδιότητες

Οι ωρόνες (2-βενζυλιδENO-3-βενζοφουρανόνες) αποτελούν μια μικρή υποκατηγορία φλαβονοειδών (Εικόνα 1.9). Σε σύγκριση με τις χαλκόνες, οι ωρόνες εμφανίζονται σπανιότερα στη φύση και μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί περίπου 100 είδη ωρονών από 21 οικογένειες ανθοφόρων φυτών, καθώς και από μερικές φτέρες, βρύα και θαλάσσιες καφέ άλγες [31].

Οι ωρόνες είναι ετεροκυκλικές χημικές ενώσεις που απαντώνται σε δύο ισομερείς μορφές, τις E και Z. Οι περισσότερες ωρόνες απαντώνται σε Z-διαμόρφωση η οποία είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερή, ενώ λίγες βρίσκονται σε E-διαμόρφωση [32],[33].



**Εικόνα 1.9.** Γενική δομή (Z)-ωρονών

Οι ωρόνες έχουν εξεταστεί ελάχιστα, σε σχέση με τις χαλκόνες. Παρόλα αυτά, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής αποκαλύπτουν ότι έχουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, μερικές εκ των οποίων θα αναλυθούν παρακάτω.

Μια σημαντική ιδιότητα των ωρονών είναι η αντιπαρασιτική τους δράση. Πρόσφατες μελέτες [34] σχετικά με 35 ωρόνες έδειξαν ότι κανένα από αυτά τα μόρια δεν είναι κυτταροτοξικό και επτά εξ αυτών είχαν καλή δράση έναντι του πλασμωδίου που προκαλεί ελονοσία ( $IC_{50}$  μικρότερο από 5  $\mu M$ ). Το μόριο με τη βέλτιστη δράση, το οποίο δοκιμάστηκε σε



πειραματόζωα, παρουσίασε ωστόσο μικρότερη απόδοση *in vivo*, λόγω της μειωμένης διαλυτότητάς του.

Επιπλέον, ορισμένες ωρόνες φαίνονται αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση των παρασίτων που προκαλούν Λείσμανίαση. Σε πρόσφατη έρευνα εξετάστηκαν 12 ωρόνες με διάφορους υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B, όσον αφορά τη δράση τους έναντι της ενδοκυττάριας αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου *Leishmania infantum*. Από τις ωρόνες που μελετήθηκαν, αυτές που περιείχαν μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 4 και 6 του δακτυλίου A και μεθοξυ- ή μεθυλο-ομάδα στη θέση 2' του δακτυλίου B εμφάνισαν αξιόλογη αντιπαρασιτική δράση, ίδιας τάξης μεγέθους με του φαρμάκου αναφοράς (Αμφοτερικίνη) και σημαντικά μικρότερη κυταροτοξικότητα έναντι των ανθρώπινων μακροφάγων THP [35].

Επίσης, οι ωρόνες διαθέτουν αντιμικροβιακές αλλά και αντιμυκητιακές ιδιότητες. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι ορισμένες ωρόνες έχουν καλή απόδοση έναντι μικροβίων των οικογενειών *E.coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* και *P. vulgaris*, όπως επίσης και κατά των μυκήτων του γένους *A. fumigatus*, *A. niger*, *T. viridie*, *C. albicans* και *P. Chrysogenum* [36].

Ακόμη, μελέτες δείχνουν ότι οι ωρόνες διαθέτουν και αντικαρκινικές ιδιότητες. Ορισμένες μάλιστα είναι κυταροτοξικές απέναντι σε καρκινικά κύτταρα, αλλά έχουν ασθενέστερη δράση απέναντι σε υγιή κύτταρα. Επιπλέον, δοκιμές *in vitro* δείχνουν ότι ορισμένες ωρόνες έχουν την ιδιότητα να παρεμποδίζουν την κινητικότητα των κυττάρων και την αγγειογένεση, δυο μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση του καρκίνου [37].

Επίσης, ορισμένες συνθετικές ωρόνες έχουν την ιδιότητα να προσδένονται στη νουκλεοτιδική περιοχή δέσμευσης της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης [38]. Με τον τρόπο αυτό, αναστέλλουν τη δράση του συμπλόκου πρωτεϊνών και ενζύμων που προωθεί την ανάπτυξη κυττάρων (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες, Cdk), με αποτέλεσμα να αποκτούν

αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες και να ενεργούν, κατ' επέκταση, ως αντικαρκινικοί παράγοντες [37],[39].

Οι ωρόνες διαθέτουν επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση [25].

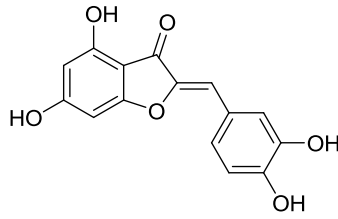
Οι ωρόνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στο χρωματισμό ορισμένων λουλουδιών και φρούτων, συνεισφέροντας ιδιαίτερα στο κίτρινο χρώμα λουλουδιών [40],[25]. Μάλιστα επειδή το χρώμα των ανθέων είναι πολύ σημαντικό για την έλξη εντόμων και πουλιών για την επικονίαση και την αναπαραγωγή των φυτών, χάρη στην ανάπτυξη στη γενετική τροποποίηση, είναι δυνατή η παραγωγή φυτών με το επιθυμητό και καινοτόμο χρώμα ανθέων [41]. Πολλοί ερευνητές, εκμεταλλευόμενοι τη γνώση περί της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, παράγουν λουλούδια με μοναδικά χρώματα, χρησιμοποιώντας ως χρωστικές ουσίες ωρόνες, γλυκοζίτες ωρονών και χαλκόνες [40],[42].

Ορισμένα συνθετικά παράγωγα ωρονών σχεδιάστηκαν για χρήση ως φθορίζοντες παράγοντες και φωτοδιακόπτες που διεγείρονται από το ορατό φως [43].

### **1.3.2. Ωρεοσιδίνη**

Μια από τις πιο κοινές φυσικές ωρόνες είναι η ωρεοσιδίνη [(Z)-2-(3,4-διϋδροξυβενζυλιδεν)-4,6-διϋδροξυβενζοφουραν-3-όνη] (Εικόνα 1.10) η οποία απομονώθηκε από τα κίτρινα άνθη του φυτού "σκυλάκι".

Η ωρόνη αυτή διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, (έχει την ικανότητα να δεσμεύει τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH κατά 98% (σε συγκέντρωση 100μM, για 60min) και να αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση κατά 78% (σε συγκέντρωση 10μM) [25] ενώ είναι παράλληλα και ισχυρός αναστολέας της ιωδοθυρονιν-δεϊωδινάσης, ενός ενζύμου που συμμετέχει στη σύνθεση και τη ρύθμιση ορμονών [44].



**Εικόνα 1.10.** Χημικός τύπος ωρεοσιδίνης

Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα της ωρεοσιδίνης είναι η δράση της ως ανορεκτικό για τα έντομα [45]. Τα ισχυρά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα, αν και αποτελεσματικά, δεν αποτελούν ιδανική λύση αποτελούν στον πληθυσμιακό έλεγχο των εντόμων, λόγω της ενδεχόμενης τοξικότητάς τους στα ζώα και της απουσίας εκλεκτικότητας. Πρακτικά, εξολοθρεύονται χωρίς διάκριση τόσο τα επιβλαβή όσο και τα ευεργετικά έντομα. Αντίθετα, οι ενώσεις που αναφέρονται ως «ανορεκτικά» εμποδίζουν τα έντομα να τραφούν με φυτά, αλλά δεν τα σκοτώνουν. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι το έντομο να παραμένει κοντά στο φυτό, όπου πεθαίνει από έλλειψη τροφής [46].

Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε το μόριο της ωρεοσιδίνης προς εγκλεισμό, λόγω των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων που διαθέτει, αλλά και λόγω της μικρής της υδατοδιαλυτότητας που τη χαρακτηρίζει. Ο εγκλεισμός της, λοιπόν, σε νανοσωματίδια πολυμερούς έχει ως στόχο την αύξηση της διαλυτότητάς της *in vivo*, με ταυτόχρονη διερεύνηση τυχόν μεταβολής της βιολογικής της δράσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. Όργανα και Συσκευές

---

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι τα εξής:

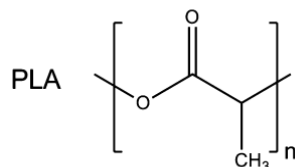
- i. Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) Varian Gemini 2000 (300MHz). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR αναφέρεται ως απλή (s), διπλή (d), διπλή διπλών (dd), τριπλή (t), τετραπλή (q), πολλαπλή (m), broad (br). Οι σταθερές συζεύξεως (J) δίνονται σε Hz.
- ii. Συσκευή Temperature Controlled Shaker (Gallenkamp).
- iii. Φυγόκεντρος Sorvall RC 28S (DuPont) και κεφαλή Sorvall F28/50
- iv. Φασματογράφος ορατού υπεριώδους UV-Vis διπλής δέσμης, Perkin Elmer LAMBDA 25
- v. Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)
- vi. Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

### 2.2. Υλικά

---

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα PLA, τριών διαφορετικών μοριακών βαρών. Τα συγκεκριμένα δείγματα προήλθαν από υδρόλυση σε στερεά κατάσταση στους 60 °C σε όξινο (pH=3) περιβάλλον για 3, 5 και 7 ημέρες εμπορικού δείγματος της εταιρείας NaturePlast μέσου-ιξώδους μοριακού βάρους ( $\overline{M}_v$ ) 171500 g mol<sup>-1</sup> υδρολύθηκε. Συγκεκριμένα, τα μέσου-αριθμού μοριακά βάρη τους προσδιορίστηκαν στα 43.400 g/mol, 27.300

g/mol και 16.700 g/mol αντίστοιχα, μετά από μετρήσεις ιξωδομετρίας (χλωροφόρμιο, 0,2 %, 30 °C) τριχοειδούς διαλυμάτων και θεωρώντας δείκτη πολυδιασποράς ίσο με 2.



**Εικόνα 2.1.** Χημική δομή μορίου πολυ(γαλακτικού οξέος)

Η PVA είναι ένα υψηλά πολικό, μη τοξικό, υδατοδιαλυτό συνθετικό πολυμερές, το οποίο χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής. Παρασκευάζεται με υδρόλυση του οξικού πολυβινυλίου και χρησιμοποιείται σε μίγματα πολυμερών με φυσικά πολυμερικά υλικά. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Alsa Aesar, υψηλού μοριακού βάρους, υδρολυμένο κατά 87–89%.

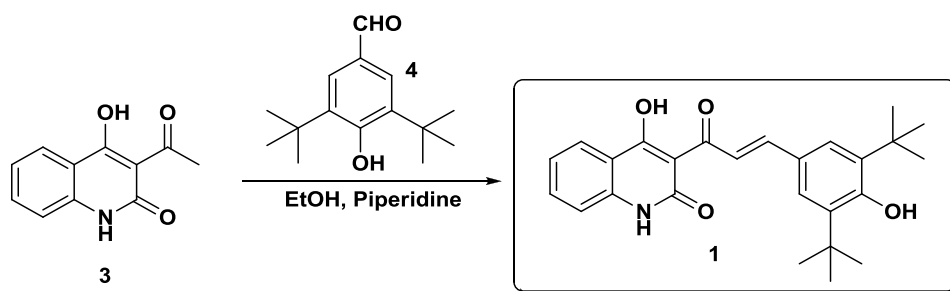
## 2.3. Μέθοδοι

---

### 2.3.1. Σύνθεση των Βιοδραστικών Ενώσεων

#### 2.3.1.1. Σύνθεση της 3-[3-[3,5-(1)(1,1-διμεθυλαιθυλ)-4-υδροξυφαινυλ]-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (1) [30]

Η σύνθεση του παραγώγου **1** πραγματοποιήθηκε μέσω μικτής αλδολικής συμπύκνωσης μεταξύ της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**) και της 3,5-δι-tert-βουτυλ-4-υδροξυβενζαλδεΐδης (**4**) (Σχήμα 2.1).



**Σχήμα 2.1.** Σύνθεση της κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Συγκεκριμένα, σε σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθενται 0,738 mmol (150 mg) της κινολινόνης **1** και 0,738 mmol (173 mg) της βενζαλδεΐδης **4** παρουσία 3 ml διαλύτη αιθανόλης και καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης. Στη σφαιρική προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το σύστημα αναδεύεται στους 78°C υπό αδρανή ατμόσφαιρα για περίπου τέσσερις ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση ακολουθεί η οξίνιση του μίγματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%, οπότε καταβυθίζεται κίτρινο στερεό το οποίο παραλαμβάνεται τελικά με διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία  $^1\text{H NMR}$ .

**Ποσότητα: 260 mg**

**Απόδοση : 84%**

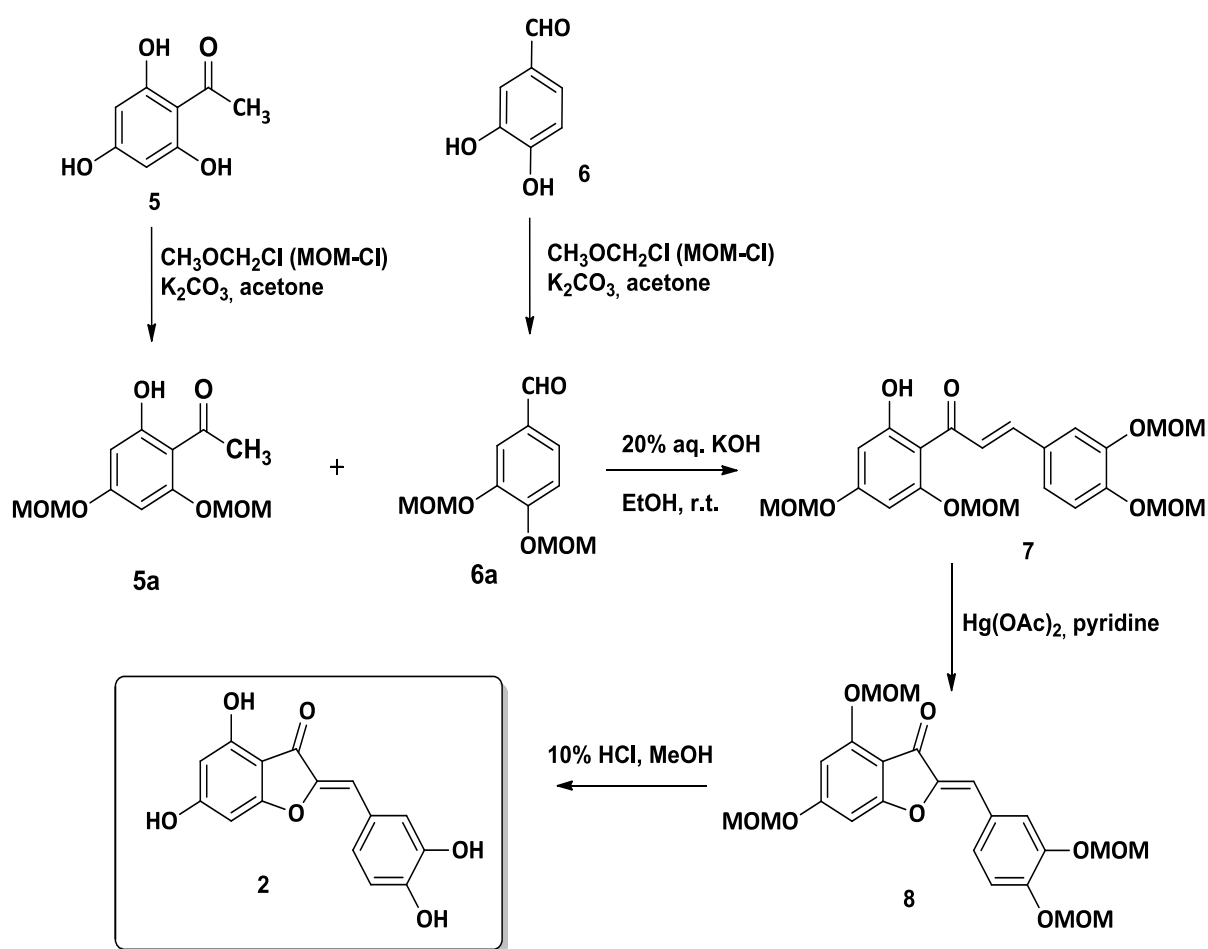
**Σημείο τήξεως : 250-251°C**

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  18.54 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 8.64 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 8.15 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H), 7.61 – 7.51 (m, 3H), 7.23 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 5.64 (s, 1H), 1.48 (s, 18H).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  30.35, 34.49, 105.33, 115.56, 116.05, 121.54, 122.57, 125.85, 126.95, 134.75, 136.69, 140.23, 147.47, 157.17, 163.99, 178.72, 193.54

### 2.3.1.2. Σύνθεση της ωρεοσιδίνης (2)

Η σύνθεση της ωρεοσιδίνης (2) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε πρόσφατα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας [25] η οποία φαίνεται στο Σχήμα 2.2 και περιλαμβάνει πέντε στάδια τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια.



Σχήμα 2.2. Σύνθεση της ωρεοσιδίνης 2

#### 2.3.1.2.a. 2-Υδροξυ-4,6-δι(μεθοξυμεθυλο)ακετοφαινόνη (5a)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προστασία των φαινολικών υδροξυλίων της 2,4,6-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης (5) με τη χρήση της μεθοξυμεθυλενο-

ομάδας (MOM) ως προστατευτική ομάδα σε βασικό περιβάλλον, παρουσία ανθρακικού καλίου, σε γραμμομοριακή αναλογία 1 : 2,5 : 7 (Σχήμα 2.2).

Ειδικότερα, σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 10,12 mmol (1,7 g) της 2,4,6-τρι-υδροξυ-ακετο-φαινόνης (**5**), 25,3 mmol (2 ml διαλύματος με πυκνότητα  $d=1,06$  g/ml) της MOM-ομάδας και 7,52 mmol (9,78 g)  $K_2CO_3$  παρουσία 150 ml διαλύτη ακετόνης. Το σύστημα αναδεύεται στους  $65^\circ C$  υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 24h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, το μίγμα διηθείται υπό κενό και το προϊόν παραλαμβάνεται από το διήθημα με εξάτμιση του διαλύτη. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του παραγώγου, σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 7:3. Η τελική καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία  $^1H$ NMR.

**Ποσότητα: 650 mg**

**Απόδοση : 25%**

#### 2.3.1.2.β. 3,4-δι(μεθοξυμεθυλο)βενζαλδεΐδη (**6a**)

Η προστασία των φαινολικών υδροξυλίων της 3,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης (**6**) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της MOM-ομάδας ως προστατευτική ομάδα σε βασικό περιβάλλον, παρουσία ανθρακικού καλίου, σε γραμμομοριακή αναλογία 1 : 2,5 : 7 (Σχήμα 2.2).

Χρησιμοποιήθηκαν 7,24 mmol (1 g) της 3,4-δι-υδροξυ-βενζαλδεΐδης (**6**), 18,1 mmol (1,375 ml διαλύματος με πυκνότητα  $d=1,06$  g/ml) της MOM-ομάδας και 50,68 mmol (7 g)  $K_2CO_3$  παρουσία 140 ml διαλύτη ακετόνης. Οι συνθήκες αντίδρασης και η παραλαβή του προϊόντος γίνεται με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, για την προστασία της 2,4,6-τρι-υδροξυ-ακετο-φαινόνης (**5**). Για τον καθαρισμό πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (flush), σε σύστημα διαλυτών



πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία αρχικά 8:2 και στη συνέχεια 6:4. Η τελική καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR.

**Ποσότητα: 498 mg**

**Απόδοση : 30%**

#### 2.3.1.2.γ. 2'-Υδροξυ-3,4,4',6'-τετρα(μεθοξυμεθυλο)-χαλκόνη (7)

Η σύνθεση της χαλκόνης **7** πραγματοποιήθηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης μεταξύ ακετοφαινόνης **5a** και της βενζαλδεΐδης **6a** (Σχήμα 2.2), σε βασικό περιβάλλον, δηλαδή παρουσία καυστικού καλίου, σε γραμμομοριακή αναλογία 1 : 1 : 3.

Ειδικότερα, σε σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθενται 2,3 mmol (607,3 mg) της ακετοφαινόνης **5a**, 2,2 mmol (497,7 mg) της βενζαλδεΐδης **6a** και 7,14 mmol (399,8 mg) KOH παρουσία 8 ml διαλύτη αιθανόλης. Το σύστημα αφήνεται σε ανάδευση 24h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ακολουθεί οξίνιση του μίγματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%, οπότε καταβυθίζεται στερεό το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό.

Ακολουθεί ανακρυστάλλωση. Η ανακρυστάλλωση πραγματοποιείται με εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε εξάνιο. Το λαμβανόμενο διάλυμα τοποθετείται στην κατάψυξη για μια ημέρα προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης καταβύθιση των κρυστάλλων του προϊόντος. Τέλος, ακολουθεί διήθηση υπό κενό του μίγματος για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η τελική καθαρότητα ελέγχεται με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR.

**Ποσότητα: 464 mg**

**Απόδοση : 46%**

#### 2.3.1.2.δ. 3',4,4',6-Τετρα(μεθοξυμεθυλο)-ωρόνη (8)

Η σύνθεση της ωρόνης **8** πραγματοποιήθηκε μέσω οξειδωτικής κυκλοποίησης της χαλκόνης **7** (Σχήμα 2.2), χρησιμοποιώντας οξικό υδράργυρο σε διαλύτη πυριδίνη, σε γραμμομοριακή αναλογία 0,8 : 2.

Ειδικότερα, σε σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθενται 0,646 mmol (300 mg) της χαλκόνης **7** και 1,615 mmol (514,58 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub>, παρουσία 6,76 ml πυριδίνης. Στη σφαιρική προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το σύστημα αναδεύεται στους 110°C υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 1.5h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC.

Στη συνέχεια η σφαιρική αφήνεται να ψυχθεί στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί απόχυση του μίγματος σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει πάγο. Έπειτα το μίγμα οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10%, όπου καταβυθίζεται κίτρινο στερεό. Ύστερα πραγματοποιείται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3 x 20mL), η οργανική φάση ξηραίνεται με θειικό νάτριο και πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν ως κίτρινο στερεό.

Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το λαμβανόμενο διάλυμα τοποθετείται στην κατάψυξη για μια ημέρα και το ανακρυσταλλωμένο προϊόν παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό. Η τελική καθαρότητα ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

**Ποσότητα: 175 mg**

**Απόδοση : 65%**

#### 2.3.1.2.ε. Ωρεοσιδίνη (2)

Η απομάκρυνση των προστατευτικών MOM-ομάδων για την παραλαβή της ωρεοσιδίνης (**2**) (Σχήμα 2.2) πραγματοποιήθηκε με ήπια θέρμανση της ωρόνης **8** σε μίγμα μεθανόλης-υδατικού διαλύματος HCl 10%. Συγκεκριμένα, σε σφαιρική των 25 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 0,417 mmol (174,6 mg) της ωρόνης **8**,

3,15 ml HCl 10% και 7,08 ml μεθανόλης και το σύστημα αναδεύεται στους 80°C για 15-20 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν περίπου 4 ml απιονισμένου νερού και 2 ml μεθανόλης και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3 X 20mL), ξήρανση της οργανικής φάσης και εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης, αρχικά με σύστημα διαλυτών DCM/MeOH σε αναλογία 8:2 και στη συνέχεια με καθαρή μεθανόλη. Η τελική καθαρότητα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>HNMR.

**Ποσότητα: 45 mg**

**Απόδοση : 38%**

**Σημείο τήξεως : 295°C (τήξη με αποσύνθεση)**

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.03 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ ppm 182.95, 169.36, 148.88, 147.99, 146.63, 132.51, 125.85, 125.80, 118.63, 116.60, 112.74, 104.93, 91.41

## **2.3.2. Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός Ενώσεων**

Μεταξύ των διαφόρων μεθοδολογιών που έχουν αναπτυχθεί για την παρασκευή νανοσωματιδίων από PLA, επιλέχθηκε η μέθοδος γαλακτωματοποίησης - εξάτμισης του οργανικού διαλύτη, λόγω του ότι οι ενώσεις που εγκλείστηκαν είναι υδρόφοβες.

Σύμφωνα με τη μέθοδο, παρασκευάζεται ένα γαλάκτωμα το οποίο αποτελείται από δύο φάσεις: 1) μια υδατική (συνεχής φάση), δηλαδή ένα υδατικό διάλυμα PVA και 2) μια οργανική (ασυνεχής φάση) η οποία

αποτελείται από ένα οργανικό διάλυμα PLA αναμειγμένο με το διάλυμα της προς εγκλεισμό ένωσης σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη.

#### 2.3.2.1. Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA)

Όσον αφορά στη συνεχή φάση, παρασκευάστηκε για τα πειράματα νανοεγκλεισμού ένα διάλυμα (stock), από το οποίο λαμβανόταν κατάλληλη ποσότητα για το κάθε πείραμα. Για την παρασκευή 100 ml υδατικού διαλύματος PVA περιεκτικότητας 1% w/v, τοποθετήθηκαν σε σφαιρική των 150 ml 1 g PVA και 100 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα τέθηκε σε ανάδευση για 1h στους 45°C, ενώ στη σφαιρική προσαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας. Τέλος, το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετήθηκε προς φύλαξη σε κλειστό μπουκάλι.

#### 2.3.2.2. Παρασκευή πολυμερικών σωματιδίων (τυφλό)

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα PLA σε ακετόνη σε συγκέντρωση 10 mg/ml. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 30 ml από το υδατικό διάλυμα της PVA σε ποτήρι ζέσεως και υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου σε μαγνητικό αναδευτήρα πραγματοποιήθηκε η έγχυση 2 ml του διαλύματος του PLA με αργό ρυθμό, με τη χρήση σύριγγας. Κατά την ανάμιξη της οργανικής με την υδατική φάση, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γαλακτώματος. Η ανάδευση συνεχίστηκε για 10 min στο μαγνητικό αναδευτήρα και ακολούθησε τοποθέτηση του γαλακτώματος σε αναδευτήρα (shaker), στα 80 rpm για 24h, με στόχο την αργή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και το σχηματισμό των σωματιδίων PLA.



**Εικόνα 2.2.** Shaker Gallenkamp

Η απομόνωση των σωματιδίων από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Η πρώτη φυγοκέντρηση εφαρμόζεται για 5 min, στους 15°C και σε 5.000 rpm, για την καταβύθιση των μεγαλύτερων σωματιδίων. Τα σωματίδια που καταβυθίζονται απορρίπτονται και το υπερκείμενο ανακτάται και φυγοκεντρείται για 20 min, στους 10°C και σε 20.000 rpm. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρησης (S1) απομακρύνεται και τα νανοσωματίδια που έχουν σχηματιστεί είναι ευδιάκριτα ως συσσωμάτωμα. Τα σωματίδια ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, για απομάκρυνση της PVA που είχε κατακαθίσει παρασυρόμενη από τα σωματίδια του PLA.

Στη συνέχεια, τα σωματίδια διασπείρονται σε απιονισμένο νερό και τοποθετούνται για τρίτη φορά στη φυγόκεντρο στις ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη φορά, δηλαδή για 20 min, στους 10°C και σε 20.000 rpm. Τέλος, το υπερκείμενο (S2) απομακρύνεται και τα σωματίδια επαναδιασπείρονται σε περίπου 5 ml απιονισμένο νερό και αποθηκεύονται σε φιαλίδιο στο ψυγείο.



**Εικόνα 2.3.** Φυγόκεντρος Sorvall RC 28S

#### 2.3.2.3. Εγκλεισμός ενώσεων σε πολυμερικά σωματίδια

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω. Παρασκευάστηκε διάλυμα της εκάστοτε ένωσης σε οργανικό διαλύτη, διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO) για την κινολινυλο-χαλκόνη **1** και μεθανόλη για την ωρεοσιδίνη **2**, σε συγκέντρωση 10 mg/ml. Ακολουθεί η ανάμιξη 300 μl του διαλύματος της εκάστοτε ένωσης με 1,5 ml του διαλύματος του PLA σε ακετόνη και η έγχυση αυτού του οργανικού διαλύματος σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA 1% w/v. Στη συνέχεια η διαδικασία συνεχίζεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι τα υπερκείμενα της δεύτερης και της τρίτης φυγοκέντρησης (S1 και S2) δεν απορρίπτονται, αλλά φυλάσσονται σε κλειστές κωνικές φιάλες.

Στα πειράματα του νανοεγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης **1** και της ωρεοσιδίνης **2** που πραγματοποιήθηκαν μεταβλήθηκαν ορισμένες

παράμετροι της διαδικασίας προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στα χαρακτηριστικά των σωματιδίων και στην απόδοση του εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- το μοριακό βάρος του PLA,
- το ποσοστό φόρτωσης, δηλαδή η μάζα της προς εγκλεισμό ένωσης προς τη μάζα του PLA (drug loading)
- η αναλογία της υδατικής προς την οργανική φάση του γαλακτώματος
- η ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA)
- η θερμοκρασία
- ο ρυθμός ανάδευσης κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος.

### **2.3.3. Χαρακτηρισμός Νανოსωματιδίων**

#### 2.3.3.1. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους

Ο χαρακτηρισμός των νανოსωματιδίων αναφορικά με το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς τους, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Από το εκάστοτε δείγμα, 0,2 ml αραιώνονται σε περίπου 4 ml δις-απιονισμένου νερού και το μίγμα τοποθετείται σε ανάδευση για περίπου 2 ώρες, ώστε να αποκτήσει καλή διασπορά. Στη συνέχεια περίπου 1 ml από το δείγμα τοποθετείται σε πλαστικό δειγματοφορέα και οδηγείται προς μέτρηση, η οποία πραγματοποιείται στους  $25 \pm 1$  °C. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν δυο μετρήσεις για το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης (Refractive index R.I. ), λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού R.I. =1.330.

### 2.3.3.2. Δυναμικό επιφανείας (ζ-δυναμικό)

Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκαν και αυτές με τη μέθοδο δυναμικής



**Εικόνα 2.4.** Όργανο Malvern Zetasizer Nano

σκέδασης φωτός (DLS). Για την προετοιμασία του δείγματος, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε και για τον προσδιορισμό του μεγέθους και στη συνέχεια 1 ml από το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα dip-cell. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στους  $25 \pm 1$  °C και το pH των δειγμάτων ήταν περίπου 6. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις για το ζ-δυναμικό, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος.

### 2.3.3.3. Ποσοστό εγκλεισμού – Πραγματική φόρτωση των ενώσεων στα νανοσωματίδια

Η ικανότητα εγκλεισμού των μορίων στα νανοσωματίδια (encapsulation efficiency) προσδιορίστηκε εμμέσως, με τη χρήση φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μη εγκλεισμένων ενώσεων στα διαλύματα S1 και S2, δηλαδή στα υπερκείμενα



των φυγοκεντρήσεων. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκριτικά με καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων κάθε ουσίας γνωστής συγκέντρωσης και απορρόφησης.



**Εικόνα 2.5.** Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η ποσότητα των ενώσεων που είχε εγκλειστεί προσδιορίστηκε ως εξής:

$$\%EE = \frac{\text{αρχική ποσότητα ένωσης (mg)} - \text{ποσότητα ένωσης στα υπερκείμενα (mg)}}{\text{αρχική ποσότητα ένωσης (mg)}} * 100$$

#### **2.3.4. Μελέτη Σταθερότητας των Νανοσωματιδίων**

Τα σωματίδια φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης, σε διασπορά σε περίπου 5 ml απιονισμένου νερού και σε όξινες συνθήκες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα μια μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα οδηγήθηκε προς μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, με την προετοιμασία που αναλύθηκε παραπάνω.

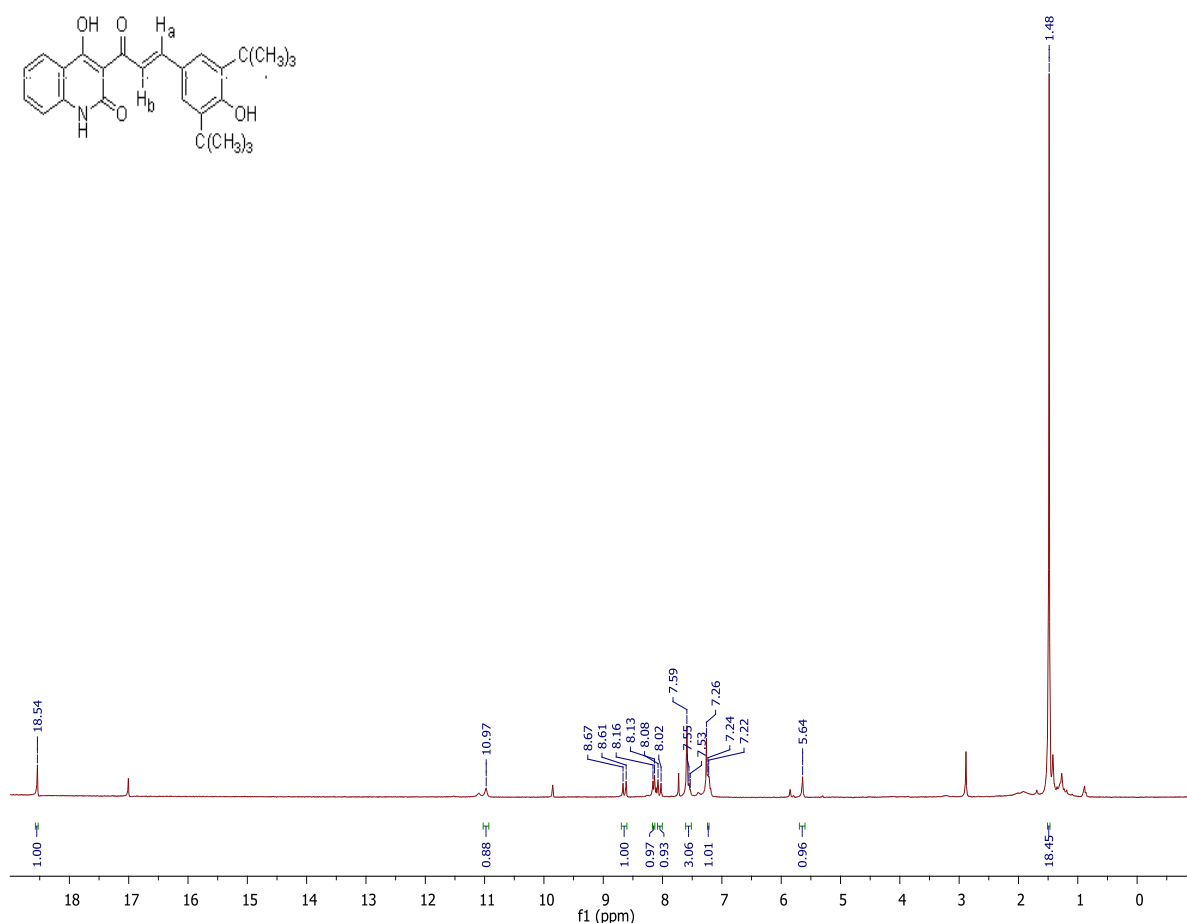
### **2.3.5. Μελέτη της Επαναληψιμότητας της Μεθόδου**

Εφόσον η μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων PLA εφαρμόζεται για πρώτη φορά για τις ουσίες αυτές στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, προέκυψε η ανάγκη της μελέτης της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Για το λόγο αυτό, ορισμένα πειράματα επαναλήφθηκαν στις ίδιες συνθήκες, με στόχο να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 3.1. Φασματοσκοπική Ανάλυση των Μορίων

Η ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού που λήφθηκε για την κινολινυλο-χαλκόνη **1** σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ).

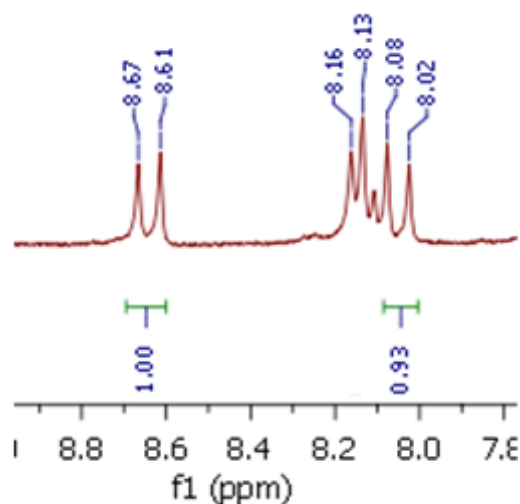


**Εικόνα 3.1.** Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Η απορρόφηση του πρωτονίου του υδροξυλίου εμφανίζεται σε χαμηλά μαγνητικά πεδία (17-18 ppm) λόγω της ισχυρής ενδομοριακής αλληλεπίδρασης με δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο του

μορίου. Αντίστοιχα, το πρωτόνιο του δεσμού N-H αντιστοιχεί στην κορυφή στα 10.97 ppm, λόγω σχετικής αποπροστασίας του εν λόγω υδρογόνου. Τα αρωματικά πρωτόνια των δυο δακτυλίων εμφανίζουν κορυφές μεταξύ 8.15 και 5.64 ppm.

Η απορρόφηση των βινυλικών πρωτονίων (Ha και Hb) εμφανίζεται στην περιοχή 6.5-8 ppm με τη μορφή δύο διπλών κορυφών (Εικόνα 3.2), στα 8.67 και στα 8.08 ppm και είναι αυτή που χαρακτηρίζει την ύπαρξη του α,β ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος της χαλκόνης που συντέθηκε. Οι διπλές αυτές κορυφές έχουν μεγάλες σταθερές σύζευξης ( $J=15-16$  Hz) και αποτελούν χαρακτηριστική ένδειξη της E γεωμετρίας του μορίου.



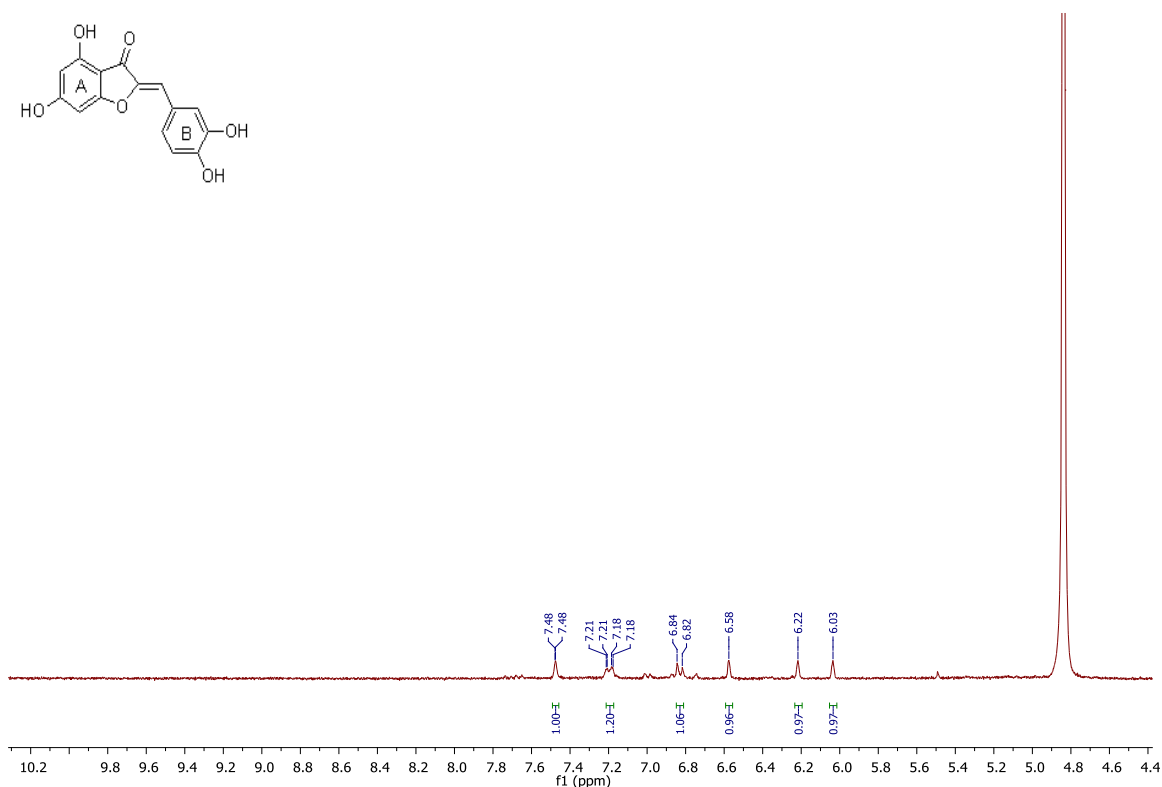
**Εικόνα 3.2.** Απορρόφηση βινυλικών πρωτονίων της κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Τέλος, τα πρωτόνια των μεθυλομάδων απορροφούν σε πιο υψηλά πεδία (1.48 ppm), καθώς πρόκειται για τα πιο προστατευμένα υδρογόνα του μορίου.

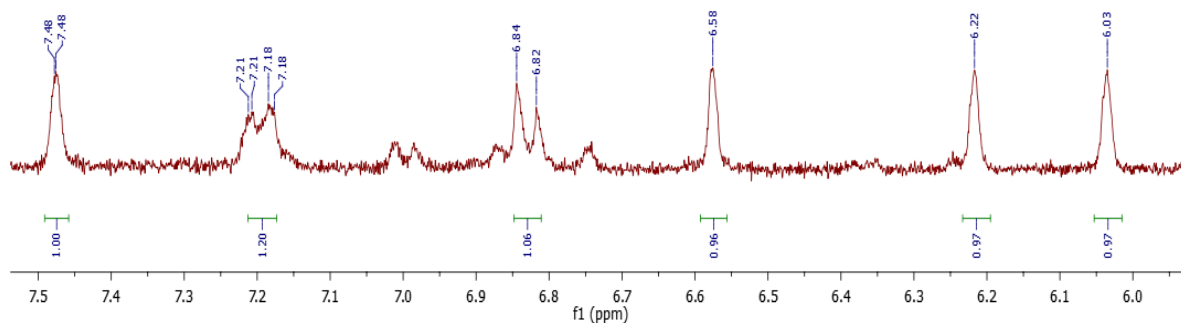
Στη συνέχεια (Εικόνα 3.3) παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού που λήφθηκε για την ωρεοσιδίνη **2** σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Η οξειδωτική κυκλοποίηση που πραγματοποιήθηκε οδηγεί σε ισομερές με Z γεωμετρία. Τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου A εμφανίζουν απορρόφηση στα 6.22 και 6.03

ppm, με τη μορφή μόνης κορυφής, ενώ τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου B εμφανίζουν διπλές κορυφές στα 7.48, 7.20 και 6.83 ppm, λόγω αλληλεπίδρασης μεταξύ τους.

Τέλος, το πρωτόνιο του διπλού δεσμού αντιστοιχεί στην κορυφή στα 6.58 ppm και το γεγονός ότι εμφανίζεται ως μια μόνη κορυφή αποδεικνύει την κυκλοποίηση που πραγματοποιήθηκε.



**Εικόνα 3.3.** Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της ωρεοσιδίνης **2**



**Εικόνα 3.4.** Αρωματική περιοχή φάσματος πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της ωρεοσιδίνης **2**

## 3.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων

### 3.2.1. Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, Ζ-Δυναμικό

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας μεταβλήθηκαν ορισμένες παράμετροι της διαδικασίας που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στα χαρακτηριστικά των σωματιδίων και στην απόδοση του εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, μεταβλήθηκαν το μοριακό βάρος του PLA, το ποσοστό φόρτωσης, δηλαδή η μάζα της προς εγκλεισμό ένωσης ως προς τη μάζα του PLA (drug loading), η αναλογία της υδατικής προς την οργανική φάση του γαλακτώματος, η ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA), η θερμοκρασία και ο ρυθμός ανάδευσης κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός κενών νανοσωματιδίων PLA στα τρία διαφορετικά μοριακά βάρη, πειράματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως «τυφλό» για τα αντίστοιχα πειράματα νανοεγκλεισμού. Ο Πίνακας 3.1 παρουσιάζει τα πειράματα σχηματισμού κενών (blank) νανοσωματιδίων PLA.

**Πίνακας 3.1.** Πειράματα σχηματισμού νανοσωματιδίων PLA (τυφλά)

Υλικά	Θ (°C)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	% Φόρτωσης	Αναλογία Όγκου Οργ.-Υδ. Φάσης	% PVA
PLA <sub>1</sub> *	25	250	-	0,07	1
PLA <sub>2</sub> *	25	250	-	0,07	1
PLA <sub>3</sub> *	25	250	-	0,07	1

\*Τα πολυμερή κατατάχθηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συγκεκριμένα, το PLA<sub>1</sub> αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο μοριακού βάρους πολυ(γαλακτικό οξύ), το PLA<sub>2</sub> στο μεσαίου και το PLA<sub>3</sub> στο μικρότερου μοριακού βάρους ( $Mn_1=43.400$  g/mol,  $Mn_2=27.300$  g/mol και  $Mn_3=16.700$  g/mol, αντίστοιχα).

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα

τρία πειράματα των νανοσωματιδίων PLA φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 3.2).

**Πίνακας 3.2.** Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (τυφλά)

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-δυναμικό (mV)
PLA <sub>1</sub>	240,8 ± 0,27	0,108 ± 0,25	-2,00 ± 0,01
PLA <sub>2</sub>	242,4 ± 1,626	0,049 ± 0,016	-7,82 ± 0,788
PLA <sub>3</sub>	253,6 ± 1,838	0,054 ± 0,001	-8,14 ± 0,0961

Παρατηρούμε ότι για το μικρότερο μέσο μοριακό βάρος του PLA, βρέθηκε το μέγιστο μέγεθος νανοσωματιδίων, από τα 240,8 και τα 242,4 nm, στα 253,6 nm αντίστοιχα. Όσο μειώνεται το μέσο μοριακό βάρος, το ζ-δυναμικό γίνεται αρνητικότερο, γεγονός που υποδηλώνει σταθερότερες νανοσωματιδιακές δομές. Όσον αφορά στην κατανομή των μεγεθών, τα μικρότερου μοριακού βάρους πολυμερή έδειξαν πολύ μεγαλύτερη ομοιογένεια δείγματος.

Ο Πίνακας 3.3 παρουσιάζει τα πειράματα εγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης **1**, στις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 3.3.** Πειράματα σχηματισμού νανοεγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Υλικά (PLA_Ενεργός Ουσία)	Θ (°C)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	% Φόρτωσης	Αναλογία Όγκου Οργ.-Υδ. Φάσης	% PVA
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1a)	25	250	20	0,12	1
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1b)	35	250	20	0,12	1
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1c)	25	250	20	0,06	1
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1d)	25	250	20	0,12	5
PLA <sub>2</sub> _χαλκόνη (1e)	25	250	20	0,12	1
PLA <sub>3</sub> _χαλκόνη (1f)	25	250	20	0,12	1
PLA <sub>3</sub> _χαλκόνη (1g)	25	550	20	0,12	1
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1h)	25	250	40	0,12	1
PLA <sub>1</sub> _χαλκόνη (1i)	25	250	60	0,16	1

Στο πρώτο πείραμα, πραγματοποιήθηκε η φόρτωση του πολυμερούς με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (PLA<sub>1</sub>) με την κινολινυλο-χαλκόνη **1**, σε

θερμοκρασία δωματίου, σε αρχική φόρτωση (drug loading) 20%. Ως συνεχής φάση, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα της PVA με περιεκτικότητα 1% w/v και το γαλάκτωμα με αναλογία όγκων οργανικής προς υδατική φάση ίση με 12% αναδεύτηκε στα 250 rpm, πριν την τοποθέτησή του σε shaker. Τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν (**1a**) είχαν μέγεθος 260,3 nm, δείκτη πολυδιασποράς (pdi) ίσο με 0,1 και αρνητικό ζ-δυναμικό, ίσο με -1,42 mV. Το πείραμα αυτό αποτελεί το αρχικό πείραμα, συγκριτικά με το οποίο μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων παραμέτρων της διεργασίας στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.

Ο Πίνακας 3.4 συνοψίζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων, παρουσιάζοντας τα πειράματα νανοεγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης **1** που πραγματοποιήθηκαν.

**Πίνακας 3.4.** Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (πειράματα **1a** – **1i**)

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-δυναμικό (mV)
1a	260,3 ± 2,77	0,1 ± 0,02	-1,42 ± 0,70
1b	298,7 ± 6,79	0,267 ± 0,01	-2,32 ± 0,34
1c	264,2 ± 0,28	0,076 ± 0,02	-6,87 ± 0,09
1d	374,9 ± 9,89	0,138 ± 0,02	-6,38 ± 0,39
1e	230,4 ± 2,97	0,128 ± 0,021	-9,98 ± 0,0115
1f	234,1 ± 3,323	0,097 ± 0,013	-4,74 ± 0,368
1g	383,6 ± 6,364	0,214 ± 0,013	-3,17 ± 0,0252
1h	248,6 ± 3,25	0,063 ± 0,02	-5,66 ± 0,16
1i	321,3 ± 2,192	0,126 ± 0,013	-2,89 ± 0,156

Πρώτα, εξετάστηκε η επίδραση της ανόδου της θερμοκρασίας κατά 10°C, η οποία οδήγησε σε μεγαλύτερα σωματίδια (**1b**), με διάμετρο 298,7 nm, από 260,3 nm, και με αρκετά μικρότερη ομοιογένεια δείγματος, δηλαδή με δείκτη πολυδιασποράς ίσο με 0,267, από 0,1 που ήταν. Η άνοδος της θερμοκρασίας δε φαίνεται να επιδρά ωστόσο στο δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των σωματιδίων, το οποίο μετρήθηκε στα -2,32 mV, δηλαδή πολύ κοντινή τιμή με του αρχικού πειράματος (**1a**). Η επίδραση αυτή της αύξησης της θερμοκρασίας επιβεβαιώνεται από βιβλιογραφικές πηγές [4].



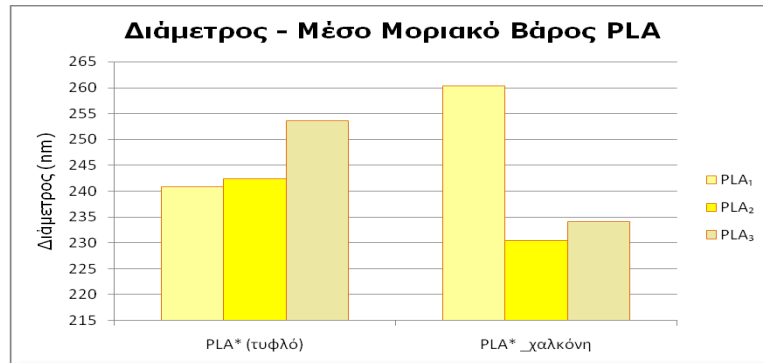
Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της αναλογίας της οργανικής προς την υδατική φάση του γαλακτώματος. Η αρχική αναλογία (12%) αναφερόταν σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA και 1,8 ml οργανικού διαλύματος της κινολινυλο-χαλκόνης και του PLA. Επιχειρήθηκε ο διπλασιασμός της υδατικής φάσης, δηλαδή ο υποδιπλασιασμός της αρχικής αναλογίας, στα αποτελέσματα όμως δε σημειώθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων που προέκυψαν (**1c**) ήταν στα 264,2 nm, δηλαδή παρόμοιο με το αρχικό, και ο δείκτης πολυδιασποράς μειώθηκε στο 0,076, το οποίο υποδεικνύει μεγαλύτερη ομοιογένεια δείγματος, ενώ το ζ-δυναμικό μειώθηκε ελαφρώς, στα -6,87 mV.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός νανοσωματιδίων σε υδατικό διάλυμα PVA περιεκτικότητας 5% (**1d**), όπου το μέγεθος αυξήθηκε σημαντικά αγγίζοντας τα 375 nm, όπως και ο δείκτης *rdi*, ο οποίος έφτασε το 0,138. Το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παράμετρο αυτή, καθώς μειώθηκε ελαφρώς, στα -6,38 mV.

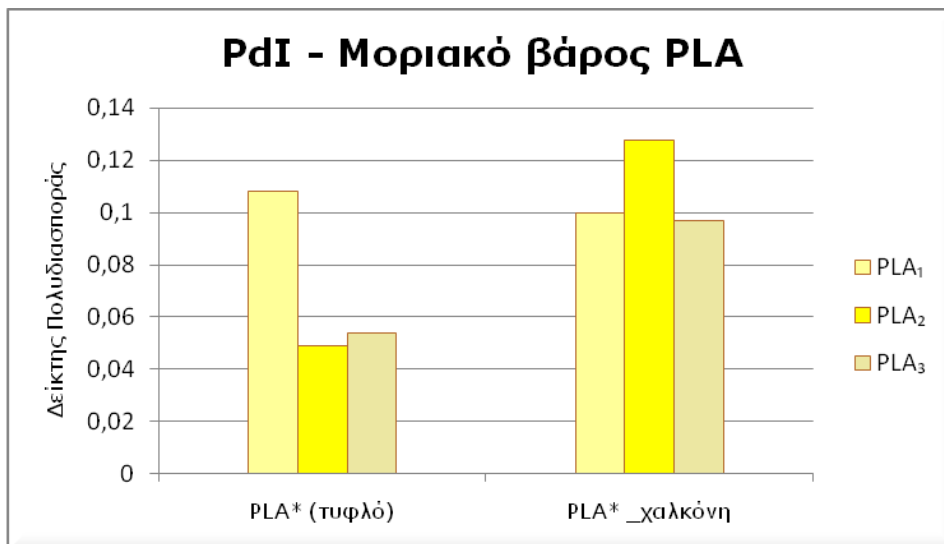
Μια άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν το μέσο μοριακό βάρος του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα με PLA<sub>2</sub>, δηλαδή μέσου αριθμού μοριακού βάρους  $M_n=27.265$  g/mol, τα σωματίδια (**1e**) που προέκυψαν από τον εγκλεισμό της κινολινυλο-χαλκόνης **1** παρουσίαζαν μικρότερη διάμετρο, στα 230,4 nm, δείκτη *rdi* ελαφρώς αυξημένο, ίσο με 0,128, ενώ παρουσίασαν αρκετά αρνητικότερο δυναμικό επιφανείας, ίσο με -9,98 mV.

Εντούτοις, η επίδραση του μοριακού βάρους δεν ήταν όμοια όταν παρασκευάστηκαν τα νανοσωματίδια **1f** με το πολυμερές με το μικρότερο μοριακό βάρος, δηλαδή το PLA<sub>3</sub> ( $M_n=16.738$  g/mol). Ειδικότερα, η μέση διάμετρος που προέκυψε από την παρτίδα αυτή ήταν παρόμοια με την παρτίδα του PLA<sub>2</sub>, δηλαδή στα 234,1 nm, το δείγμα όμως αυτή τη φορά παρουσίαζε μεγαλύτερη ομοιογένεια, με *rdi* = 0,097, ενώ από την άλλη μεριά το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα και βρέθηκε στα -4,74 mV.

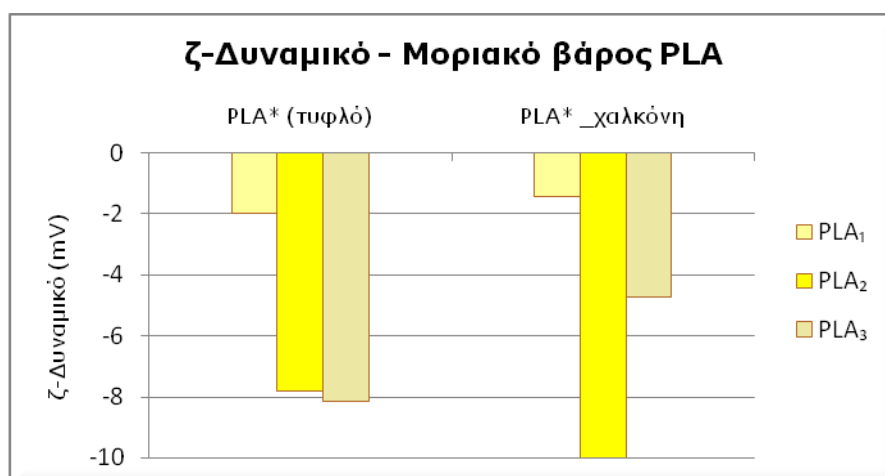
Η επίδραση της μεταβολής του μέσου μοριακού βάρους του χρησιμοποιούμενου PLA στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων φαίνεται παρακάτω (Διάγραμμα 1 – 3):



**Διάγραμμα 1.** Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο μέγεθος των νανοσωματιδίων



**Διάγραμμα 2.** Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο δείκτη πολυδιασποράς



**Διάγραμμα 3.** Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του PLA στο ζ-δυναμικό

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πείραμα χρησιμοποιώντας το PLA<sub>3</sub>, αλλά με αυξημένο το ρυθμό ανάδευσης στα 550 rpm κατά τη διάρκεια της έγχυσης της οργανικής φάσης και του σχηματισμού του γαλακτώματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως (**1g**), παρατηρήθηκε δραματική αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, στα 383,6 από τα 234,1 nm, και διπλασιασμός του δείκτη πολυδιασποράς, ο οποίος έφτασε το 0,214 από το 0,097, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ανομοιογένεια στο δείγμα. Τέλος, το δυναμικό επιφανείας δε φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά, καθώς βρέθηκε στα -3,17 mV, τιμή πολύ κοντινή με τα -4,74 mV.

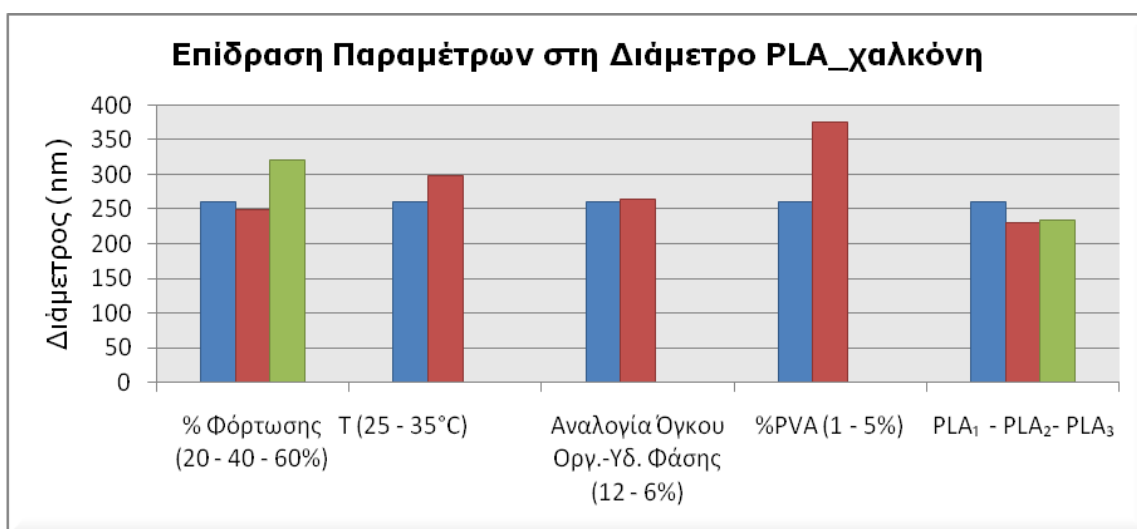
Τα επόμενα πειράματα (**1h** και **1i**) αφορούν στο ποσοστό φόρτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα νανοσωματίδια. Για το λόγο αυτό είναι ίσως τα σημαντικότερα από πλευράς εφαρμογής της μεθόδου, καθώς στόχος για έναν φορέα φαρμάκου είναι η φόρτωση σε ενεργό ουσία να είναι η μέγιστη και η ποσότητα του υλικού του φορέα να είναι η ελάχιστη δυνατή. Στα προηγούμενα πειράματα είχε οριστεί ως ποσοστό θεωρητικής φόρτωσης με φάρμακο (drug loading) το 20% w/w. Παρατηρούμε λοιπόν από τον Πίνακα 3.4.b, ότι με ποσοστό θεωρητικής φόρτωσης κινολινυλο-χαλκόνης ίσο με 40%, προέκυψαν νανοσωματίδια (**1h**) με αρκετά ικανοποιητικά χαρακτηριστικά. Η μέση διάμετρος τους ήταν στα 248,6 nm, ο δείκτης πολυδιασποράς ήταν ίσος με 0,063, ενδεικτικό μεγάλης ομοιογένειας στο δείγμα, ενώ το ζ-δυναμικό τους ήταν στα -5,66 mV, δηλαδή ελαφρώς αρνητικότερο από τα αντίστοιχα νανοσωματίδια με 20% θεωρητική φόρτωση (**1a**).

**Πίνακας 3.4.b.** Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (πειράματα **1a** , **1h**, **1i**)

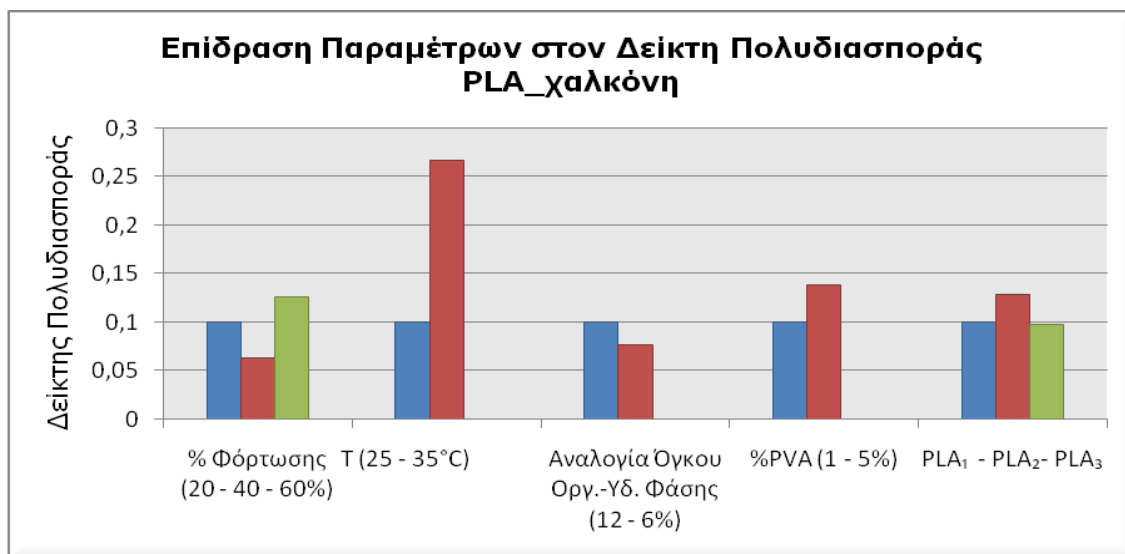
Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-δυναμικό (mV)
1a	260,3 ± 2,77	0,1 ± 0,02	-1,42 ± 0,70
1h	248,6 ± 3,25	0,063 ± 0,02	-5,66 ± 0,16
1i	321,3 ± 2,192	0,126 ± 0,013	-2,89 ± 0,156

Από την άλλη πλευρά, όταν το ποσοστό θεωρητικής φόρτωσης αυξήθηκε περαιτέρω στο 60%, το μέγεθος των σωματιδίων (**1i**) βρέθηκε στα 321,3 nm, δηλαδή αρκετά μεγαλύτερο από αυτό που παρατηρήθηκε στα δείγματα **1a** και **1h**. Αντίστοιχα ο δείκτης πολυδιασποράς δε μειώθηκε, αλλά βρέθηκε ίσος με 0,126, ενώ το δυναμικό που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων ήταν ασθενέστερο, ίσο με -2,89 mV.

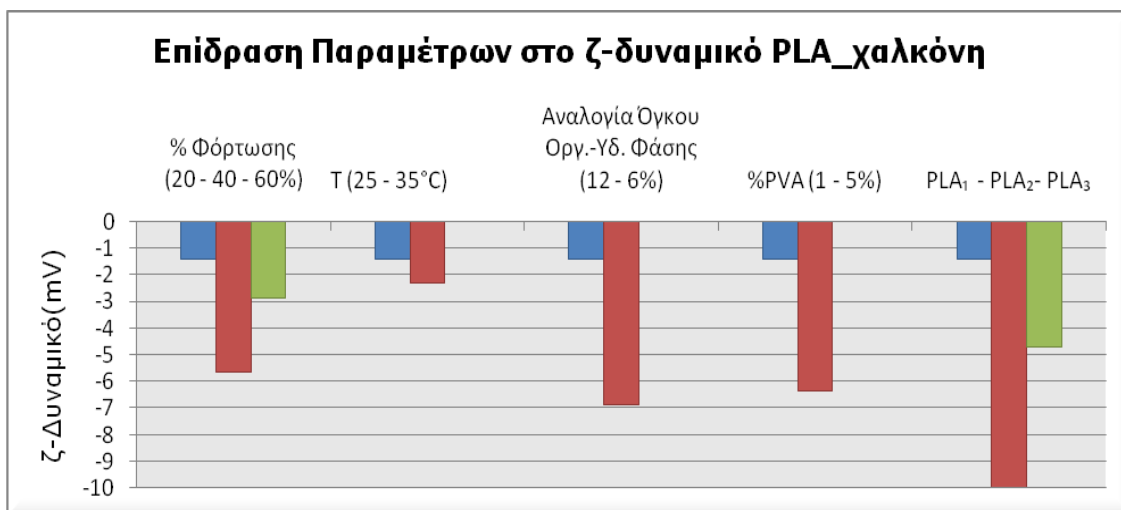
Συνοπτικά για την κινολινυλο-χαλκόνη **1**, η επίδραση των μελετημένων παραμέτρων στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων παρουσιάζεται παρακάτω:



**Διάγραμμα 4.** Επίδραση παραμέτρων στο μέγεθος νανοσωματιδίων PLA\_χαλκόνη (**1a-1i**)



**Διάγραμμα 5.** Επίδραση παραμέτρων στην κατανομή των μεγεθών των νανοσωματιδίων PLA\_χαλκόνη (**1a-1i**)



**Διάγραμμα 6.** Επίδραση παραμέτρων στο δυναμικό επιφανείας των νανοσωματιδίων PLA\_χαλκόνη (1a-1i)

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα νανοεγκλεισμού της ωρεοσιδίνης **2**, όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο το PLA<sub>1</sub>, δηλαδή το μεγαλύτερου μέσου μοριακού βάρους PLA. Τα πειράματα αυτά και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα:

**Πίνακας 3.5.** Πειράματα νανοεγκλεισμού της ωρεοσιδίνης **2**

Υλικά (PLA_Ενεργός Ουσία)	Θ (°C)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	% Φόρτωσης	Αναλογία Όγκου Οργ.-Υδ. Φάσης	% PVA
PLA1_ωρόνη (2a)	25	250	20	0,12	1
PLA1_ωρόνη (2b)	35	250	20	0,12	1
PLA1_ωρόνη (2c)	25	250	60	0,16	1

Σχετικά με το νανοεγκλεισμό της ωρεοσιδίνης **2**, εξετάστηκε η επίδραση της μεταβολής δυο παραμέτρων, της θερμοκρασίας και του ποσοστού θεωρητικής φόρτωσης των νανοσωματιδίων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.6.** Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (ωρεοσιδίνη **2**)

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-δυναμικό (mV)
2a	264,1 ± 5,52	0,128 ± 0,01	-6,64 ± 0,26
2b	232,2 ± 7,87	0,123 ± 0,02	-6,56 ± 0,92
2c	231,1 ± 3,631	0,288 ± 0,026	-3,45 ± 0,0473

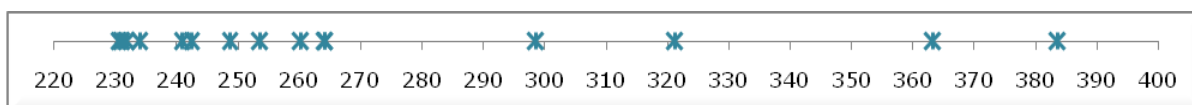
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο νανοεγκλεισμός της ωρεοσιδίνης στις ίδιες συνθήκες με το αρχικό πείραμα (Πίνακας 3.3, **1a**). Τα νανοσωματίδια που προέκυψαν (**2a**) παρουσίασαν μέση διάμετρο ίση με 264,1 nm, παρόμοιο μέγεθος με αυτά που περιείχαν την κινολινυλο-χαλκόνη (**1a**). Όσον αφορά στην κατανομή των μεγεθών τους, ο δείκτης πολυδιασποράς προέκυψε ίσος με 0,128, ενώ το δυναμικό επιφανείας τους ήταν ελαφρώς αρνητικότερο, δηλαδή στα -6,64 mV.

Έπειτα, μελετήθηκε η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C. Στο συγκεκριμένο πείραμα (**2b**), παρατηρήθηκε μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων, δηλαδή μέση διάμετρος ίση με 232,2 nm, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ δυναμικό δεν επηρεάστηκαν και προέκυψαν ίσα με 0,123 και -6,56 mV, αντίστοιχα.

Τέλος, επιχειρήθηκε η φόρτωση των νανοσωματιδίων με μεγαλύτερη ποσότητα της ωρόνης, δηλαδή 60% αντί για 20%. Τα νανοσωματίδια **2c** παρουσίασαν μια μέση διάμετρο ίση με 231,1 nm, αρκετά μικρότερη από αυτή που προέκυψε από 20% θεωρητική φόρτωση, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς αυξήθηκε σημαντικά, αγγίζοντας το 0,288, ενδεικτικό ανομοιογένειας στο δείγμα. Το ζ-δυναμικό επηρεάστηκε ελάχιστα από την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης, βρέθηκε ίσο με -3,45 mV, δηλαδή ελαφρώς ασθενέστερο από το αντίστοιχο που προέκυψε από φόρτωση 20%.

Παρατηρούμε ότι τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν στο σύνολο των πειραμάτων (Πίνακες 3.1-3.6), έχουν διάμετρο στο εύρος μεταξύ 230 και 390 nm. Παρόλα αυτά, παρατηρούμε ότι από τις 15 διαφορετικές παρτίδες νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, μόνο τέσσερις είναι αυτές που έχουν τιμές μεγαλύτερες από τα

270 nm, δηλαδή στα  $298,7 \pm 6,79$  nm,  $321,3 \pm 2,19$  nm,  $374,9 \pm 9,89$  nm και  $383,6 \pm 6,36$  nm, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι υπόλοιπες παρτίδες νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν, οι οποίες αποτελούν την πλειοψηφία των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, παρουσίασαν συνολικά ένα μέσο μέγεθος κοντά στα 245 nm. Η κατανομή αυτή των μεγεθών των παρασκευασθέντων νανοσωματιδίων φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 3.2.1).

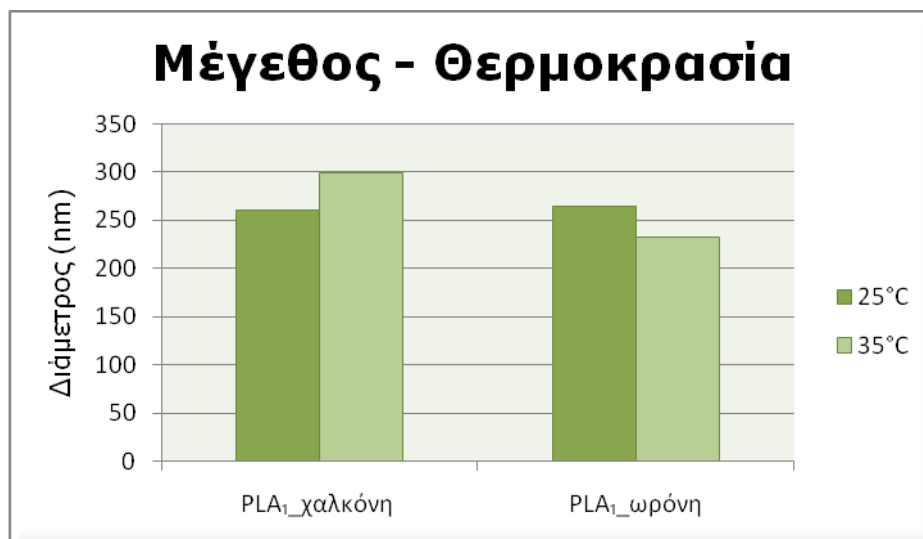


**Σχήμα 3.2.1.** Κατανομή μεγεθών σχηματισθέντων νανοσωματιδίων

Είναι φανερό, λοιπόν, ότι το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης - εξάτμισης του οργανικού διαλύτη κυμάνθηκε μεταξύ 230 και 265 nm, με εξαίρεση τις τιμές που προέκυψαν από τέσσερα πειράματα, οι οποίες εντούτοις θεωρούνται επίσης αποδεκτές για χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών.

### 3.2.1.1. Σύγκριση μεταξύ κινολινυλο-χαλκόνης 1 και ωρεοσιδίνης 2

Τα αποτελέσματα των εγκλεισμών της ωρεοσιδίνης **2** σε σχέση με τη θερμοκρασία φαίνονται συγκριτικά με τα αντίστοιχα πειράματα εγκλεισμού κινολινυλο-χαλκόνης **1** στο Διάγραμμα 7:



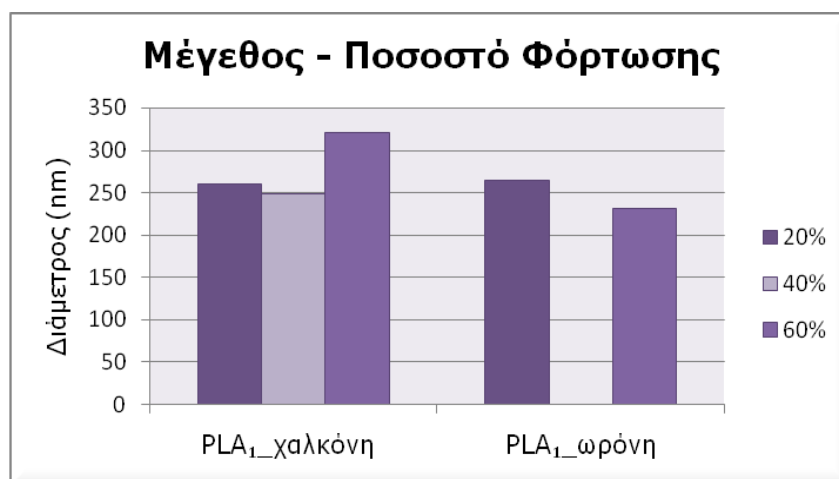
**Διάγραμμα 7.** Επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγεθος νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη

Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 35°C, τα σωματίδια που περιείχαν κινολινυλο-χαλκόνη **1** παρουσίασαν αύξηση μεγέθους, από 260,3 nm σε 298,7 nm, και αρκετά μικρότερη ομοιογένεια δείγματος, δηλαδή με δείκτη πολυδιασποράς ίσο με 0,267, από 0,1. Αντίστοιχα τα σωματίδια που περιείχαν ωρεοσιδίνη **2** παρουσίασαν μείωση του μεγέθους τους με την αύξηση της θερμοκρασίας, δηλαδή η μέση διάμετρος ήταν ίση με 232,2 nm από 264,1 nm, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς δεν επηρεάστηκε και προέκυψε ίσος με 0,123. Παράλληλα η άνοδος της θερμοκρασίας δε φαίνεται να επιδρά στο δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των σωματιδίων των σωματιδίων, αφού και στις δυο περιπτώσεις παραμένει σχεδόν σταθερό.

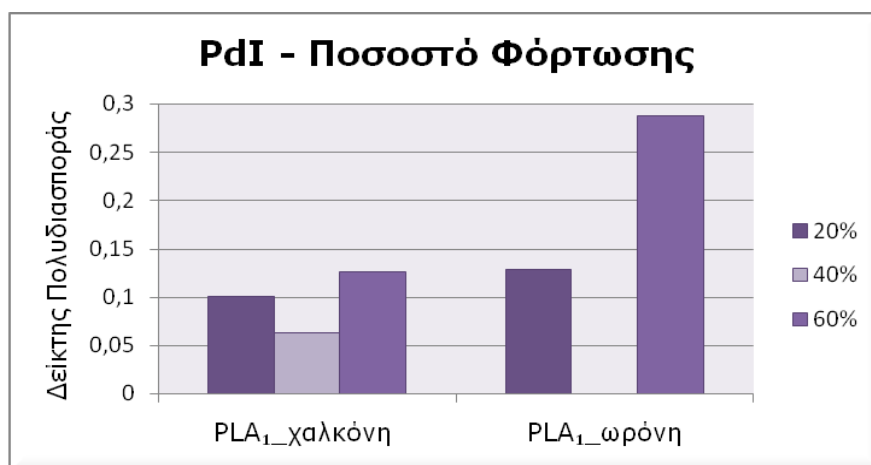


Σε σχέση όμως με το πείραμα του νανοεγκλεισμού της κινολινυλοχαλκόνης σε αυξημένη θερμοκρασία, τα νανοσωματίδια με την ωρεοσιδίνη παρουσιάζουν πολύ καλύτερα χαρακτηριστικά, δηλαδή μικρότερο μέγεθος, καλύτερη ομοιογένεια και ελαφρώς αρνητικότερο ζ-δυναμικό.

Η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης του ποσοστού θεωρητικής φόρτωσης (drug loading) στο μέγεθος των νανοσωματιδίων με κινολινυλοχαλκόνη και με ωρεοσιδίνη, αντίστοιχα, φαίνεται στα Διαγράμματα 8 και 9.



**Διάγραμμα 8.** Επίδραση της θεωρητικής φόρτωσης (drug loading) στο μέγεθος νανοσωματιδίων με εγλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη



**Διάγραμμα 9.** Επίδραση της θεωρητικής φόρτωσης (drug loading) στον δείκτη πολυδιασποράς νανοσωματιδίων με εγλεισμένη κινολινυλο-χαλκόνη ή ωρεοσιδίνη

Παρατηρούμε ότι η αύξηση της θεωρητικής φόρτωσης της δραστικής ουσίας, επιδρά διαφορετικά σε κάθε ένωση. Για παράδειγμα, με μικρή αύξηση, δηλαδή από 20% σε 40%, τα σωματίδια της κινολινυλο-χαλκόνης

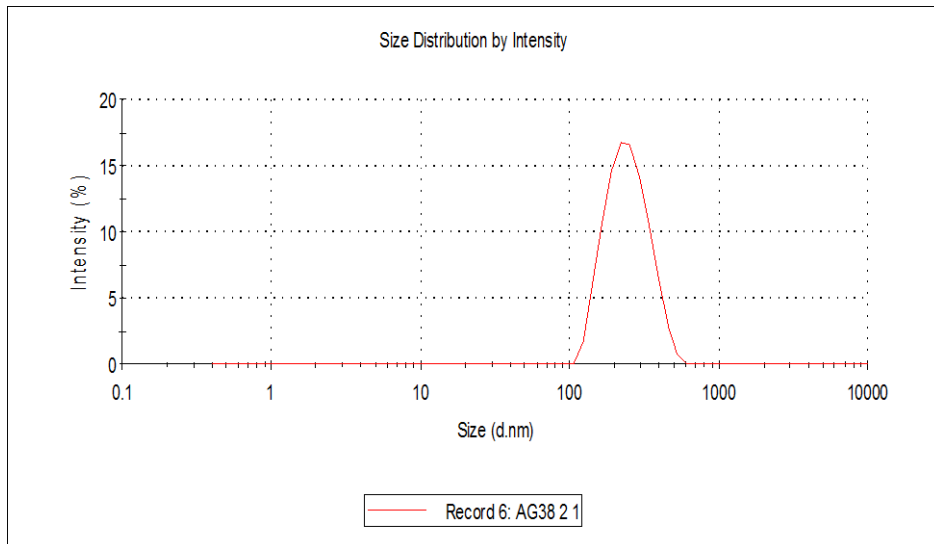
**1** προκύπτουν με καλύτερα χαρακτηριστικά, μικρότερο μέγεθος και μεγαλύτερη ομοιογένεια. Από την άλλη μεριά, όταν η φόρτωση φτάσει στο 60%, τα σωματίδια αυξάνονται αρκετά σε μέγεθος, ενώ αυξάνεται και η ανομοιογένεια του δείγματος.

Όσον αφορά στην κατανομή των μεγεθών στο δείγμα, το ίδιο συμβαίνει και με την ωρεοσιδίνη, δηλαδή με αύξηση του ποσοστού θεωρητικής φόρτωσης ουσίας στο 60%, ο δείκτης πολυδιασποράς αυξάνεται σημαντικά. Το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων όμως δε φαίνεται να επηρεάζεται με τον ίδιο τρόπο.

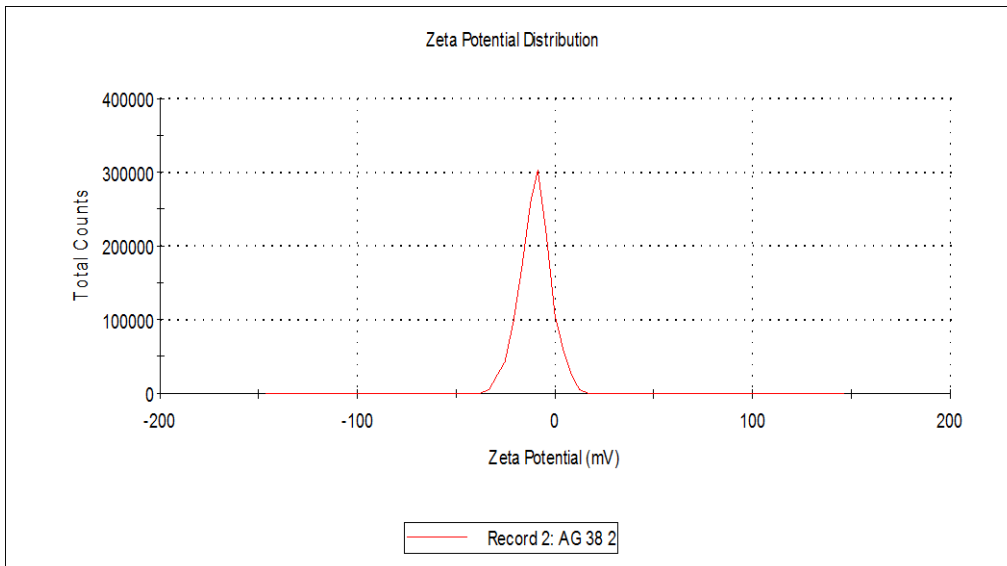
Το δυναμικό επιφανείας των σωματιδίων δε φάνηκε να επηρεάζεται ούτε σε αυτή την περίπτωση.

Συνολικά, το πιο επιτυχημένο πείραμα από πλευράς χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων είναι αυτό του εγκλεισμού χαλκόνης σε PLA<sub>2</sub> (μέσου αριθμού μοριακό βάρος  $M_n=27.300$  g/mol) (**1e**). Τα σωματίδια αυτά παρουσιάζουν το μικρότερο μέγεθος που επιτεύχθηκε, δηλαδή διάμετρο 230,4 nm, δείκτη πολυδιασποράς 0,128, το οποίο είναι κοντά στο 0,1, ενώ παράλληλα το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αυτών έχει τη μέγιστη αρνητική τιμή που επιτεύχθηκε, δηλαδή -9,98 mV. Κατ' επέκταση, πρόκειται για τα μικρότερου μεγέθους νανοσωματίδια που παρήχθησαν και ταυτόχρονα τα σταθερότερα.

Ενδεικτικά, παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο δείγμα από τη μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS:



**Διάγραμμα 10.** Κατανομή μεγέθους του δείγματος **1e**

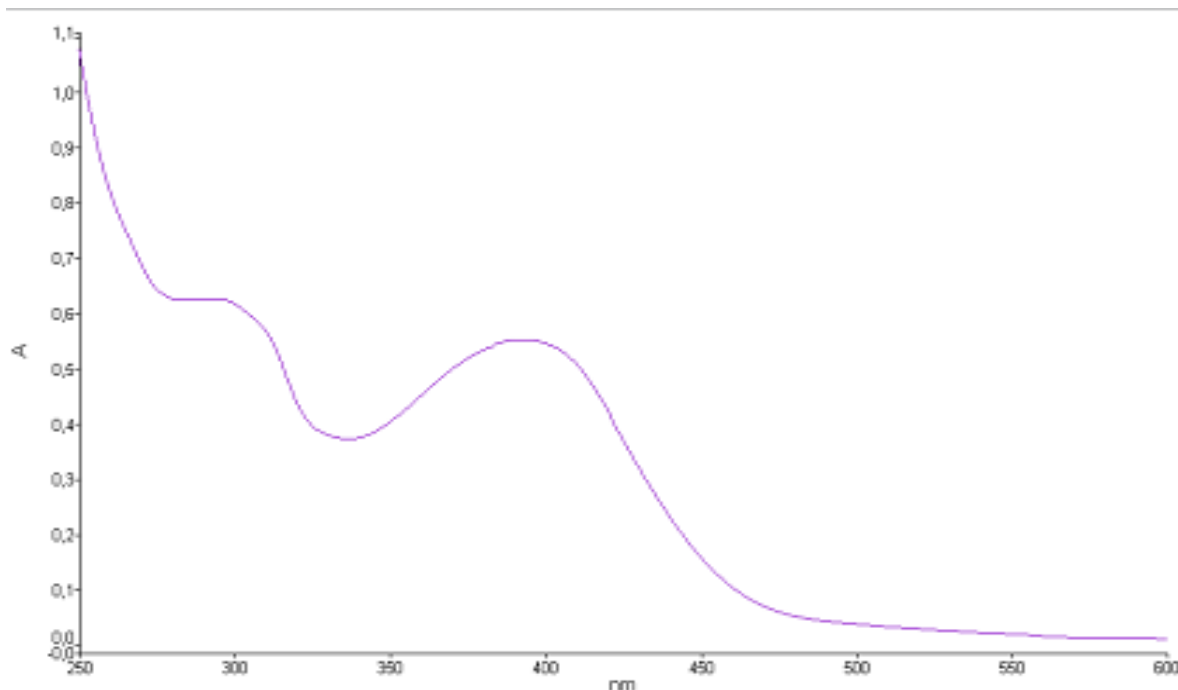


**Διάγραμμα 11.** Κατανομή του δυναμικού επιφανείας του δείγματος **1e**

## 3.2.2. Απόδοση Εγκλεισμού των Βιοδραστικών Ενώσεων

### 3.2.2.1. Κινολινυλο-χαλκόνη

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας εγκλεισμού (*Encapsulation Efficiency, EE%*) της κινολινυλο-χαλκόνης **1**, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης. Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης (Εικόνα 3.5), προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 400 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



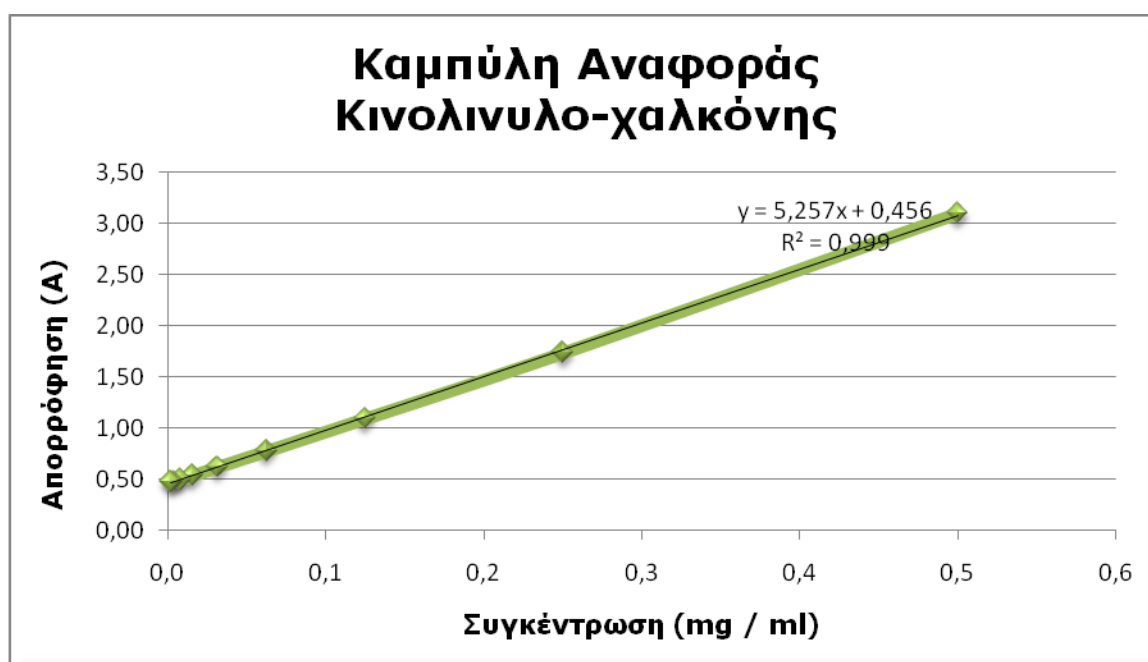
**Εικόνα 3.5.** Φάσμα ορατού - υπεριώδους (UV-Vis) της κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Για το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετρήσεις, εκ των οποίων λήφθηκε ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3.7.).

**Πίνακας 3.7.** Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κινολινυλο-χαλκόνης (1)

Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση (A)
0,5	3,1045
0,25	1,7405
0,125	1,0985
0,0625	0,7810
0,03125	0,6235
0,015625	0,5415
0,007813	0,5013
0,0039	0,4865
0,00195	0,4785

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Πίνακα 3.7, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της συγκέντρωσης της κινολινυλο-χαλκόνης συναρτήσεως της απορρόφησης στα 400 nm (Διάγραμμα 12).



**Διάγραμμα 12.** Καμπύλη αναφοράς κινολινυλο-χαλκόνης 1

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης, η οποία λήφθηκε από τα υπερκείμενα S1 και S2 των

φυγοκεντρήσεων. Συγκεκριμένα, για το κάθε υπερκείμενο λήφθηκε ένα φάσμα μεταξύ 600 και 250 nm, και λαμβανόταν η μέγιστη απορρόφηση του κάθε δείγματος, στα  $400 \pm 5$  nm. Για το υπερκείμενο S1, το οποίο ήταν αρκετά πυκνό, η μέτρηση πραγματοποιούταν μετά από κατάλληλη αραιώση, τέτοια ώστε να παραμένει μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς. Τελικά, προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

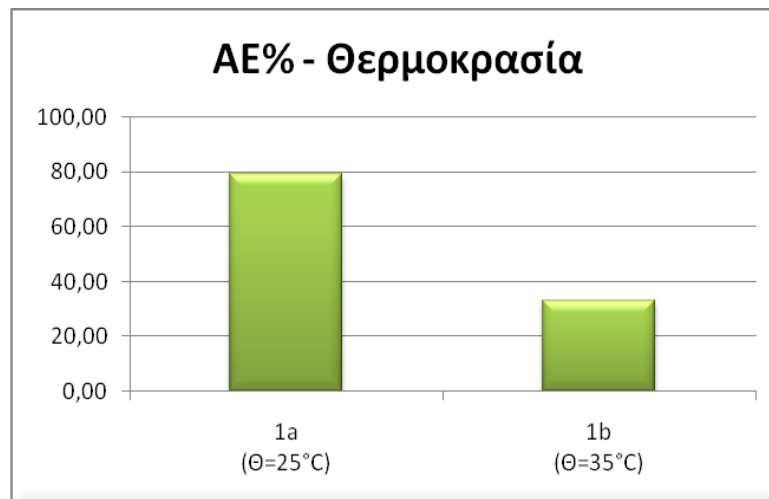
**Πίνακας 3.8.** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis κινολινυλο-χαλκόνης **1**

Δείγμα	S1		S2		Σύνολο (mg)	Απόδοση (%)
	Απορροφ. (A)	Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορροφ. (A)	Συγκέντρωση (mg/ml)		
<b>1a</b>	0,500	C/5 0,0083	0,370	-*	0,620	79
<b>1b</b>	0,820	C/2 0,0691	0,360	-	2,005	33
<b>1c</b>	0,554	C/3 0,0185	0,379	-	1,669	44
<b>1d</b>	0,480	C/10 0,0045	0,470	0,0026	0,661	78
<b>1e</b>	0,537	C/8 0,0153	0,260	-	1,776	41
<b>1f</b>	0,503	C/2 0,0089	0,215	-	0,258	91
<b>1g</b>	0,503	C/4 0,0089	0,631	0,0331	0,615	80
<b>1h</b>	0,500	C/10 0,0083	0,770	0,0596	1,557	74
<b>1i</b>	0,460	C/10 0,0006	0,600	0,0273	0,200	98

\*Τα υπερκείμενα S2 στα οποία η συγκέντρωσή τους σε κινολινυλο-χαλκόνη **1** παρουσιάζεται ως «-» ήταν πολύ αραιά και η απορρόφησή τους βρέθηκε εκτός του εύρους της καμπύλης αναφοράς. Επειδή ήταν όγκου 3 ml, η ποσότητα της μη δεσμευμένης ουσίας θεωρήθηκε αμελητέα για το τελικό ποσοστό εγκλεισμού.

Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά εγκλεισμού είναι ικανοποιητικά στα περισσότερα πειράματα, με εξαίρεση τις παρτίδες **1b**, **1c** και **1e**. Συγκεκριμένα, το αρχικό πείραμα (**1a**) παρουσίασε αρκετά καλή απόδοση εγκλεισμού, 79%. Η αρχική φόρτωση ήταν 20% mg δραστικής ουσίας / mg πολυμερούς, δηλαδή τα 15 mg PLA που χρησιμοποιούνταν για το νανοεγκλεισμό αναμιγνύονταν με 3 mg κινολινυλο-χαλκόνης **1**. Η απόδοση 79% σημαίνει κατ' επέκταση ότι η τελική φόρτωση των νανοσωματιδίων **1a** με την ένωση **1** ήταν στο 15,8% mg δραστικής ουσίας / mg πολυμερούς.

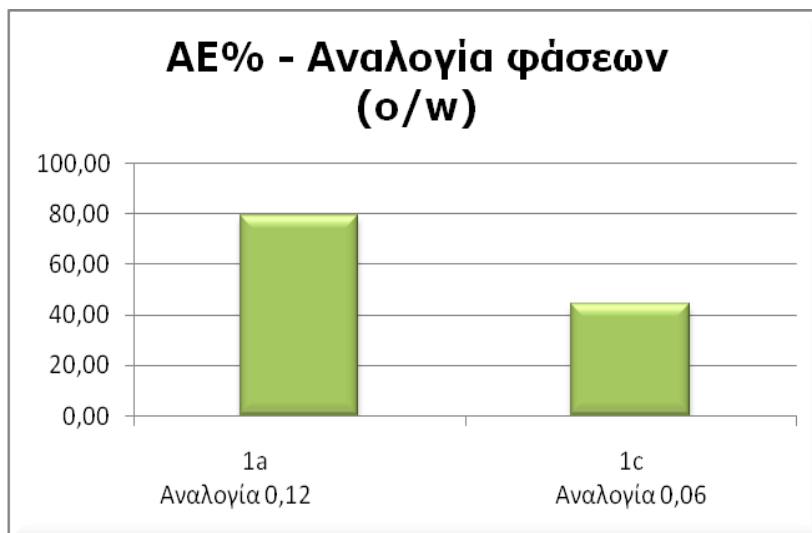
Με αύξηση της θερμοκρασίας κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος (**1b**), παρατηρούμε ότι η απόδοση του εγκλεισμού (AE%) μειώνεται σημαντικά σε σχέση με το αρχικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Ειδικότερα, η απόδοση φτάνει στο 33%. Η επίδραση αυτή της αύξησης της θερμοκρασίας (Διάγραμμα 13) επιβεβαιώθηκε από τη βιβλιογραφία [4].



**Διάγραμμα 13.** Επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας στην απόδοση του νανοεγκλεισμού

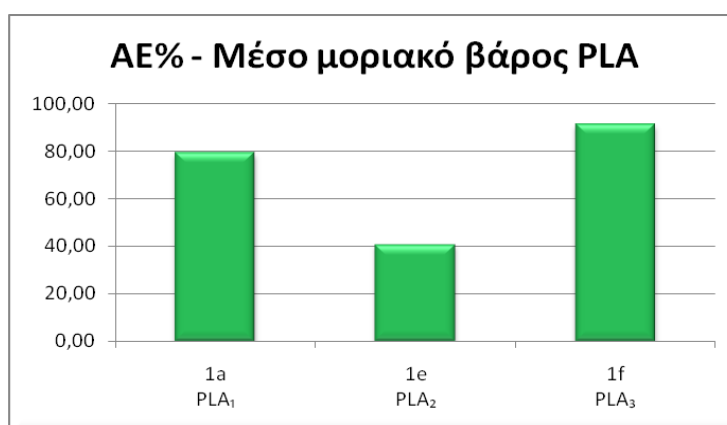
Αντίστοιχα, μεγάλη μείωση στην ικανότητα εγκλεισμού των νανοσωματιδίων παρατηρείται και στην περίπτωση του διπλασιασμού του όγκου της υδατικής φάσης του γαλακτώματος (**1c**). Συγκεκριμένα, από 79% που ήταν στο αρχικό πείραμα, δηλαδή με αναλογία οργανικής προς υδατική φάση ίση με 0,12, ελαττώνεται σε 44% όταν η αναλογία αντίστοιχα είναι 0,06. Η επίδραση αυτή της αναλογίας οργανικής προς υδατική φάση παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 14.

Από την άλλη μεριά, παρατηρούμε 78% απόδοση εγκλεισμού στην περίπτωση **1d**, όπου χρησιμοποιείται ως συνεχής φάση υδατικό διάλυμα PVA 5%. Συγκριτικά λοιπόν με το αρχικό πείραμα **1a**, όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PVA περιεκτικότητας 1% και η απόδοση του εγκλεισμού προσδιορίστηκε στο 79%, αντιλαμβάνεται κανείς ότι η παράμετρος αυτή δεν επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα εγκλεισμού των νανοσωματιδίων.



**Διάγραμμα 14.** Επίδραση της αναλογίας των φάσεων του γαλακτώματος στην απόδοση του νανοεγκλεισμού

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα πολυμερή μικρότερου μέσου μοριακού βάρους, το PLA<sub>2</sub> (**1e**) και το PLA<sub>3</sub> (**1f**). Στην παρτίδα **1e** παρατηρούμε ότι σε σύγκριση με το αρχικό πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε το PLA<sub>1</sub>, η απόδοση είναι σημαντικά χαμηλότερη, δηλαδή στο 41%. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιείται το ακόμη μικρότερου μέσου μοριακού βάρους PLA<sub>3</sub> (**1f**), η απόδοση είναι σημαντικά υψηλότερη από τις άλλες δυο περιπτώσεις, φτάνοντας στο 91% (Διάγραμμα 15).

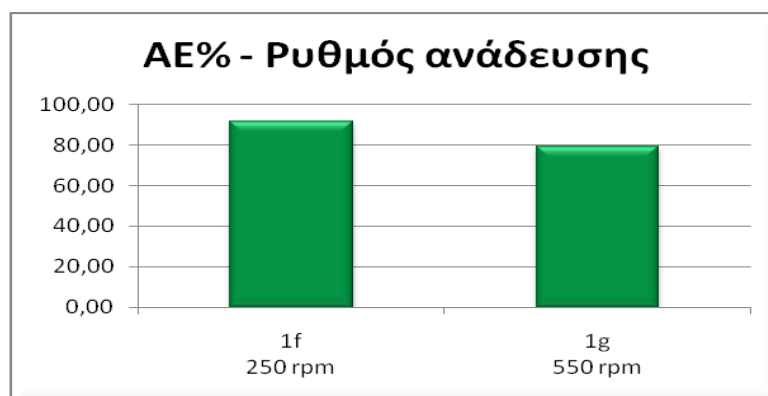


**Διάγραμμα 15.** Επίδραση του μέσου μοριακού βάρους του πολυμερούς στην ικανότητα εγκλεισμού

Στο πείραμα **1g** χρησιμοποιήθηκε και πάλι το PLA<sub>3</sub> ως φορέας της κινολινυλο-χαλκόνης **1**, αλλά αυτή τη φορά ο ρυθμός της μαγνητικής

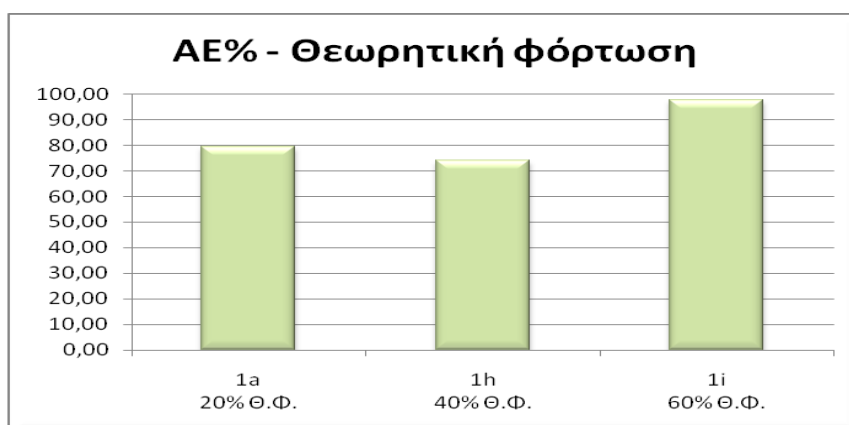


ανάδευσης κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος ήταν αυξημένος στα 550 rpm. Συγκριτικά λοιπόν με το πείραμα **1f** όπου χρησιμοποιήθηκε το PLA<sub>3</sub> η απόδοση είναι χαμηλότερη με την αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, δηλαδή φτάνει το 80%, από το 91% (**1f**).



**Διάγραμμα 16.** Επίδραση της αύξησης του ρυθμού ανάδευσης στην ικανότητα εγκλεισμού

Τέλος πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα **1h** και **1i**, στα οποία πραγματοποιήθηκε μεγαλύτερη αρχική φόρτωση δραστικής ουσίας, 40% και 60% αντίστοιχα. Οι αποδόσεις των εγκλεισμών αυτών ήταν αντίστοιχα 74% και 98%, δηλαδή για αρχική φόρτωση 40% η απόδοση μειώθηκε ελαφρώς συγκριτικά με το πείραμα **1a** (79%), αλλά με περαιτέρω αύξηση της αρχικής φόρτωσης δραστικής ουσίας η ικανότητα εγκλεισμού αυξήθηκε σημαντικά.



**Διάγραμμα 17.** Επίδραση της αύξησης της θεωρητικής φόρτωσης στην ικανότητα εγκλεισμού

Συνολικά, θα μπορούσαμε να ανάγουμε την απόδοση του κάθε εγκλεισμού σε ποσοστά πραγματικής φόρτωσης των νανοσωματιδίων,

ανάλογα με την αρχική φόρτωση. Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι το πιο επιτυχημένο πείραμα από πλευράς απόδοσης εγκλεισμού ήταν το **1i**, όπου πραγματοποιήθηκε 60% αρχική φόρτωση δραστικής ουσίας, και ακολουθεί το πείραμα **1f**, όπου χρησιμοποιήθηκε το PLA<sub>3</sub>, με μικρότερη όμως φόρτωση δραστικής ουσίας.



**Διάγραμμα 18.** Θεωρητική και πραγματική φόρτωση νανοσωματιδίων (πειράματα **1a** - **1i**)

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται αντίστοιχα η επίδραση των μελετημένων παραμέτρων στο μέγεθος των νανοσωματιδίων.



**Διάγραμμα 19.** Μεγέθη νανοσωματιδίων (πειράματα **1a** - **1i**)

Παρατηρούμε λοιπόν πως οι παράμετροι που εξετάστηκαν δεν επιδρούν με τον ίδιο τρόπο στο μέγεθος και στην ικανότητα εγκλεισμού

των νανοσωματιδίων. Για παράδειγμα, η αύξηση της θερμοκρασίας (**1b**) επηρεάζει αρνητικά τόσο το ποσοστό εγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης **1** όσο και το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων, η επίδρασή της στην ικανότητα εγκλεισμού είναι πολύ σημαντικότερη.

Αντίστοιχα η μεταβολή στην αναλογία οργανικής προς υδατική φάση του γαλακτώματος (**1c**) επιδρά σημαντικά στο ποσοστό εγκλεισμού της ουσίας, ενώ δεν έχει σημαντική επίδραση στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Με αντίθετο τρόπο, όμως, επιδρά η μεταβολή στη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA) (**1d**), όπου δε φαίνεται να επηρεάζεται η ικανότητα εγκλεισμού των σωματιδίων ενώ παράλληλα το μέγεθός τους αυξάνεται σημαντικά.

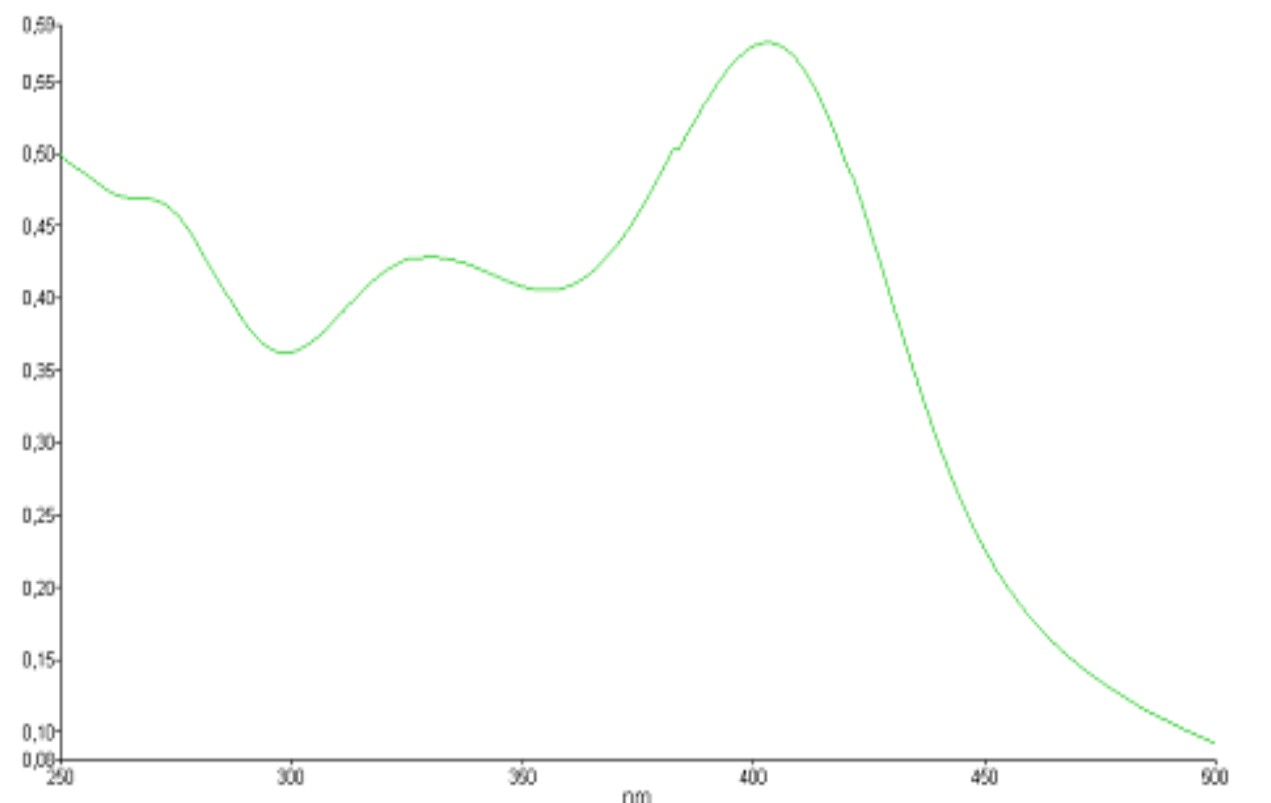
Στο πείραμα **1e** στο οποίο χρησιμοποιήθηκε το PLA<sub>2</sub> παρατηρήθηκε ότι ενώ το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μικρότερο, η απόδοση του εγκλεισμού είναι πολύ μικρή, δηλαδή η πραγματική φόρτωση είναι περίπου στο 8%, από 20% θεωρητική φόρτωση. Αντίστοιχα, με το ακόμη μικρότερου μέσου μοριακού βάρους PLA<sub>3</sub> (**1f**), μειώνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων αλλά η απόδοση του εγκλεισμού αυξάνεται σημαντικά, η πραγματική φόρτωση δηλαδή φτάνει το 18%, με θεωρητική φόρτωση 20%.

Στο πείραμα **1g**, το οποίο συγκρίνουμε με το πείραμα **1f** όπου χρησιμοποιήθηκε πάλι το PLA<sub>3</sub>, παρατηρούμε ότι η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης έχει αρνητικές επιπτώσεις τόσο στην απόδοση του εγκλεισμού, όσο και στο μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων, το οποίο είναι αρκετά μεγάλο.

Τέλος, στα πειράματα αύξησης του ποσοστού φόρτωσης της ουσίας, **1h** και **1i**, παρατηρούμε ότι για 40% θεωρητική φόρτωση ούτε το μέγεθος αλλά ούτε η απόδοση εγκλεισμού των νανοσωματιδίων επηρεάζεται σημαντικά, συγκριτικά με το πείραμα **1a**. Αντίστοιχα, με 60% θεωρητική φόρτωση, η ικανότητα εγκλεισμού αυξάνεται δραματικά, ταυτόχρονα όμως αυξάνεται σημαντικά και το μέγεθος των νανοσωματιδίων.

### 3.2.2.2. Ωρεοσιδίνη

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας εγκλεισμού της ωρεοσιδίνης, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης. Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης, προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (Εικόνα 3.2.2). Αυτό προσδιορίστηκε στα 397,8 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



**Εικόνα 3.6.** Φάσμα ορατού υπεριώδους (UV-Vis) της ωρεοσιδίνης **2**

Για το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις, εκ των οποίων λήφθηκε ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3.9.).

**Πίνακας 3.9.** Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ωρεοσιδίνης (2)

<b>Συγκέντρωση (mg/ml)</b>	<b>Απορρόφηση (A)</b>
<b>0</b>	-0,0001
<b>0,004166</b>	0,3423
<b>0,00625</b>	0,5286
<b>0,0125</b>	1,0557
<b>0,025</b>	2,0428

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.9, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης της ωρεοσιδίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 20).



**Διάγραμμα 20.** Καμπύλη αναφοράς ωρεοσιδίνης (2)

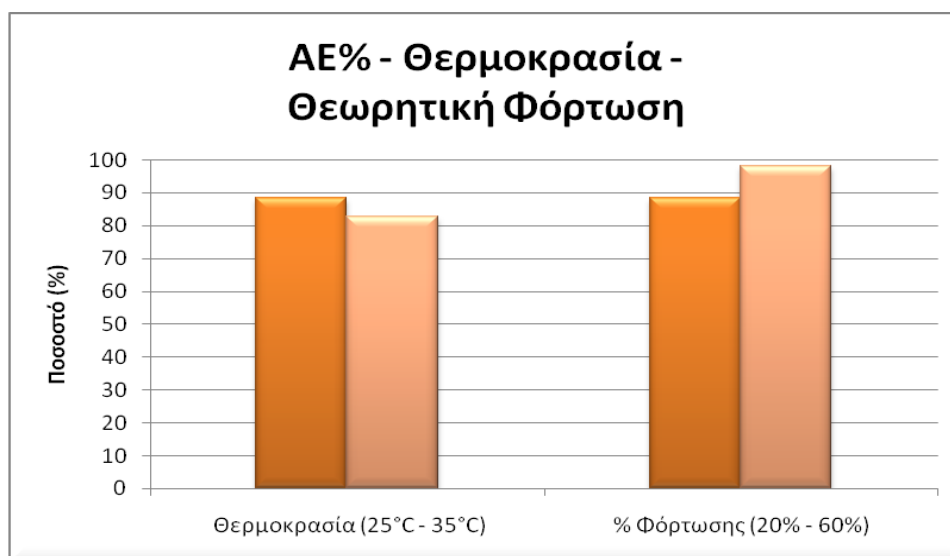
Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ποσότητα της μη εγκλεισμένης ένωσης η οποία βρισκόταν στα υπερκείμενα S1 και S2 των φυγοκεντρήσεων. Συγκεκριμένα, το κάθε υπερκείμενο μετρήθηκε τρεις φορές στα 397,8 nm και ελήφθη ο μέσος όρος των μετρήσεων. Για το υπερκείμενο S1, το οποίο ήταν αρκετά πυκνό, η μέτρηση

πραγματοποιήθηκε σε αραιωμένη τιμή, στο 1/10 της πραγματικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό, προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

**Πίνακας 3.10.** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis ωρεοσιδίνης 2

Δείγμα	% Φόρτωσης	S1		S2		Σύνολο (mg)	Απόδοση (%)
		Απορροφ. (A)	C/10 (mg/ml)	Απορροφ. (A)	C (mg/ml)		
2a	20	0,1961	0,00228	0,047	0,00045	0,3426	89
2b	20	0,2993	0,00354	0,0764	0,00081	0,5153	83
2c	60	0,1091	0,00121	0,1099	0,00122	0,1806	98

Παρατηρούμε ότι η απόδοση των εγκλεισμών είναι αρκετά ικανοποιητική, εφόσον σε κάθε περίπτωση είναι μεγαλύτερη από 80%. Μάλιστα στην περίπτωση όπου η αρχική φόρτωση με ωρεοσιδίνη είναι 60%, η απόδοση του εγκλεισμού αγγίζει το 98%. Στο Διάγραμμα 21 φαίνεται η επίδραση της ανόδο της θερμοκρασίας και της αύξησης του ποσοστού αρχικής φόρτωσης στα νανοσωματίδια στην ικανότητα εγκλεισμού της ωρεοσιδίνης.



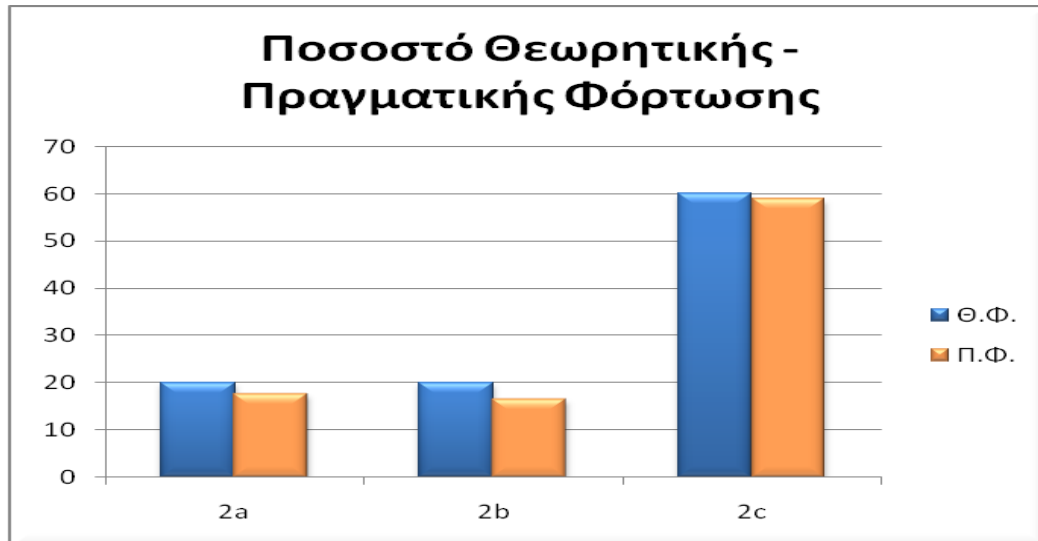
**Διάγραμμα 21.** Επίδραση των εξετασμένων παραγόντων στην απόδοση του εγκλεισμού

Είναι φανερό ότι με την άνοδο της θερμοκρασίας, η ικανότητα εγκλεισμού των νανοσωματιδίων μειώνεται, αλλά η μεταβολή δεν είναι μεγάλη. Αντίθετα, με την αύξηση του ποσοστού αρχικής φόρτωσης, η

απόδοση του εγκλεισμού αυξάνεται σχεδόν κατά 10%, δηλαδή από απόδοση 89%, φτάνει στο 98%. Αυτό το γεγονός είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό, καθώς ο στόχος της τεχνικής του νανοεγκλεισμού είναι να περιέχεται στη νανοκάψουλα όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα της βιοδραστικής ένωσης και ιδιαίτερα σε σχέση με το πολυμερές που την περιβάλλει, το οποίο δεν είναι αξιοποιήσιμο από τον οργανισμό και χρησιμεύει μόνο ως φορέας του φαρμάκου.

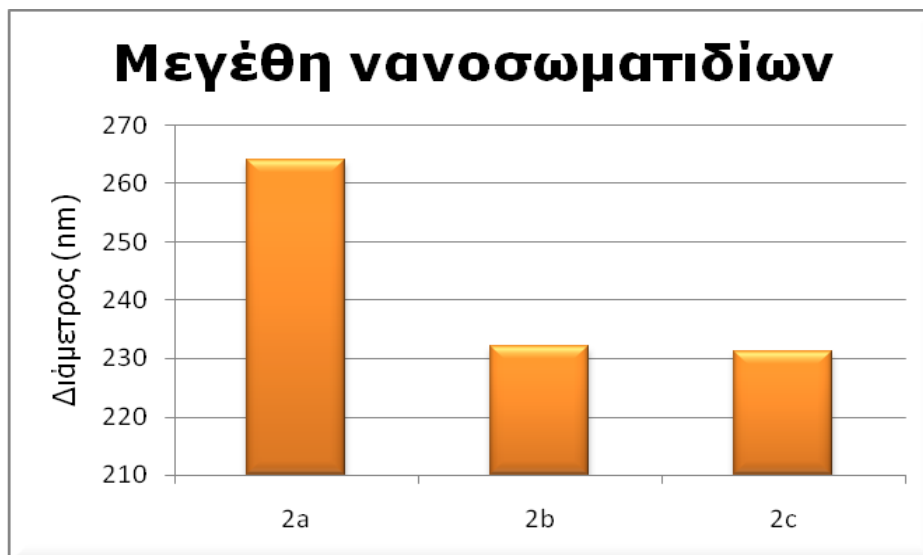
Για τον παραπάνω λόγο λοιπόν θα μπορούσαμε να πούμε ότι το πιο επιτυχημένο πείραμα από πλευράς απόδοσης του εγκλεισμού της ωρεοσιδίνης είναι το πείραμα **2c**, όπου εγκλείστηκε η μέγιστη ποσότητα του ενεργού συστατικού.

Εάν ανάγουμε τις αποδόσεις του εγκλεισμού της ωρεοσιδίνης σε ποσοστά πραγματικής φόρτωσης, ως προς τη μάζα του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα, προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 22.** Θεωρητική και πραγματική φόρτωση νανοσωματιδίων (πειράματα **2a** - **2c**)

Αντίστοιχα, η επίδραση των μελετημένων παραμέτρων στο μέγεθος των νανοσωματιδίων φαίνεται παρακάτω:



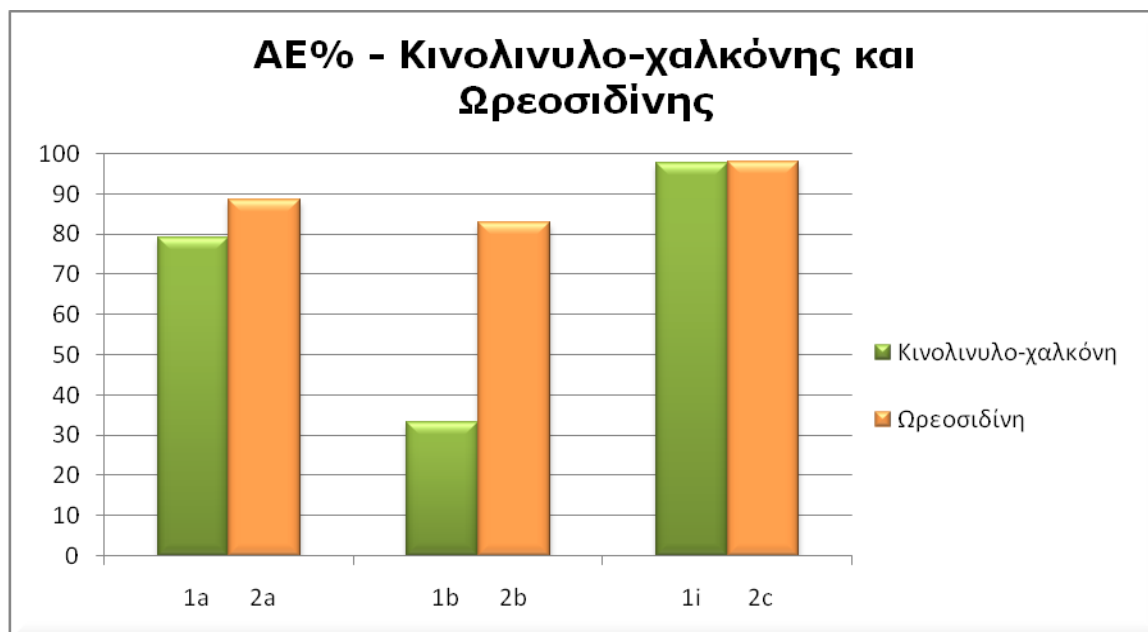
**Διάγραμμα 23.** Μεγέθη νανοσωματιδίων (πειράματα **2a** - **2c**)

Παρατηρούμε λοιπόν ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας (**2b**), μειώνεται η απόδοση του εγκλεισμού, αλλά μειώνεται ταυτόχρονα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων, το οποίο είναι επιθυμητό. Από την άλλη μεριά, με την αύξηση του ποσοστού θεωρητικής φόρτωσης (**2c**), το μέγεθος δεν επηρεάζεται, ενώ η απόδοση του εγκλεισμού είναι εξαιρετική, στο 98%.



### 3.2.2.3. Σύγκριση της ικανότητας εγκλεισμού της κινολινυλο-χαλκόνης και της ωρεοσιδίνης

Στο Διάγραμμα 24 παρουσιάζονται συγκριτικά οι αποδόσεις των εγκλεισμών των δυο ουσιών, για τα πειράματα όπου οι συνθήκες ήταν κοινές.



**Διάγραμμα 24.** Σύγκριση επίδρασης θερμοκρασίας και ποσοστού φόρτωσης στην κινολινυλο-χαλκόνη **1** και την ωρεοσιδίνη **2**

Είναι φανερό ότι η ωρεοσιδίνη έχει σε κάθε περίπτωση πολύ πιο ικανοποιητικές αποδόσεις εγκλεισμού από την κινολινυλο-χαλκόνη. Παρατηρούμε ότι η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος είναι παρόμοια και για τις δυο ενώσεις, με τη διαφορά όμως ότι στην περίπτωση της ωρεοσιδίνης η επίδραση αυτή είναι πολύ μικρότερη απ' ό,τι στην περίπτωση της κινολινυλο-χαλκόνης (**1b**, **2b**). Επίσης με παρόμοιο τρόπο επηρεάζεται η ικανότητα εγκλεισμού από την αύξηση της αρχικής φόρτωσης των νανοσωματιδίων. Ειδικότερα και στις δυο περιπτώσεις (**1i**, **2c**) η απόδοση του εγκλεισμού βελτιώνεται σημαντικά, φτάνοντας στο 98%.

### 3.3. Μελέτη της Σταθερότητας των Νανοσωματιδίων

---

Οι νανοκάψουλες του PLA με τις εγκλεισμένες ενώσεις φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης, στους 4°C, σε γυάλινο φιαλίδιο, σε διασπορά σε περίπου 5 ml απιονισμένου νερού και σε όξινες συνθήκες. Η επανάληψη της μέτρησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων πραγματοποιούνταν για να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους για αποθήκευση σε συντήρηση. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με το μέσο μέγεθος της κάθε παρτίδας νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11.

Παρατηρούμε ότι σε όλα τα δείγματα υπάρχει η τάση μείωσης του μεγέθους τους με την πάροδο του χρόνου, καθώς το PLA που χρησιμοποιήθηκε αρχίζει να υδρολύεται και να διασπάται. Επιπλέον παρατηρείται μια τάση μείωσης του δείκτη πολυδιασποράς των δειγμάτων, δηλαδή τάση αύξησης της ομοιομορφίας του δείγματος.

Την τάση αυτή την αντιλαμβανόμαστε και εάν εξετάσουμε μονομερώς τα δείγματα που παρασκευάστηκαν. Για παράδειγμα, στο τυφλό δείγμα **PLA<sub>1</sub>** (μέσου αριθμού μοριακού βάρους 43.400 g/mol), παρατηρούμε ότι το μέγεθος σε κάθε μέτρηση προκύπτει μικρότερο, όπως και ο δείκτης πολυδιασποράς. Στο διάστημα όμως των 134 ημερών που παρέμεινε σε συνθήκες αποθήκευσης το δείγμα, η μείωση του μεγέθους του ήταν της τάξης του 8%, γεγονός που δείχνει ότι το δείγμα δε μεταβάλλεται σημαντικά.

Αντίθετα, στο δείγμα **PLA<sub>2</sub>** (μέσου αριθμού μοριακού βάρους 27.300 g/mol), αρχικά παρατηρούμε μια μικρή αύξηση του μεγέθους της τάξης του 2%, η τιμή του όμως μετά επανέρχεται σχεδόν στην αρχική. Παράλληλα ο δείκτης πολυδιασποράς του δείγματος αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται σημαντικά. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο δείγμα **PLA<sub>3</sub>** (μέσου αριθμού μοριακού βάρους 16.700 g/mol), όπου το μέγεθος αρχικά αυξάνεται ελαφρώς και στη συνέχεια μειώνεται και ο δείκτης

**Πίνακας 3.11.** Μετρήσεις DLS, για τη σταθερότητα των μεγεθών των δειγμάτων

Δείγμα	Χρόνος Μέτρησης (ημέρες)	Διάμετρος (nm)	PdI
PLA <sub>1</sub>	4	240,8 ± 0,27	0,108 ± 0,25
	94	225,0 ± 0,06	0,070 ± 0,02
	134	218,6 ± 0,07	0,038 ± 0,01
PLA <sub>2</sub>	5	242,4 ± 1,63	0,049 ± 0,02
	7	247,0 ± 1,98	0,090 ± 0,02
	26	241,0 ± 0,14	0,036 ± 0,02
PLA <sub>3</sub>	5	253,6 ± 1,84	0,054 ± 0,01
	7	255,0 ± 2,97	0,047 ± 0,01
	20	246,9 ± 0,92	0,016 ± 0,01
	26	243,8 ± 0,07	0,083 ± 0,02
1a	4	260,3 ± 2,77	0,100 ± 0,02
	36	259,9 ± 1,77	0,089 ± 0,01
	52	252,6 ± 5,45	0,112 ± 0,01
	102	223,7 ± 2,04	0,063 ± 0,01
1b	1	298,6 ± 0,07	0,075 ± 0,03
	5	289,4 ± 3,61	0,084 ± 0,05
	18	283,8 ± 1,98	0,091 ± 0,03
	47	239,4 ± 0,64	0,076 ± 0,01
	59	230,3 ± 2,05	0,062 ± 0,02
1c	3	264,2 ± 0,28	0,076 ± 0,02
	17	246,6 ± 2,62	0,046 ± 0,01
	23	257,3 ± 3,89	0,104 ± 0,01
1d	2	363,3 ± 3,04	0,146 ± 0,04
	14	397,9 ± 3,25	0,253 ± 0,01
	20	326,7 ± 0,28	0,144 ± 0,03
1e	6	230,4 ± 2,97	0,128 ± 0,02
	16	232,3 ± 2,89	0,115 ± 0,01
	21	230,4 ± 1,77	0,124 ± 0,01
1f	5	234,1 ± 3,32	0,097 ± 0,01
	14	255,8 ± 0,64	0,075 ± 0,04
	19	260,6 ± 5,73	0,076 ± 0,04
1g	1	383,6 ± 6,36	0,214 ± 0,01
	7	373,6 ± 0,21	0,244 ± 0,03
	13	271,3 ± 3,52	0,028 ± 0,01
1h	3	248,6 ± 3,25	0,063 ± 0,02
	17	241,8 ± 3,04	0,069 ± 0,03
	23	259,7 ± 2,69	0,087 ± 0,03
1i	2	321,3 ± 2,19	0,126 ± 0,01
	8	287,4 ± 3,32	0,075 ± 0,01
2a	1	264,1 ± 5,52	0,128 ± 0,01
	42	240,8 ± 1,27	0,078 ± 0,01
	58	237,8 ± 0,57	0,087 ± 0,03
2b	4	231,9 ± 8,46	0,120 ± 0,01
	36	225,4 ± 2,12	0,071 ± 0,01
	49	230,6 ± 0,49	0,099 ± 0,03

πολυδιασποράς μειώνεται σταδιακά, ενώ στην τελευταία μέτρηση παρουσιάζεται αυξημένος. Η συμπεριφορά αυτή της αυξομείωσης των τιμών των μεγεθών και του  $rdi$  των δειγμάτων δείχνει ίσως ότι τα δείγματα αυτά έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα.

Στο δείγμα **1a** παρατηρούμε μια συνεχή αλλά αργή πορεία μείωσης του μεγέθους, καθώς σε διάστημα 102 ημερών αποθήκευσης, το μέγεθος του δείγματος παρουσιάζει μια μείωση της τάξης του 14%. Παράλληλα, ο δείκτης ομοιομορφίας του δείγματος παρουσιάζει μια τάση μείωσης, χωρίς όμως η πορεία του να είναι σταθερή.

Με παρόμοιο τρόπο συμπεριφέρεται κατά την αποθήκευση και το δείγμα **1b**. Το μέγεθός του μειώνεται συνεχώς και σημαντικά στο διάστημα των 2 μηνών που εξετάστηκε (μείωση κατά 23%). Ο δείκτης πολυδιασποράς στο αντίστοιχο διάστημα αρχικά αυξάνεται, παρουσιάζει μια μέγιστη τιμή στη μέτρηση των 18 ημερών, αλλά μετά μειώνεται σταδιακά.

Το δείγμα **1c** παρουσιάζει πιο ασταθή συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, ενώ αρχικά μειώνεται σημαντικά τόσο το μέγεθός του όσο και ο δείκτης πολυδιασποράς, στην τρίτη εβδομάδα αποθήκευσης παρουσιάζεται αύξηση του μεγέθους αλλά και τα ανομοιομορφίας του δείγματος. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο σχηματισμό συσσωματωμάτων μεταξύ των νανοσωματιδίων.

Ασταθή συμπεριφορά παρουσιάζει και το δείγμα **1d**, καθώς το μέγεθος των νανοσωματιδίων στις πρώτες δυο εβδομάδες αυξάνεται σημαντικά (κατά 10%) και την τρίτη εβδομάδα βρέθηκε αρκετά μικρότερο. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζει και ο δείκτης πολυδιασποράς, ο οποίος αρχικά παρουσιάζεται αυξημένος και στη συνέχεια επανέρχεται στην αρχική του τιμή, εικόνα η οποία υποδεικνύει την τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων.

Εντυπωσιακή σταθερότητα παρουσιάζει το δείγμα **1e**, όπου η κινολινυλο-χαλκόνη **1** εγκλείστηκε σε  $PLA_2$ . Στις τρεις εβδομάδες αποθήκευσης, δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ούτε στο μέγεθος ούτε στο δείκτη πολυδιασποράς, παραμένει στις αρχικές του τιμές. Αξίζει ίσως να

σημειωθεί ότι το δείγμα αυτό είναι εκείνο που είχε αρχικά παρουσιάσει και τη μέγιστη απόλυτη τιμή δυναμικού επιφανείας, ίση με  $-9,98$  mV, ενδεικτικό δηλαδή μέγιστης σταθερότητας μεταξύ των παρασκευασθέντων δειγμάτων.

Άκρως αντίθετη συμπεριφορά παρουσιάζει το δείγμα **1f**, όπου είχε χρησιμοποιηθεί PLA<sub>3</sub>. Ειδικότερα, παρατηρούμε ότι με τη πάροδο του χρόνου το μέγεθος των νανοσωματιδίων δε μειώνεται, παρά αυξάνεται, δηλαδή σχηματίζονται συσσωματώματα. Παράλληλα ο δείκτης πολυδιασποράς δείχνει ότι η ομοιογένεια του δείγματος αυξάνεται ελαφρώς και στη συνέχεια διατηρείται στο ίδιο επίπεδο.

Μεγάλη αστάθεια επίσης παρουσιάζει και το δείγμα **1g**. Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων της παρτίδας αυτής, με μεγάλη μάλιστα ταχύτητα. Συγκεκριμένα στις δυο εβδομάδες αποθήκευσης, παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους κατά 29%. Παράλληλα ο δείκτης πολυδιασποράς παρουσιάζει τεράστια μείωση, από 0,214 σε 0,028.

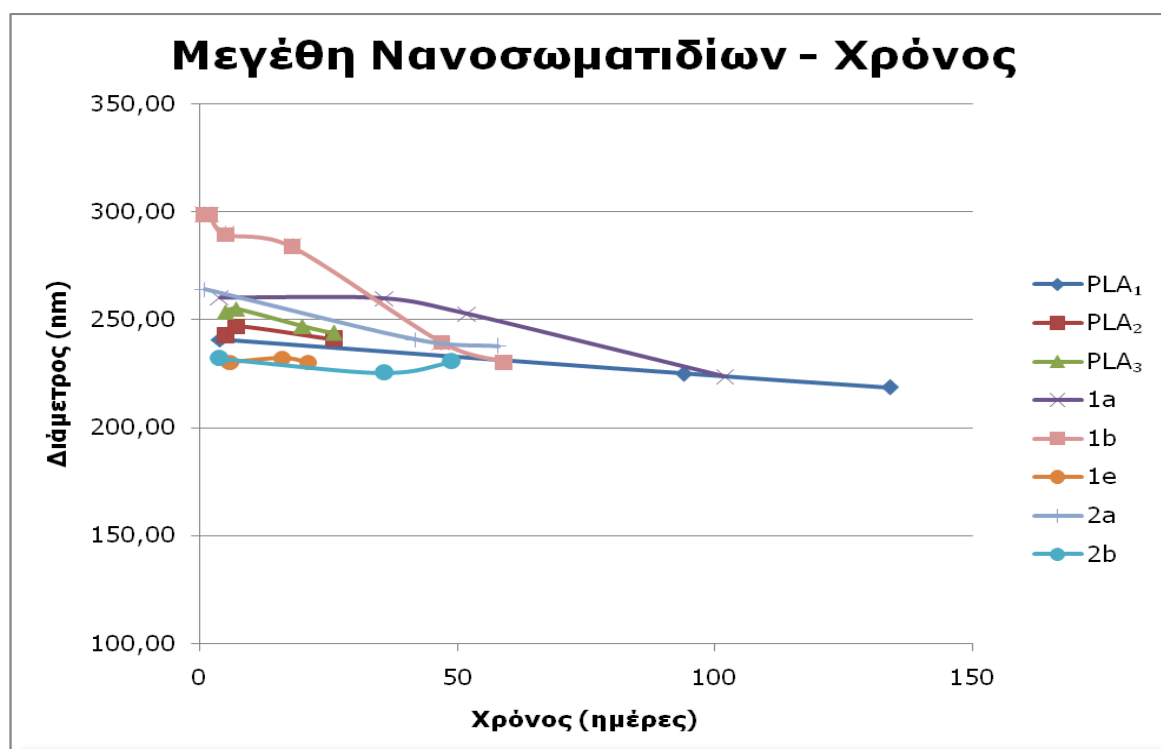
Το δείγμα **1h** παρουσιάζει συμπεριφορά παρόμοια με το δείγμα **1c**, δηλαδή ενώ αρχικά μειώνεται το μέγεθός του κι ο δείκτης πολυδιασποράς δεν επηρεάζεται σημαντικά, στην τρίτη εβδομάδα αποθήκευσης παρουσιάζεται αύξηση του μεγέθους αλλά και τα ανομοιομορφίας του δείγματος. Αυτό πιθανό να οφείλεται στο σχηματισμό συσσωματωμάτων μεταξύ των νανοσωματιδίων, τα οποία όμως απαντώνται σε μικρότερο βαθμό σε αυτό το δείγμα απ' ό,τι στο δείγμα **1c**.

Έντονα ασταθή συμπεριφορά παρουσιάζει και το δείγμα **1i**. Παρατηρούμε ότι μέσα στις πρώτες 8 ημέρες αποθήκευσης το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώθηκε κατά 10%, και παράλληλα ο δείκτης πολυδιασποράς μειώνεται σημαντικά. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η υδρόλυση του PLA του δείγματος πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα.

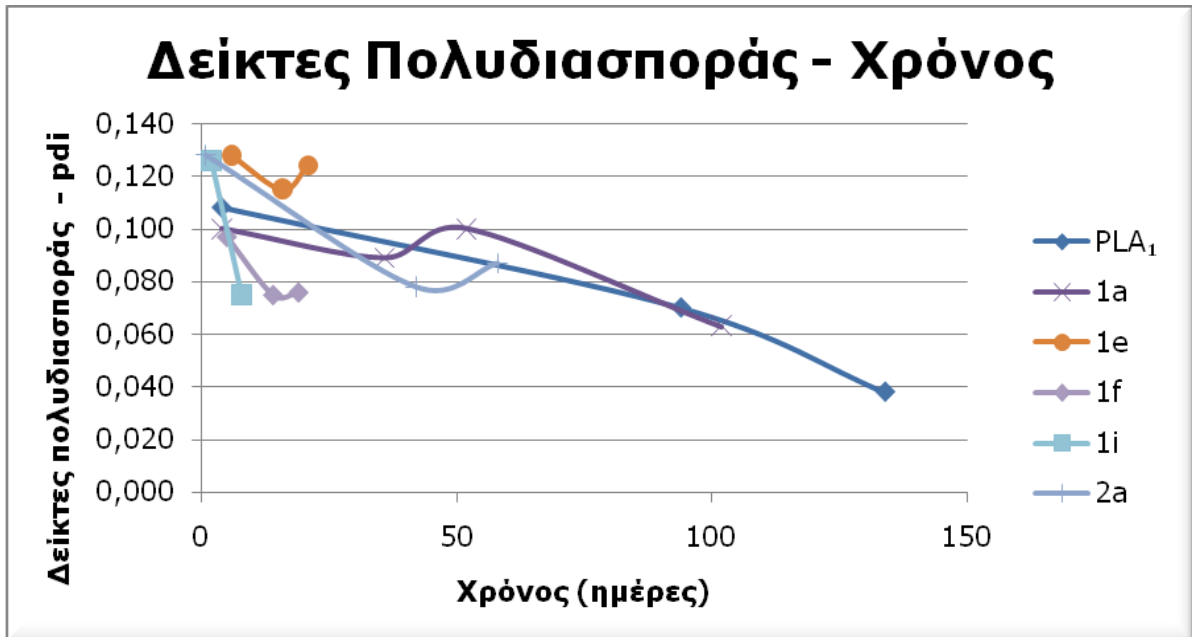
Όσον αφορά στα δείγματα που περιέχουν εγκλεισμένη ωρεοσιδίνη **2**, το δείγμα **2a** παρουσιάζει σταθερή πορεία μείωσης του μεγέθους σε χρονικό διάστημα δυο μηνών. Ειδικότερα, σε διάστημα 42 ημερών η μεταβολή του μεγέθους είναι της τάξης του 8%, ενώ στη συνέχεια μειώνεται ελάχιστα, κατά 1,3%. Αντίστοιχα ο δείκτης πολυδιασποράς αρχικά μειώνεται σημαντικά και στη συνέχεια μεταβάλλεται ελαφρώς.

Τέλος το δείγμα **2b** παρουσιάζει σχετικά καλή σταθερότητα. Σε χρονικό διάστημα 49 ημερών, το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται ελαφρώς (κατά 2%) κι έπειτα βρέθηκε παρόμοιο με το αρχικό. Ταυτόχρονα ο δείκτης πολυδιασποράς αρχικά μειώνεται και στη συνέχεια αυξάνεται ξανά, αλλά σε κάθε μέτρηση παρουσιάζεται μειωμένος, δηλαδή το δείγμα αποκτά μεγαλύτερη ομοιογένεια.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται επιλεγμένα δείγματα, τα οποία έδειξαν παρόμοια και σχετικά σταθερή συμπεριφορά στην αποθήκευσή τους.



**Διάγραμμα 25.** Μεταβολή των μεγεθών των νανοσωματιδίων κατά την αποθήκευσή τους στους 10°C



**Διάγραμμα 26.** Μεταβολή των δεικτών πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων κατά την αποθήκευσή τους στους 10°C

### 3.4. Μελέτη Επαναληψιμότητας της Μεθόδου

Η μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων PLA με την τεχνική γαλακτωματοποίησης – εξάτμισης του οργανικού διαλύτη εφαρμόζεται για πρώτη φορά για τις ουσίες αυτές στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Παρουσιάστηκε λοιπόν η ανάγκη ελέγχου της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν δυο πειράματα τα οποία επαναλήφθηκαν στις ίδιες συνθήκες, με στόχο να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων.

Το πρώτο πείραμα που επαναλήφθηκε είναι το **1b**. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε 20% αρχική φόρτωση της κινολινυλο-χαλκόνης 1 σε PLA<sub>1</sub> και το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια είναι αυτή που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Με όμοιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και το πείραμα **1b'** και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προέκυψαν φαίνονται παρακάτω:

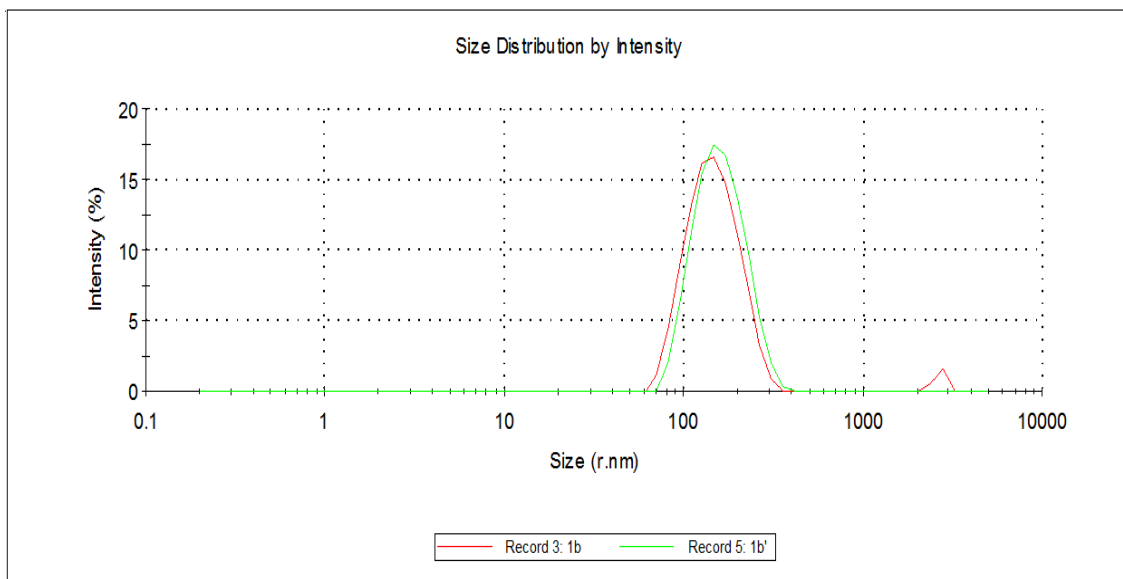
**Πίνακας 3.12.** Χαρακτηριστικά Νανοσωματιδίων (πειράματα **1b** και **1b'**)

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-Δυναμικό (mV)	Απόδοση (%)
<b>1b</b>	298,7 ± 6,79	0,267 ± 0,008	-2,32 ± 0,34	33,17
<b>1b'</b>	298,6 ± 0,07	0,075 ± 0,025	-5,26 ± 0,31	25,35

Παρατηρούμε ότι τα δυο πειράματα οδήγησαν στο σχηματισμό νανοσωματιδίων παρόμοιου μεγέθους (298 nm). Ο δείκτης πολυδιασποράς ωστόσο δεν βρέθηκε σε παρόμοια τιμή, μιας που στη μια περίπτωση το δείγμα φαίνεται ομοιογενές (**1b'**), ενώ στην άλλη ανομοιογενές. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που προέκυψε από τις μετρήσεις των δυο δειγμάτων με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (Διάγραμμα 27), οι κατανομές των μεγεθών των δυο παρτίδων δε φαίνεται να διαφέρουν ιδιαίτερα. Η διαφορά των δεικτών πολυδιασποράς πιθανό να οφείλεται

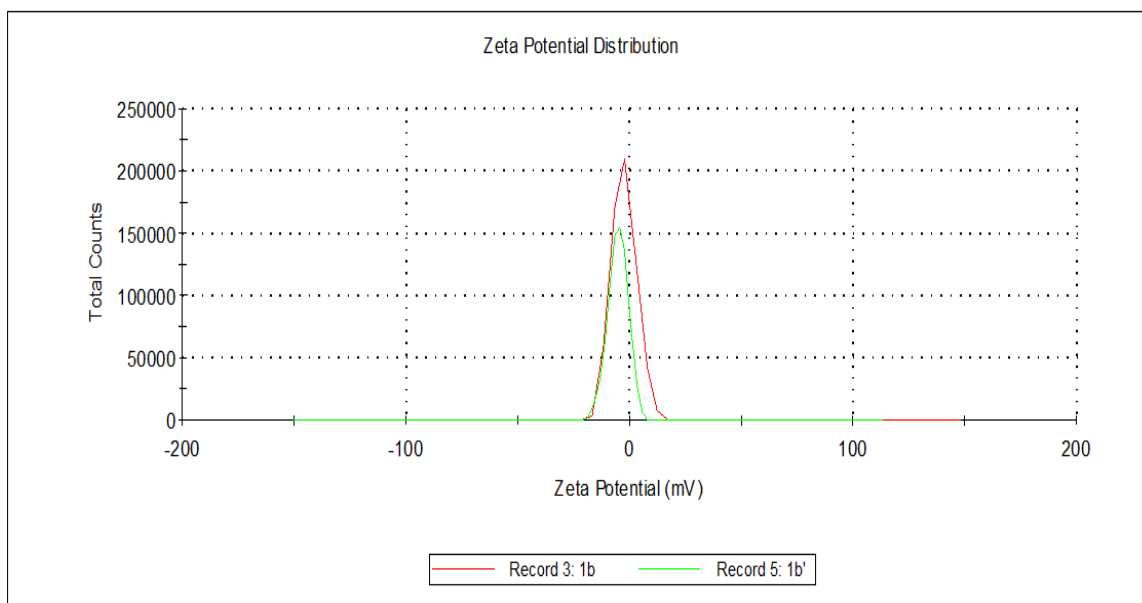


στην παρουσία άλλων σωματιδίων, όπως για παράδειγμα σκόνη, στα 2.000 με 3.000 nm στην περίπτωση του πειράματος **1b**.



**Διάγραμμα 27.** Μετρήσεις DLS, κατανομή μεγεθών (πειράματα **1b** και **1b'**)

Επιπλέον στο Διάγραμμα 28 φαίνονται συγκριτικά οι κατανομές των φορτίων των νανοσωματιδίων, όπως προέκυψαν από μετρήσεις των δυο δειγμάτων με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός.



**Διάγραμμα 28.** Μετρήσεις DLS, κατανομή επιφανειακών φορτίων νανοσωματιδίων (πειράματα **1b** και **1b'**)

Παρατηρούμε ότι και το ζ-δυναμικό που αναπτύχθηκε και στις δυο περιπτώσεις παρουσιάζει παρόμοια κατανομή και η μέση τιμή που προέκυψε από το ένα πείραμα είναι κοντινή με του άλλου. Η μικρή διαφορά που παρουσιάζεται στη μέση τιμή ζ-δυναμικού πιθανό να οφείλεται σε αντίστοιχα μικρή διαφορά στο pH των δυο δειγμάτων που μετρήθηκαν.

Τέλος, όσον αφορά στην απόδοση του εγκλεισμού, οι τιμές είναι ίδιας τάξης μεγέθους, αφού στο πείραμα **1b** βρέθηκε απόδοση ίση με 33% ενώ στο **1b'** ίση με 25% και είναι πολύ μικρότερες, από τις αποδόσεις που προέκυψαν από τα υπόλοιπα πειράματα νανοεγκλεισμού.

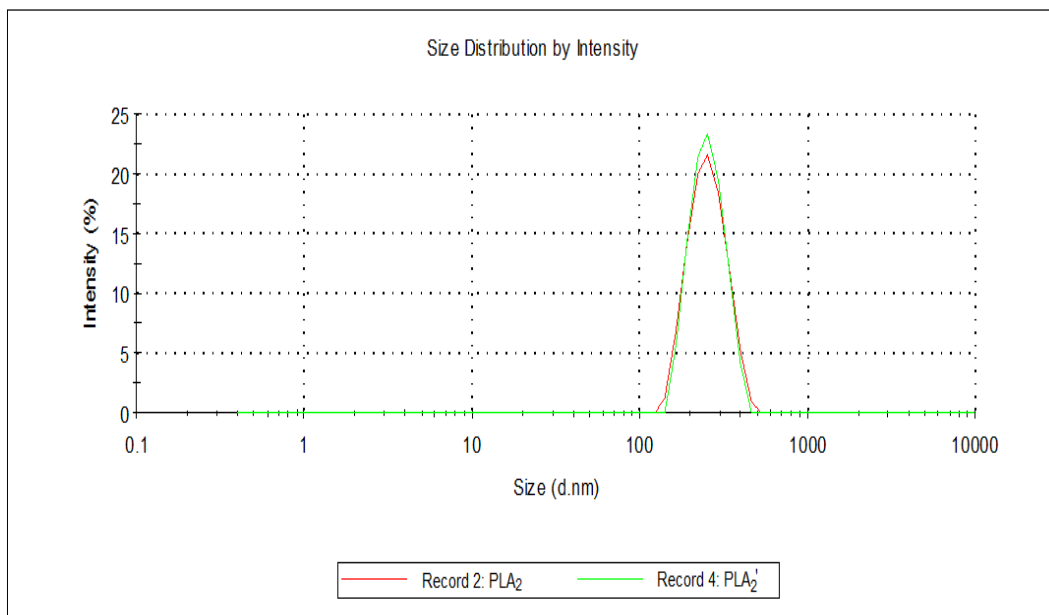
Συνεπώς είναι φανερή και στις δυο περιπτώσεις η επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας σχηματισμού του γαλακτώματος στην απόδοση του εγκλεισμού. Αφ' ενός, το μέγεθος των νανοσωματιδίων βρέθηκε μεγαλύτερο από εκείνο του αντίστοιχου πειράματος που πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25°C (**1a**) και οι τιμές της μέσης διαμέτρου ήταν εξαιρετικά παραπλήσιες, αφ' ετέρου η απόδοση του εγκλεισμού είναι χαμηλότερη και στις δυο περιπτώσεις σε σχέση με το πείραμα **1a** (Πίνακας 3.12).

Το δεύτερο πείραμα που επαναλήφθηκε ήταν αυτό της παρασκευής τυφλού δείγματος νανοσωματιδίων PLA<sub>2</sub>, χωρίς δηλαδή τον εγκλεισμό ουσίας. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προέκυψαν από τα δυο πειράματα (**PLA<sub>2</sub>**, **PLA<sub>2</sub>'**).

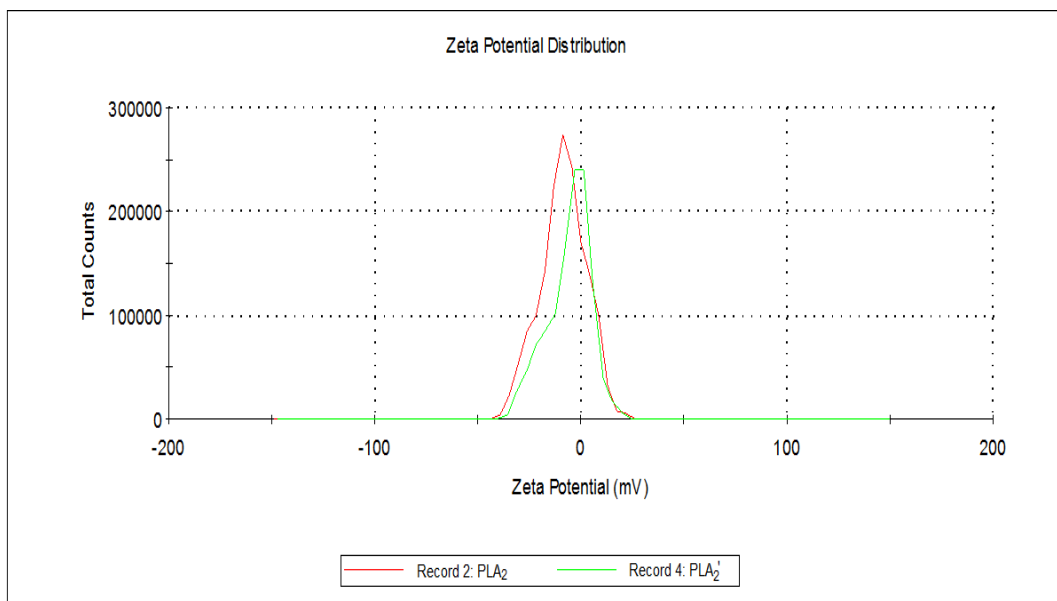
**Πίνακας 3.13.** Χαρακτηριστικά Νανοσωματιδίων (πειράματα **PLA<sub>2</sub>** και **PLA<sub>2</sub>'**)

Δείγμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-Δυναμικό (mV)
<b>PLA<sub>2</sub></b>	242,4 ± 1,63	0,049 ± 0,016	-7,82 ± 0,79
<b>PLA<sub>2</sub>'</b>	246,3 ± 2,69	0,025 ± 0,031	-5,14 ± 0,37

Παρατηρούμε ότι και σε αυτή την περίπτωση οι τιμές που προέκυψαν ως μέσες τιμές διαμέτρου των νανοσωματιδίων και δυναμικού επιφανείας είναι αρκετά παρόμοιες. Επιπλέον, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι και στα δυο πειράματα ενδεικτικός μεγάλης ομοιογένειας στο δείγμα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα κατανομής των μεγεθών και των επιφανειακών φορτίων που αναπτύσσονται στα νανοσωματίδια, όπως προέκυψαν από μετρήσεις με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός.



**Διάγραμμα 29.** Μετρήσεις DLS, κατανομή μεγεθών (πειράματα **PLA<sub>2</sub>** και **PLA<sub>2</sub>'**)



**Διάγραμμα 30.** Μετρήσεις DLS, κατανομή επιφανειακών φορτίων (πειράματα **PLA<sub>2</sub>** και **PLA<sub>2</sub>'**)

Παρατηρούμε λοιπόν ότι και στα δυο πειράματα (**PLA<sub>2</sub>** και **PLA<sub>2</sub>'**) οι κατανομές των μεγεθών και των δυναμικών που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι παρόμοιες.

Συνεπώς θα λέγαμε ότι η μέθοδος έχει ικανοποιητική επαναληψιμότητα, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων, την ομοιογένεια του δείγματος και το ζ-δυναμικό που αναπτύσσεται.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Σημαντικό μέρος της έρευνας που διεξάγεται σήμερα σχετικά με τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων βιοδραστικών μορίων, έχει ως στόχο την ανάπτυξη νέων μεθόδων μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery), συμπεριλαμβανομένων των τεχνικών εγκλεισμού μορίων σε νανοσωματίδια. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός σε νανοσωματίδια πολυμερούς δυο μορίων, με αξιόλογη αντιπαρασιτική, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση.

Καταρχήν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των δυο ενώσεων κι έπειτα ο εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια PLA, σύμφωνα με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, η οποία ενδείκνυται για υδρόφοβες ουσίες. Στόχος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των παραγόντων της διεργασίας στα χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων και στην απόδοση του εγκλεισμού (encapsulation efficiency) των ενώσεων, έτσι ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα διαλυτότητας των ενώσεων *in vivo* και κυτταροτοξικότητάς τους.

Τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν στις διάφορες συνθήκες είχαν μέσο μέγεθος μεταξύ 230 και 390 nm, με την πλειοψηφία των πειραμάτων να κυμαίνεται μεταξύ 230 και 270 nm.

Το μέγεθος φάνηκε να επηρεάζουν οι εξής παράγοντες:

1) η αύξηση της θερμοκρασίας κατά το σχηματισμό γαλακτώματος, η οποία πιθανό να οδήγησε στην ταχύτερη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοσωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους.

2) η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή (PVA) σε 5%, καθώς και η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης: οδήγησαν σε μεγάλο μέσο μέγεθος, πιθανότατα λόγω σχηματισμού συσσωματωμάτων και στις δυο περιπτώσεις.

3) το ποσοστό φόρτωσης της δραστικής ουσίας: όταν πραγματοποιήθηκε φόρτωση 60% σε κινολινυλο-χαλκόνη **1**, παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους.

4) το μοριακό βάρος του PLA: με ελάττωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους από 43.400 g/mol σε 16.700 g/mol οδήγησε αντίστοιχα στο σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους.

Αντίστοιχα το εύρος των τιμών του δείκτη πολυδιασποράς δείχνει ομοιογένεια στα περισσότερα παρασκευασθέντα δείγματα, ενώ αρνητικά επιδρούν και πάλι η αύξηση της θερμοκρασίας και του ρυθμού ανάδευσης του γαλακτώματος.

Τέλος το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων κυμάνθηκε μεταξύ -1 και -10 mV, τιμές οι οποίες δε δείχνουν μεγάλες διαφορές στη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Ιδιαίτερα σταθερή δομή (-10mV) έδειξαν τα νανοσωματίδια όπου χρησιμοποιήθηκε PLA μεσαίου μέσου μοριακού βάρους.

Για την κινολινυλο-χαλκόνη **1**, οι αποδόσεις των εγκλεισμών ήταν ικανοποιητικές, δηλαδή στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερες από 70%. Η αύξηση όμως της θερμοκρασίας, η μείωση της αναλογίας οργανικής προς υδατική φάση και η χρήση PLA μεσαίου μέσου μοριακού βάρους φάνηκαν να μειώνουν σημαντικά την απόδοση του εγκλεισμού. Από την άλλη για την ωρεοσιδίνη **2**, οι αποδόσεις ήταν εξαιρετικές, σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερες από 80% και η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας ήταν μικρότερη.

Οι μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων επαναλήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με σκοπό να μελετηθεί η σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία 4°C, φύλαξη σε γυάλινο φιαλίδιο, διεσπαρμένα σε νερό). Βρέθηκε πως τα νανοσωματίδια είτε σχημάτιζαν συσσωματώματα είτε πως το μέγεθός τους μειωνόταν με την πάροδο του χρόνου (κατά μέσο όρο τρεις εβδομάδες).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

---

Η ανάπτυξη νανοσωματιδιακών μορφών χορήγησης βιοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ιδιαίτερα για τις βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Διευρύνοντας το φάσμα που ερευνήθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, οδηγούμαστε σύμφωνα με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κάποιες προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

### Έλεγχος βελτίωσης των ιδιοτήτων των εγκλεισμένων ενώσεων

Μελέτη της βιολογικής δράσης (αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική, αντικαρκινική) των νανοσωματιδίων που περιέχουν τις εγκλεισμένες ουσίες.

Διερεύνηση της διαλυτότητας των νανοσωματιδίων που περιέχουν τις εγκλεισμένες ουσίες σε νερό και σε κοινούς οργανικούς διαλύτες.

### Αποδέσμευση εγκλεισμένων ενώσεων

Μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης των εγκλεισμένων βιομορίων από τα νανοσωματίδια του PLA. Για παράδειγμα, η μελέτη της αποδέσμευσής τους σε υδατικό διάλυμα με κατάλληλο pH ( $\approx 7,3$ ) θα αποτελούσε αξιόπιστη ένδειξη για την αποδέσμευσή τους *in vivo*.

### Δυνατότητα μορφοποίησης νανοσωματιδίων

Διερεύνηση της δυνατότητας μορφοποίησης των νανοσωματιδίων σε μορφή υμενίου (φιλμ) για τον έλεγχο της σταθερότητας της δομής τους για χρήσεις όπως στη συσκευασία τροφίμων.

### Χρήση άλλων βιοδιασπώμενων πολυμερών ή/και γαλακτωματοποιητών

Πιθανώς η χρήση διαφορετικών υλικών στη διεργασία να οδηγούσε σε διαφορετικού τύπου νανοσωματίδια. Για παράδειγμα, εκτός από το PLA, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα άλλο πολυμερές ή κάποιο

συμπολυμερές, όπως πολυ(γαλακτικό - γλυκολικό οξύ) (PLGA) ή ακόμη να πραγματοποιηθεί επικάλυψη των νανοσωματιδίων, όπως για παράδειγμα με πολυ(αιθυλενο γλυκόλη) (PEG).

#### Παραλλαγές της μεθόδου σχηματισμού και παραλαβής νανοσωματιδίων

Εφόσον από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη θερμοκρασία κατά το σχηματισμό γαλακτώματος οδηγεί σε νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους και μεγαλύτερου δείκτη πολυδιασποράς, προτείνεται η μελέτη της επίδρασης χαμηλότερης θερμοκρασίας, ίσως και κατά την εξάτμιση του διαλύτη (στο shaker), με στόχο νανοσωματίδια μικρότερου μεγέθους και με μεγαλύτερη ομοιογένεια. Ακόμη, θα μπορούσε να μελετηθεί η εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση.

Στο ίδιο πλαίσιο, προτείνεται μια πιθανή παραλλαγή της μεθόδου, με φυγοκέντρηση των νανοσωματιδίων σε ακόμη μεγαλύτερες στροφές με στόχο την καταβύθιση ακόμη μικρότερων νανοσωματιδίων και να μειωθεί ο μέσος όρος της διαμέτρου της κάθε παρτίδας.

#### Μελέτη των συνθηκών αποθήκευσης

Από τα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η αποθήκευση των νανοσωματιδίων σε διασπορά σε 5 ml απιονισμένου νερού μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Προτείνεται λοιπόν η διερεύνηση των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση στις προαναφερθείσες συνθήκες, για να εξακριβωθεί το εάν συμβαίνει υδρόλυση του πολυμερούς και διαρροή του περιεχόμενου συστατικού στο διάλυμα.

Επίσης, με στόχο τη σταθερότερη συμπεριφορά κατά την αποθήκευση, προτείνεται η λυοφιλοποίηση των δειγμάτων και έπειτα η διασπορά τους σε απιονισμένο νερό, όπως δηλαδή έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλες έρευνες [47],[48]. Εναλλακτικά, προτείνεται η διασπορά τους σε μεγαλύτερη ποσότητα νερού, έτσι ώστε το pH να τείνει προς ουδέτερο.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] K. J. Morrow, R. Bawa, C. Wei, "Recent Advances in Basic and Clinical Nanomedicine" *Med. Clin. N. Am.* **2007**, 91 (5), 805-843.
- [2] Thomas Kissel, Sascha Maretschek, Claudia Packhäuser, Julia Schnieders, and Nina Seidel, "Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry", in "Microencapsulation Methods and Industrial Applications", Second Edition, ed. Simon Benita, CRC Press, Boca Raton, New York, USA, **2006**, 99-118
- [3] Finch A. C., Bodmeier R., "Microencapsulation", in Elvers B., Hawkins S., Schulz G., "Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry", VCH, Weinheim, **1990**, A16, 575-588
- [4] Kumari A, Kumar Yadav S., Yadav SC, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75, 1-18
- [5] Fritz Ullmann, Matthias Bohet, "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Wiley - VCH, **2005**, 23, 157-172
- [6] Chien Y. W., "Concepts and System Design for Rate-Controlled Drug Delivery" *Novel Drug Delivery Systems 2<sup>nd</sup> ed.* **1992**, 1-38
- [7] Mody V., Cox A., Shah S., Singh A., Bevins W., Parihar H., "Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor", *Applied Nanoscience*, **2013**, DOI:10.1007/s13204-013-0216-y
- [8] Panyam J., Labhasetwar V., "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advance Drug Delivery Reviews*, **2003**, 55 (3), 329-347
- [9] Rieux A.D., Fieveza V., Garinota M., Schneiderb Y.-J., Préata V., "Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach", *Journal of Controlled Release*, **2006**, 116 (1), 1-27
- [10] Jamileh M. Lakkis (ed.), "Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems", Blackwell Publishing, Iowa, USA, **2007**
- [11] Zambaux M.F., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E., Vigneron C., "Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles", *Journal of Controlled Release* **1999**, 60 (2-3), 179-188

- [12] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE., "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices" *Journal of Controlled Release* **2001**, 70 (1-2), 1-20
- [13] C. Pinto Reis, Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" *Nanomedicine 2* **2006**, 8-21
- [14] Kumari A., Kumar V., Yadav S.K., "Plant Extract Synthesized PLA Nanoparticles for Controlled and Sustained Release of Quercetin: A Green Approach" *PLoS ONE* **2012** 7(7): e41230. doi:10.1371/journal.pone.0041230
- [15] Gurny, R., Peppas, N.A., Harrington, D.D. and Banker, G.S., "Development of Biodegradable and Injectable Latices for Controlled Release of Potent Drugs" *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1981**, 7, 1, 1-25
- [16] Li M., Rouaud O. Poncelet D., "Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches" *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 363, 26-39
- [17] Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ng, N.P., "Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method" *Biomaterials* **2001**, 22, 231-241
- [18] Patel H.M., "Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis" *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **1992**, 9, 39-90
- [19] Moghimi, S.M., Davis, S.S. "Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection" *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **1994**, 11, 31-59
- [20] Moghimi, S.M., Porter, C.J.H., Muir, I.S., Illum, L., Davis, S.S. "Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: Influence of particle size and hydrophilic coating" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, 177, 861-866
- [21] Xiao R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M., "Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles" *International Journal of Nanomedicine* **2010**, 5, 1057-1065
- [22] Hunter, R.J., In: Zeta Potential in Colloid Science: principles and applications, Academic Press, London, **1981**

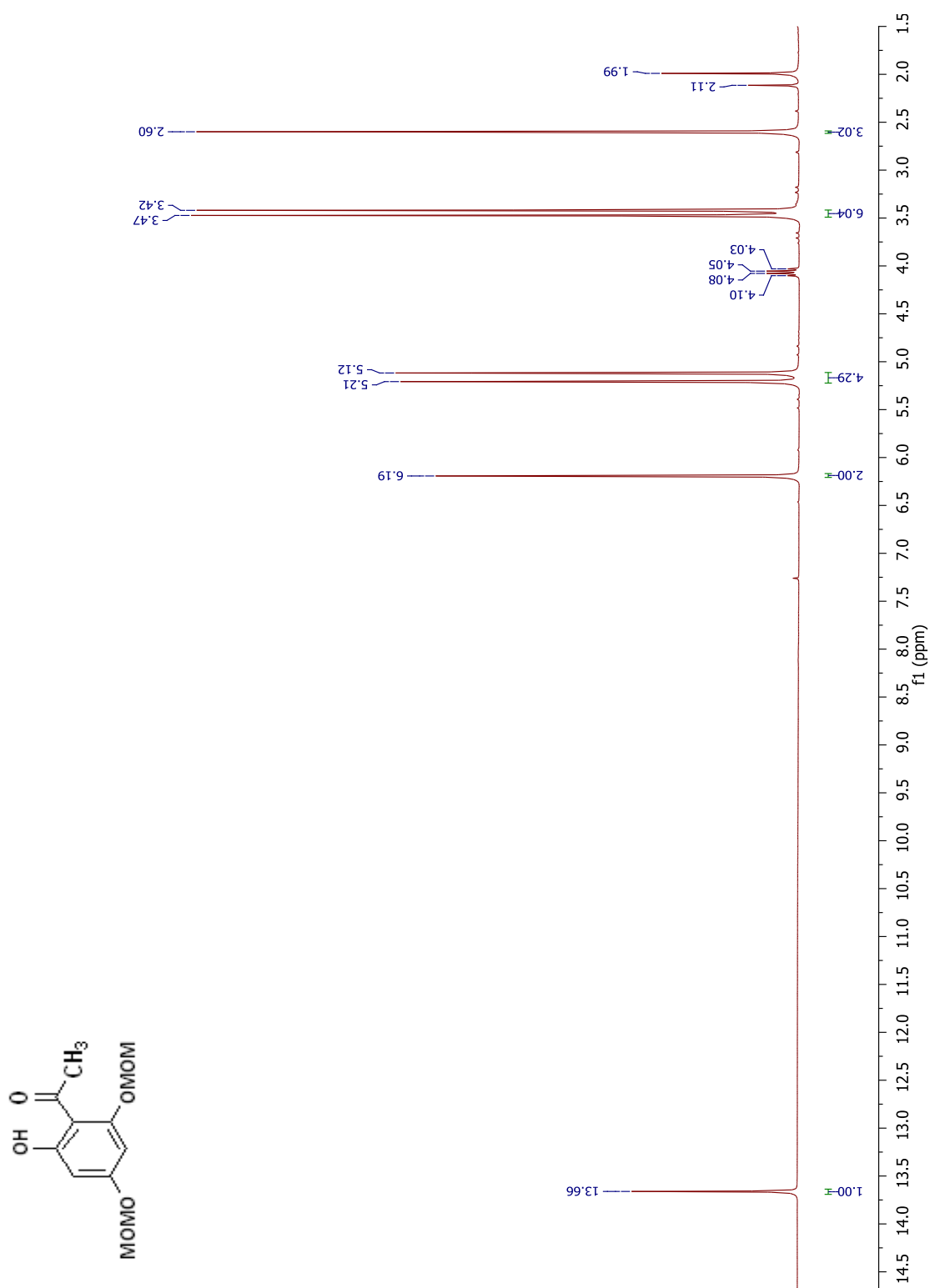
- [23] Shenoy D.B., Amiji M.M., "Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer" *International Journal of Pharmaceuticals* **2005**, 293 (1-2), 261-270
- [24] Aponte J.C., Verastegui M., Malaga E., Zimic M., Quiliano M., Vaisberg A.J., Gilman R.H., Hammond G.B., "Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-Trypanosomacruzi Activity of New Chalcones" *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 6230-6234
- [25] Detsi A., Majdalani M., Kontogiorgis C. A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P., "Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 8073-8085
- [26] Gurjar M. K., Sharma G. V. M., Ilangovan A., Narayanan V., "Dipyranoquinolinones useful as anti viral agents and a process for preparing the same" U.S. Patent 6 191 279, **2001**
- [27] Shogaki T., Toyoda H., Kakita T., Furukawa M., Nakatsugi S., Masai E., Yashima T., Ueda I., "Carbostyryl derivatives and antiallergic agent". *Sawai Seiyaku Jan*, 5 **1994**: EP0577325
- [28] Detsi A., Bouloumbasi D., Prousis K.C., Koufaki M., Athanasellis G., Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D.J., "Design and synthesis of novel quinolinone-3-aminoamides and their  $\alpha$ -lipoic acid adducts as antioxidant and antiinflammatory agents" *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 2450
- [29] K. Prousis, M. Roussaki, B. Hall, S. Wilkinson, S. Costa Lima, A. Cordeiro da Silva, A. Detsi, 12<sup>th</sup> Drug Design & Development Seminar (DDDS) of the DGP Joint meeting with COST Action CM0801 and SFB 544, 17-19 March **2011**, Heidelberg, Germany
- [30] Μ. Ρουσσάκη, "Νέα υβριδικά βιοδραστικά ανάλογα κινολινυλο-χαλκονών με αντιπαρασιτική δράση", Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Συνθετικής Φαρμακευτικής Χημείας, Αθήνα, **2011**
- [31] Huang H.-Q., Li H.-L., Tang J., Lv Y.-F., Zhang, W.-D., *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, 36, 590

- [32] Ur-Rahman A., Choudhary, M.I., Hayat, S., Khan, A.M., Ahmed, A., "Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variabile*" *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2001**, 49, 105
- [33] Sim H.-M., Lee C.-Y., Ee P. L. R., Go M.-L., "Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein)" *European journal of pharmaceutical sciences* **2008**, 35, 293–306
- [34] Souard F, Okombi S., "1-Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 5724-5731
- [35] Roussaki M., Costa Lima S., Kypreou A.-M., Kefalas P., Cordeiro da Silva A., Detsi A., "Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents" *International Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, Article ID 196921, doi:10.1155/2012/196921
- [36] Bandgar BP, Patil SA., "Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents" *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 45, 3223-3227
- [37] Cheng H, Zhang L., "Design, synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines" *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 45, 5950-5957
- [38] Hadjeri M, Barbier M., "Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues" *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, 2125-2131
- [39] Schoepfer J, Fretz H., "Structure-based design and synthesis of 2-benzylidene-benzofuran-3-ones as flavopiridol mimics" *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 1741-1747
- [40] Ono E, Fukuchi-Mizutani M., "Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 11075-11080
- [41] Nishihara M, Nakatsuka T., "Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants" *Biotechnology Letters* **2011**, 33, 433-441
- [42] Tanaka Y, Katsumoto Y., "Genetic engineering in floriculture" *Journal of Plant Biotechnology* **2005**, 80, 1-24

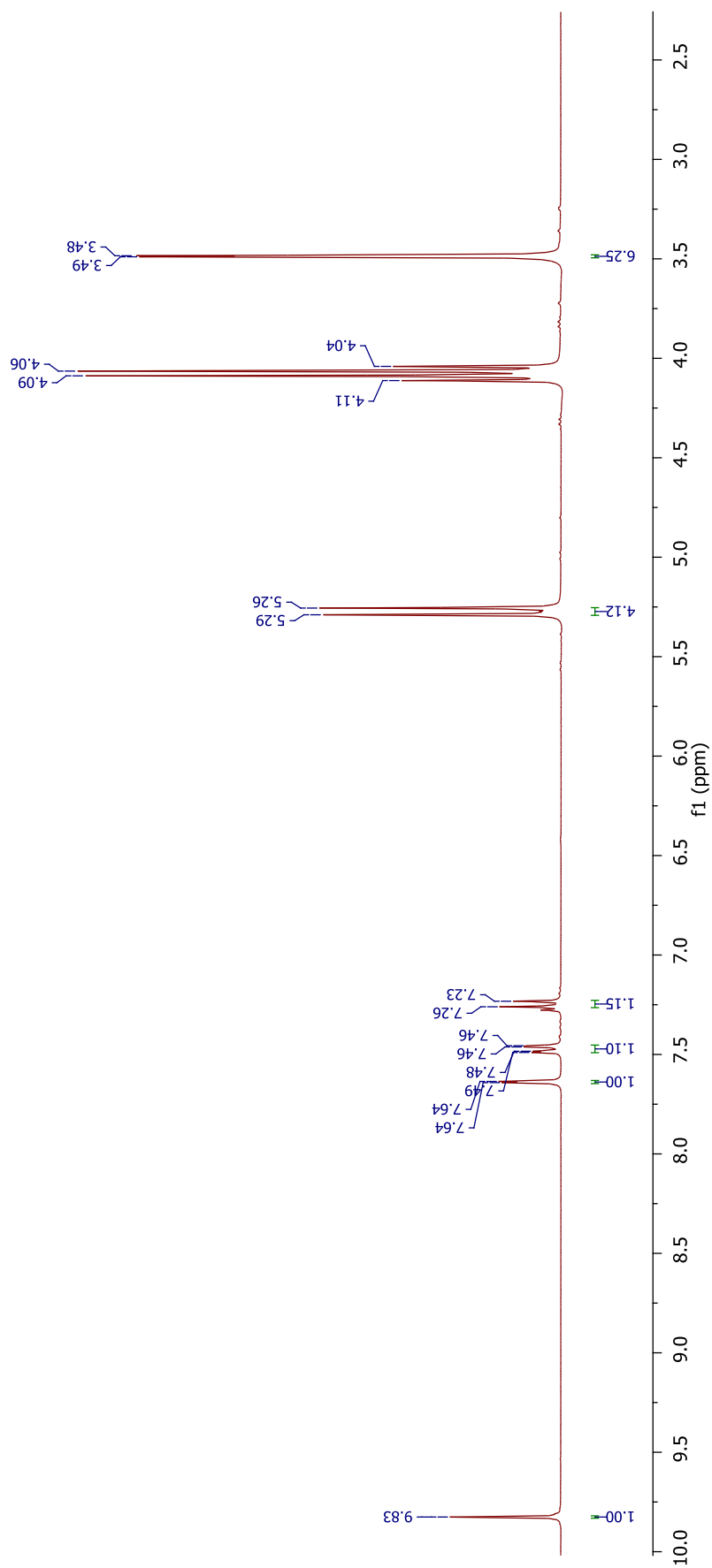
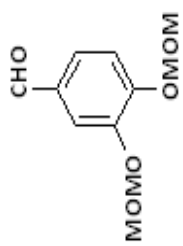
- [43] Shanker N, Dilek O., "Aurones: Small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules" *Journal of Fluorescence* **2011**, 6, 2173-2184
- [44] Boumendjel, A., "Aurones: a subclass of flavones with promising biological potential" *Current Medicinal Chemistry* **2003**, 10, 2621-2630
- [45] Morimoto M., Fukumoto H., Nozoe T., Hagiwara A., Komai K. J., "Synthesis and Insect Antifeedant Activity of Aurones against *Spodoptera litura* Larvae" *Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 700
- [46] McMurry J., "Οργανική Χημεία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Πέμπτη Έκδοση, **2007**, 463-464, 687, 925-926
- [47] Thasneem Y.M., Sajeesh S., Sharma Chandra P., "Glucosylated polymeric nanoparticles: A sweetened approach against blood compatibility paradox" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 108, 337-344
- [48] Musumecia T., Ventura C.A., Giannone I., Ruozi B., Montenegro L., Pignatello R., Puglisi G., "PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel" *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 325, 172-179

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

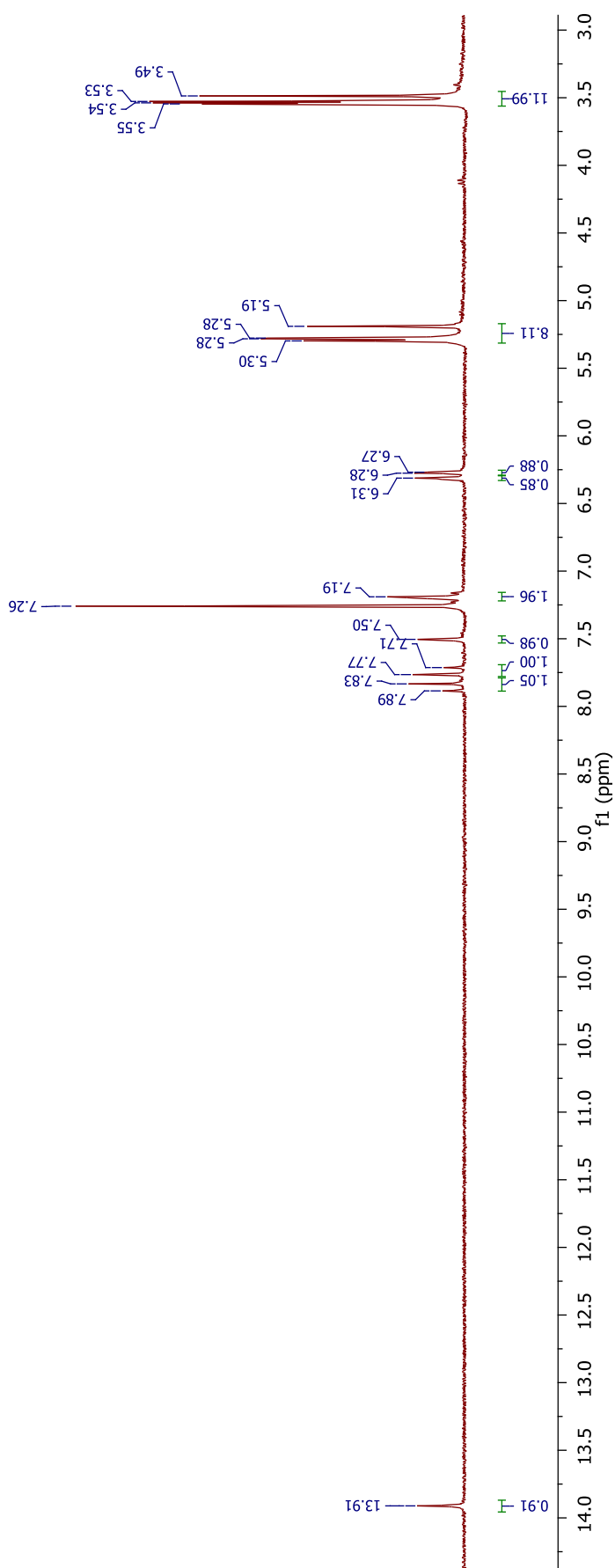
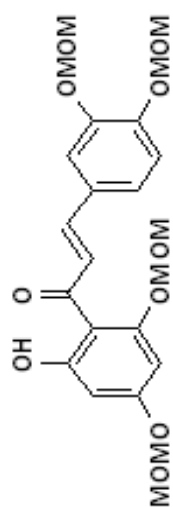
## ΦΑΣΜΑΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ



Εικόνα Π.1. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) της ένωσης **5a**

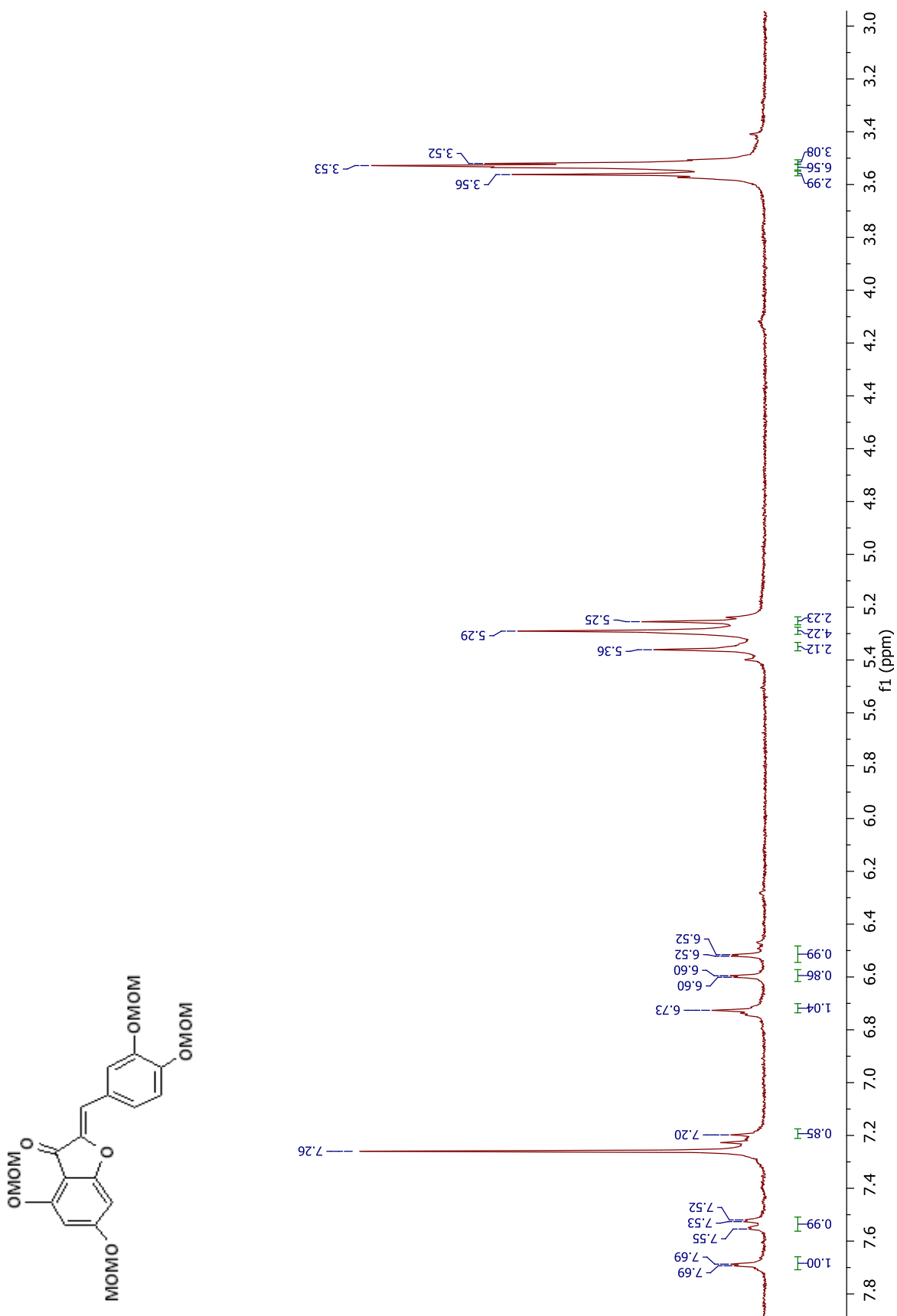


Εικόνα Π.2. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης **6a**



Εικόνα Π.3. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης 7





**Εικόνα Π.4.** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της ένωσης **8**