

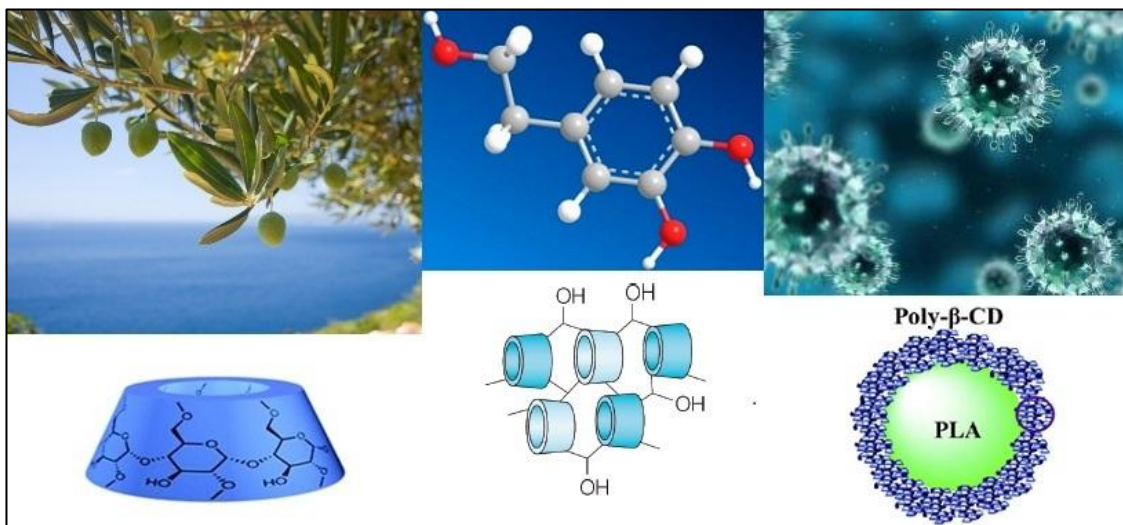


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας Χημικών Επιστημών

ΖΩΗ ΣΚΟΥΛΛΟΥ

"Μελέτη εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος). Σύνθεση και χαρακτηρισμός διασταυρωμένου πολυμερούς ΕΡ-β-CD για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων"

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση - Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΜΠ

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας
ΑΘΗΝΑ 2015

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τομέα Ι Χημικών Επιστημών της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. κατά το χρονικό διάστημα 2014-2015.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε αυτούς που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας με οποιονδήποτε τρόπο. Συγκεκριμένα:

- ❖ Την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Αναστασία Δέτση , Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, την οποία και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ομάδα της και να δουλέψω υπό την καθοδήγηση της.
- ❖ Την Δρ. Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ουσιώδη καθοδήγηση και βοήθεια που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.
- ❖ Την Ελένη Καβέτσου, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για την επιμέλεια των κειμένων καθώς και για την συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.
- ❖ Την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την βοήθεια και συνεργασία της στο εργαστήριο. Επίσης , τον Δρ. Δημήτριος Κορρές για την άψογη συνεργασία και για την βοήθεια του στη λήψη και αποτίμηση των φασμάτων DSC και TGA.
- ❖ Τους συμφοιτητές και συμφοιτήτριες μου για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί, όπως και τους φίλους μου Δέσποινα, Πέτρο, Νικολέτα και Μαργαρίτα για τη στήριξη και συμπαράσταση τους κατά τη διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής.
- ❖ Την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή και καθοδήγηση τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μόριο της υδροξυτυροσόλης (HT) ανήκει στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα συστατικά, μαζί με την τυροσόλη και την ελαιοευρωπείνη, που υπάρχουν στον καρπό και στο φύλλο της ελιάς και στο ελαιόλαδο. Λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδης, αντιβακτηριδιακή, αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση.

Η υδροξυτυροσόλη είναι μια ένωση που εμφανίζει ευαισθησία στον αέρα και στο φως, καθώς μπορεί εύκολα να αποικοδομηθεί και να μετατραπεί σε μη επιθυμητά αδρανή παράγωγα. Κατ' επέκταση, ο εγκλεισμός της σε πολυμερικά νανοσωματίδια θεωρείται αναγκαία για την προστασία της.

Η χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων για τον εγκλεισμό βιοδραστικών μορίων εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον χώρο της φαρμακευτικής και κοσμητικής βιομηχανίας. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η ικανότητα να βελτιώνουν την σταθερότητα των δραστικών ουσιών και η βιοσυμβατότητα που εμφανίζουν με τους ιστούς και τα κύτταρα, αποδεικνύουν την χρησιμότητα τους στη βιομηχανία.

Ένα από τα προβλήματα που παρουσιάζεται με τη χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων, είναι η τάση τους να εμφανίζουν το φαινόμενο της απότομης αποδέσμευσης του φάρμακου (Initial drug release-burst effect). Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, έχει προταθεί η χρήση του πολυμερούς της κυκλοδεξτρίνης ως μέσο επικάλυψης στα νανοσωματίδια. Οι κυκλοδεξτρίνες διαθέτουν μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια, η οποία συμβάλλει στην διαλυτότητα του μορίου στο νερό και μια σχετικά υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα που μπορεί ενσωματώνει μη πολικές ενώσεις.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος). Επιπλέον, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του διασταυρωμένου πολυμερούς της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης μέσω δυο αντιδράσεων. Για τον εγκλεισμό της ουσίας χρησιμοποιήθηκε η εμπορική HT. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη. Η τεχνική του εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε και για την παρασκευή κενών νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια που πάρθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη διασποράς και το ζ-δυναμικό, με χρήση της μεθόδου της Δυναμικής σκέδασης Φωτός (DLS). Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε έμμεσα η απόδοση εγκλεισμού της HT στα νανοσωματίδια μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-vis).

Παράλληλα, έλαβε μέρος η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του διασταυρωμένου πολυμερούς EP-β-CD. Συγκεκριμένα, η σύνθεση πραγματοποιήθηκε αλλάζοντας τις βασικές συνθήκες της διεργασίας. Τα δείγματα που παρασκευαστήκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομική

μονάδα, της θερμικές ιδιότητες και το μοριακό βάρος τους. Για την μελέτη της δομικής μονάδας πραγματοποιήθηκε η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) σε συνδυασμό με την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και την Φασματοσκοπία FT-IR. Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους και των θερμικών ιδιοτήτων έγινε με χρήση της ιζωδομετρίας διαλύματος και με την ανάλυση DSC σε συνδυασμό με την Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA), αντίστοιχα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η επικάλυψη κενών νανοσωματιδίων ,μοριακού βάρους 138.000 g/mol και 51.700 g/mol , με EP-β-CD. Τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος , τον δείκτη διασποράς ,το ζ-δυναμικό και την σταθερότητα τους σε διάστημα 40 ημερών. Επίσης, προσδιορίστηκε έμμεσα το πάχος της επικάλυψης του EP-β-CD στα νανοσωματίδια.

Επιστημονική περιοχή : Οργανική χημεία, Χημεία πολυμερών

Λέξεις κλειδιά : Υδροξυτυροσόλη, αντιοξειδωτικό , Πολυ (γαλακτικό οξύ), Νανοεγκλεισμός , Νανοσωματίδια, β-κυκλοδεξτρίνη, Επιχλωρυδρίνη-β-κυκλοδεξτρίνη

ABSTRACT

Derived from olive leaf and olive oil, Hydroxytyrosol (HT) is considered to be a very promising active molecule due to the variety of biological benefits it exhibits, such as anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and cardioprotective. HT is air- and light-sensitive, and can easily degrade to inactive derivatives. Encapsulation of such compounds in polymeric nanoparticles is considered to be a necessity for their protection.

The use of nanoparticles (NPs) as a drug delivery medium shows great promise in the Pharmaceutical and Cosmetic industry. The NPs particle size, their ability to improve the stability of active substances along with their biocompatibility with tissue and cells, when synthesized from materials that are biocompatible and biodegradable, have proven to be useful to the industry.

Poly(lactic acid) (PLA) is an aliphatic polyester with adjusted hydrolyzability and it is commonly used in the Food and Pharmaceutical industry as it is a biodegradable and biocompatible polymer. A major problem associated with the use of NPs is their tendency to lead to an initial drug release (burst effect). To reduce this problem, the use of cyclodextrins takes place. Cyclodextrins have a hydrophilic exterior which makes them an ideal coating material for the hydrophobic PLA core.

The aim of this study was to encapsulate HT in PLA NPs, to synthesize a β -cyclodextrin polymer cross-linked with epichlorohydrin (EP- β -CD), to conceive novel PLA blank NPs coated with the β -cyclodextrin polymer and to evaluate the characteristics of both categories of NPs.

Different complementary techniques were used to fully characterize the blank and loaded PLA NPs and Core(PLA)-Shell(Cyclodextrin) NPs as to their size, stability and encapsulation efficiency. And to also evaluate the product received from the synthesis of EP- β -CD as to its structure, thermal properties and molecular weight. These techniques include dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements, UV-Vis spectrometry, nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric analysis (TGA) and viscometry analysis concerning the polymers which were used.

Scientific area: *Organic and Polymer chemistry*

Key words: *Hydroxytyrosol, antioxidant, Poly(lactic acid), Nanoencapsulation, Nanoparticles, β -Cyclodextrins, Epichlorohydrin- β -cyclodextrin*

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1	10
1. Υδροξυτυροσώλη (HT)	11
1.1 Εισαγωγή-Προέλευση της υδροξυτυροσώλης	11
1.2 Χημική δομή και ιδιότητες της υδροξυτυροσώλης	12
1.3 Βιολογική δράση της υδροξυτυροσώλης	13
1.3.1 Η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσώλης	13
1.4 Αποικοδόμηση και οξείδωση της Υδροξυτυροσώλης	14
1.4.1 Γενικά-Πολυφαινόλες	14
1.4.2 Υδροξυτυροσώλη	14
2. Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA)	16
2.1 Εισαγωγή	16
2.2 Χημική δομή και ιδιότητες του Πολυ(γαλακτικού οξέος)	16
2.3 Σύνθεση του Πολυ(γαλακτικού οξέος)	18
2.3.1 Σύνθεση γαλακτικού οξέος	18
2.3.2 Τρόποι σύνθεσης πολυ(γαλακτικού οξέος)	20
2.4 Πολυ(γαλακτικό οξύ) και νανοεγκλεισμός	21
3. Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών	22
3.1 Εισαγωγή	22
3.2 Εφαρμογές και χρήση της μεθόδου του νανοεγκλείσμου	23
3.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε μικρό και νάνο σωματίδια	25
3.3.1 Φυσικοχημικές μεθόδους εγκλωβισμού	25
3.3.2 Φυσικομηχανικές μεθόδους εγκλωβισμού	27
3.4 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη	28
3.5 Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων	29
3.5.1 Μέγεθος (size)	29
3.5.2 ζ-δυναμικό (zeta potential)	30
3.5.3 Φυσικοχημική Σταθερότητα (stability)	30
4. Κυκλοδεξτρίνες (CD)	31
4.1 Εισαγωγή	31
4.2 Δομή και ιδιότητες της κυκλοδεξτρίνης	31

4.3 Προέλευση και παραγωγή των κυκλοδεξτρίνων	34
4.4 Εφαρμογές κυκλοδεξτρίνων (CDs)	34
4.5 Επιχλωροδρίνη-β-κυκλοδεξτρίνη (EP-β-CD ή β-CDP)	35
4.5.1 Πολυμερισμένες β-κυκλοδεξτρίνες (β-CDP)	35
4.5.2 Η χρήση της επιχλωροδρίνης (EP)	37
4.5.3 Ιδιότητες της Επιχλωροδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης	37
Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης-Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Υλικών	38
2.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calometry, DSC)	39
2.1.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου.....	39
2.1.2 Περιγραφή διάταξης	39
2.1.3 Μελέτη με την τεχνική DSC.....	39
2.2 Θερμοσταθμική Ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)	40
2.2.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου.....	40
2.2.2 Περιγραφή διάταξης	40
2.2.3 Μελέτη με την τεχνική TGA	40
2.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)	41
2.4 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry,NMR)	42
2.5 Υπεριώδης και Ορατή Φασματομετρία (Ultraviolet & Visible Spectrometry,UV-vis)	43
2.6 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	44
2.7 Ιξωδομετρία διαλύματος πολυμερούς	44

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3 : Σκοπός.....	47
Κεφάλαιο 4 : Πειραματικές διεργασίες	50
4.1 Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης.....	51
4.1.1 Σύνθεση του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος	52
4.1.2 Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης.....	53
4.2 Σύνθεση πολυμερούς β-κυκλοδεξτρίνης (poly-β-CD ή EP-β-CD)	54
4.3 Χαρακτηρισμός των πολυμερών.....	60
4.3.1 Ανάλυση ιξωδομετρίας- Προσδιορισμός μέσου ιξώδους μοριακού βάρους ...	60
4.3.2 Ανάλυση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)	63
4.3.3 Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA)	65

4.4 Σχηματισμός Νανοσωματιδίων (NPs) και Εγκλεισμός της ένωσης HT	66
4.4.1 Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολύ(βινυλικής) αλκοόλης (PVA)	67
4.4.2 Παρασκευή κενών πολυμερικών Νανοσωματιδίων (Blank NPs)	68
4.4.3 Εγκλεισμός HT σε πολυμερικά Νανοσωματίδια (Loaded NPs).....	68
4.5 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	69
4.6 Επικάλυψη Κενών Νανοσωματιδίων με Poly-β-CD	70
4.7 Χαρακτηρισμός PLA-Poly-β-CD NPs	
4.7.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους & Z- δυναμικό	71
4.7.2 Μελέτη Σταθερότητας επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων	72
.....	72
Κεφάλαιο 5 : Αποτελέσματα-συζήτηση αποτελεσμάτων	73
5.1 Σύνθεση πολυμερούς β-κυκλοδεξτρίνης - Αποτελέσματα	74
5.2 Χαρακτηρισμός του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD)	75
5.2.1 Μελέτη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	75
5.2.2 Μελέτη Φασματοσκοπίας FT-IR.....	79
5.2.3 Αποτελέσματα ιξωδομετρίας.....	80
5.2.4 Αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA)	82
5.3 Χαρακτηρισμός του Πολυ(γαλακτικού Οξέος)	85
5.3.1 Αποτελέσματα ιξωδομετρίας.....	85
5.3.2 Αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA)	85
5.4 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Πολυ(γαλακτικού) οξέος	87
5.4.1 Μέγεθος, δείκτης διασποράς και ζ-δυναμικό των κενών και φορτωμένων Νανοσωματιδίων	87
5.4.2 Ποσοστό εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης στα PLA Νανοσωματίδια (EE%)...90	
5.5 Χαρακτηρισμός επικαλυμμένων νανοσωματιδίων.....	92
5.5.1 Μέγεθος, δείκτης διασποράς, ζ-δυναμικό και πάχος των κενών και επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων	92
5.5.2 Μελέτη σταθερότητας επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων	96
Κεφάλαιο 6 : Συμπεράσματα-Μελλοντικές προτάσεις.....	97
Βιβλιογραφία Θεωρητικού κεφαλαίου	103

Θεωρητικό μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

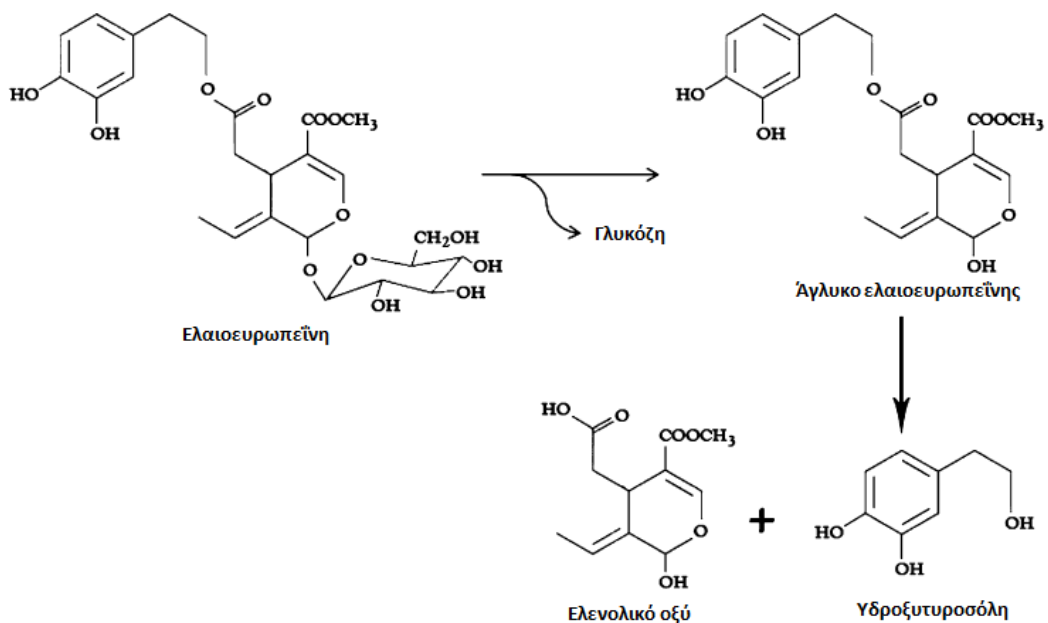
1. Υδροξυτυροσόλη(ΗΤ)

1.1 Εισαγωγή-Προέλευση της υδροξυτυροσόλης

Το μόριο της υδροξυτυροσόλης (ΗΤ) ανήκει στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα συστατικά , μαζί με την τυροσόλη και την ελαιοευρωπεΐνη, που βρίσκονται παρούσα στον καρπό και στο φύλλο της ελιάς και στο ελαιόλαδο.^[1,2] Προέρχεται από την υδρόλυση της γλυκοζυλιωμένης ελαιοευρωπεΐνης , από την οποία προκύπτουν και το ελενολικό οξύ, η γλυκόζη και η μη γλυκοζυλιωμένη ελαιοευρωπεΐνη (Εικόνα 1.1.2).^[3] Επίσης, η υδροξυτυροσόλη και η ελαιοευρωπεΐνη ευθύνονται για την πικρή και όξη γεύση στο ελαιόλαδο.^[4]



Εικόνα 1.1.1, Η υδροξυτυροσόλη εμφανίζεται φυσικά στην ελιά



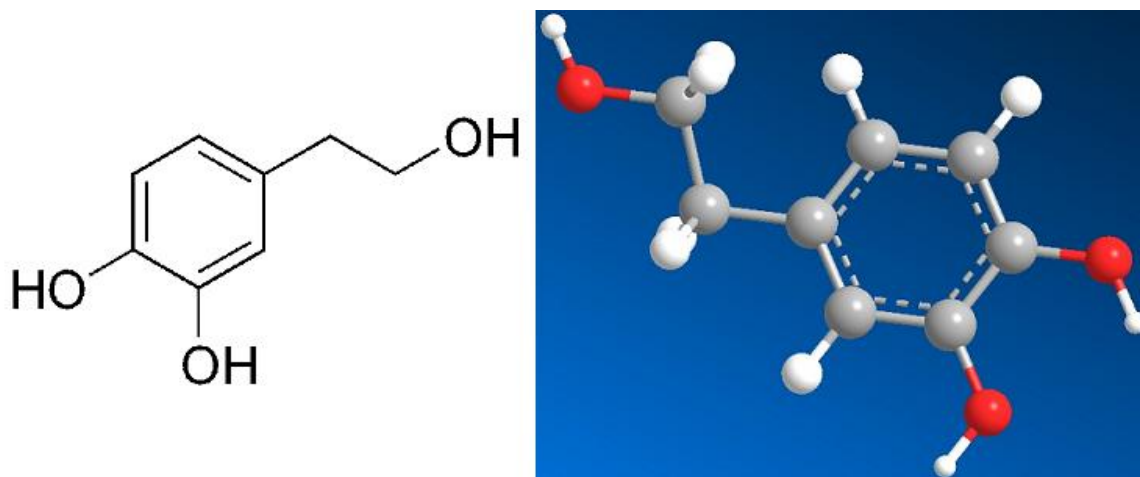
Εικόνα 1.1.2, Υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης

Ως συνέπεια του πολικού χαρακτήρα των φαινολικών ενώσεων , τα συστατικά αυτά βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα υπολείμματα που προκύπτουν από την επεξεργασία του λαδιού (όπως το πυρηνέλαιο , τα λύματα από το ελαιοτριβείο ή το νερό που προκύπτει από το ξέπλυμα των ελιών). Για το λόγο αυτό, τα παραπροϊόντα από την παραγωγή ελαιόλαδου αποτελούν μια σημαντική πηγή της υδροξυτυροσόλης. Σύμφωνα με έρευνες αναφέρεται ότι βρίσκεται σε ποσότητα που κυμαίνεται μεταξύ 113,7 - 381,2 mg / kg.^[5,6]

Όσον αφορά το φαινόμενο της οξείδωσης του παρθένου ελαιόλαδου , έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία της ΗΤ συμβάλλει στην σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου έναντι της τάγγισης που προκαλείται από την οξειδώση. Η συγκεκριμένη ιδιότητα της ΗΤ , καθιστά το μόριο ως ένα φυσικό και μη τοξικό συντηρητικό τροφίμων.^[1] Επιπρόσθετα, βάσει της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ) , για την θετική επίδραση της ουσίας στην υγεία, η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ΗΤ που έχει καθιερωθεί είναι 5 mg ανά ημέρα.^[7]

1.2 Χημική δομή και ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη είναι μια πολυφαινολική πολική ένωση , η οποία όπως αναφέρθηκε συναντάται φυσικά στην ελιά.^[8] Η ΗΤ είναι υδατοδιαλυτή και εμφανίζει συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού $\log P_{o/w} = 1.1$, δεδομένο που καθιστά τον αμφιφιλικό χαρακτήρα του μορίου.^[9] Στην Εικόνα 1.2.1 παρουσιάζεται η χημική και τρισδιάστατη δομή της :



Εικόνα 1.2.1 , Η χημική και τρισδιάστατη δομή της υδροξυτυροσόλης

Στο παρακάτω πινάκα αναγράφονται οι βασικές χημικές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης.^[10]

Πίνακας 1.2.1, Χημικές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης

Μοριακός τύπος	C ₈ H ₁₀ O ₃
Μοριακό βάρος	154.1632 g/mol
Συνώνυμα	3,4-(διϋδροξυφαινυλοαιθανόλη (3,4-Dihydroxyphenylethanol)
	2-(3,4-διϋδροξυφαινυλοαιθανόλη (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol)
	4-(2-υδροξυαιθυλ) -1,2-βενζολοδιόλη (4-(2-Hydroxyethyl)-1,2-benzenediol)
	3,4 DHPEA

1.3 Βιολογική δράση της υδροξυτυροσόλης

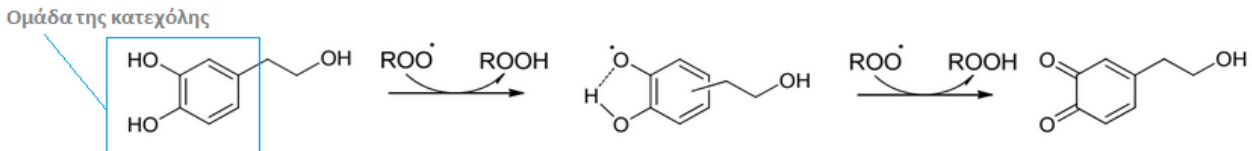
Λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Πιο συγκεκριμένα, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση της, η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη και αντιική δράση. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι βοηθά στον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων και στην προστασία από καρδιαγγειακή νόσο. Επιπρόσθετα, εμφανίζει θετική επίδραση στην θεραπεία της οστεοπόρωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας αντι-νιτρώδωσης (antinitrosating agent).^[11,12] Τέλος μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και αθηροσκλήρωσης.^[13]

1.3.1 Η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης

Η πιο μελετημένη ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στην ελιά είναι η αντιοξειδωτική δράση τους. Συγκεκριμένα, το ενδιαφέρον για την υδροξυτυροσόλη βασίζεται στις αξιοσημείωτες φαρμακολογικές και αντιοξειδωτικές δράσεις που εμφανίζει. Όσον αφορά τα δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive oxygen species), τα οποία συνεχώς σχηματίζονται λόγω των μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού, μπορεί να προκαλέσουν οξείδωση και βλάβη σε κυτταρικά μακρομόρια. Συνέπεια της συγκεκριμένης δράσης είναι η ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλες φλεγμονώδεις ασθένειες.^[14]

Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης που αποδίδεται στην παρουσία του 0-διϋδροξυφαινυλο (0-dihydroxyphenyl) τμήματος, οφείλεται στην ικανότητα δημιουργίας ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οξείδωσης και στην ικανότητα μείωσης του Fe⁺³.^[15] Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των 0-διφαινολών σχετίζονται με την ικανότητα τους να σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου

και της φαινόξυ ρίζας.^[16] Επομένως, η κατεχόλη εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό της αλυσίδας δίνοντας μια ρίζα υδρογόνου στην αλκυλο υπεροξυ ρίζα (ROO·) που σχηματίζεται στο στάδιο έναρξης της οξείδωσης των λιπιδίων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.3.1.



Εικόνα 1.3.1, Μηχανισμός ελευθέρων ριζών από την υδροξυτυροσόλη

Η οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDLs) αποτελεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία εκκινείται από τις ελεύθερες ρίζες. Βάσει ερευνών έχει δειχθεί ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να αναστέλλει την οξείδωση της LDL, λόγω της ικανότητας της να καθαρίζει της υπεροξυλικές ρίζες.^[17,18] Επίσης, η υδροξυτυροσόλη μειώνει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας που μεταφέρουν χοληστερίνη (LDL-C), πράγμα που αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων.^[19,20] Τέλος, εμφανίζει πιθανή προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το tert-βουτυλο-υδροϋπεροξειδίο.^[21]

1.4 Αποικοδόμηση και οξείδωση της Υδροξυτυροσόλης

1.4.1 Γενικά-Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται ευρέως ως πολύ ασταθή ενώσεις και πολύ ευαίσθητα στην αποικοδόμηση. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες επεξεργασίας που μπορούν να οδηγήσουν σε αυτό το αποτέλεσμα είναι οι υψηλές θερμοκρασίες, το φως, το οξυγόνο, η χρήση διαλυτών και η παρουσία των ενζύμων, πρωτεϊνών, μεταλλικά ιόντα. Η μελέτη της σταθερότητας τους, κάτω από αυτές τις συνθήκες, αποτελεί μια πολύ σημαντική πτυχή που πρέπει να ληφθεί υπόψη έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα μόρια αυτά να εμφανίζουν τις επιθυμητές ιδιότητες και να διατηρούν την δραστηριότητα και τη δομή τους κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας.^[22,23]

1.4.2 Υδροξυτυροσόλη

Όπως έχει αναφερθεί, η υδροξυτυροσόλη είναι ένα ισχυρά αντιοξειδωτικό μόριο. Παρουσία αέρα αυτοοξειδώνεται με γρήγορο ρυθμό, ειδικά πάνω σε silica gel το οποίο βρίσκεται σε αλκαλικό μέσο, καταλήγοντας σε ένα μαύρο πολυμερές. Αυτή η συμπεριφορά δεν επιτρέπει μεγάλης διάρκειας αποθήκευση είτε μεγάλης παραγωγής χρωματογραφικό καθαρισμό.^[24]

Σύμφωνα με την έρευνα("HPLC–ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil", Ilona Di Maio, Sonia Esposito, Agnese Taticchi, et al,2011) τα κύρια προϊόντα οξείδωσης της υδροξυτυροσόλης είναι η κινόνη και τα διμερή της. Συγκεκριμένα , βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων , κατά την οξείδωση το διαυγές διάλυμα της ΗΤ μετατρέπεται σε ένα κόκκινο-πορτοκαλί διάλυμα, που είναι ένδειξη της ύπαρξης κινόνης.^[25]

2. Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA)

2.1 Εισαγωγή

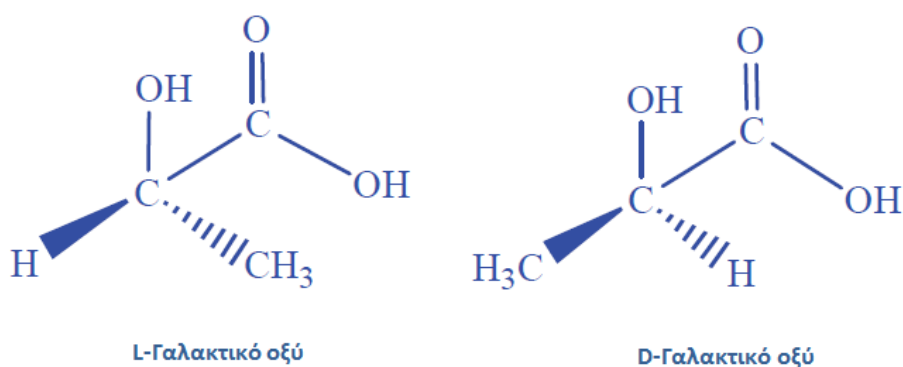
Το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι ένα βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό, ανακυκλώσιμο και κομποστοποιήσιμο υλικό, το οποίο προέρχεται και από ανανεώσιμες πηγές (π.χ. καλαμπόκι, σιτάρι).^[26] Το πολυ(γαλακτικό οξύ) χρησιμοποιείται σε εφαρμογές στην οδοντιατρική, στην ορθοπεδική και στη χορήγηση φαρμάκων.^[27] Όσον αφορά την βιομηχανική παραγωγή του πολυ(γαλακτικού οξέος), απαιτείται αρκετά λιγότερη ενέργεια σε σύγκριση με την παραγωγή άλλων πολυμερών. Επομένως, καθίσταται ως ανταγωνιστικό υλικό, λόγω του χαμηλότερου κόστους παραγωγής του. Όμως, υπάρχουν και μειονεκτήματα, όπως η ανθεκτικότητά και ο χαμηλός ρυθμός αποικοδόμησής του, τα οποία περιορίζουν τη χρήση του σε ορισμένες εφαρμογές. Επιπρόσθετα, είναι χημικά αδρανές και σχετικά υδρόφοβο.^[28]



Εικόνα 2.1.1, Πέλετες Πολυ(γαλακτικού οξέος)

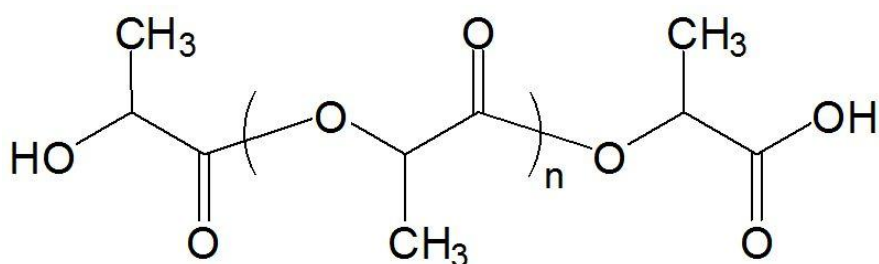
2.2 Χημική δομή και ιδιότητες του Πολυ(γαλακτικού οξέος)

Το PLA είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας που παράγεται από το γαλακτικό οξύ (LA). Το γαλακτικό οξύ, με χημικό τύπο $C_3H_6O_3$, συναντάται σε δύο οπτικά ισομερείς αντίποδες το L- και το D- και η χημική δομή τους παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2.1.^[29] Τα δύο ισομερή του LA μπορεί να παράγουν τέσσερα διακριτά υλικά: το πολυ-D-γαλακτικό οξύ (PDLA), το πολυ-L-γαλακτικό οξύ (PLLA), το πολυ-D, L-γαλακτικό οξύ (PDLLA) και το μεσο-PLA, που προέρχεται από τον πολυμερισμό του μεσο-γαλακτιδίου. Όσον αφορά τη μορφή του μονομερούς, σε θερμοκρασία δωματίου το γαλακτικό οξύ είναι μια λεύκη σκόνη. Επίσης, εμφανίζει T_g και T_m περίπου $55\text{ }^\circ\text{C}$ και $175\text{ }^\circ\text{C}$, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.2.1, Τα στερεοϊσομερή του Γαλακτικού οξέος

Η χημική δομή του PLA φαίνεται στην Εικόνα 2.2.2. Το PLA υψηλού μοριακού βάρους, είναι ένα άχρωμο, γυαλιστερό, άκαμπτο θερμοπλαστικό υλικό με ιδιότητες παρόμοιες με το πολυστυρένιο.^[30]



Εικόνα 2.2.2, Χημική δομή του PLA

Η πυκνότητα του PLA είναι περίπου $1,24 \text{ g/cm}^3$, έχει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) περίπου $58 \text{ }^\circ\text{C}$ και θερμοκρασία τήξης (T_m) που κυμαίνεται μεταξύ των $130\text{-}160 \text{ }^\circ\text{C}$. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης εξαρτάται από την οπτική καθαρότητα, το μοριακό του βάρος (αυξάνεται με αύξηση του μοριακού βάρους) και από τη θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί το πολυμερές. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) εξαρτάται επίσης από την οπτική καθαρότητα του PLA. Επιπρόσθετα, το PLA είναι άμορφο ή ημικρυσταλλικό, ανάλογα με τη στερεοχημεία του και με την θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί. Όσον αφορά τις μηχανικές του ιδιότητες, μπορεί να θεωρείται είτε μαλακό και ελαστικό πλαστικό είτε σκληρό υλικό με υψηλή αντοχή.^[31]

Στο παρακάτω πινάκα αναγράφονται οι βασικές ιδιότητες του Πολυ(γαλακτικού οξέος).^[30]

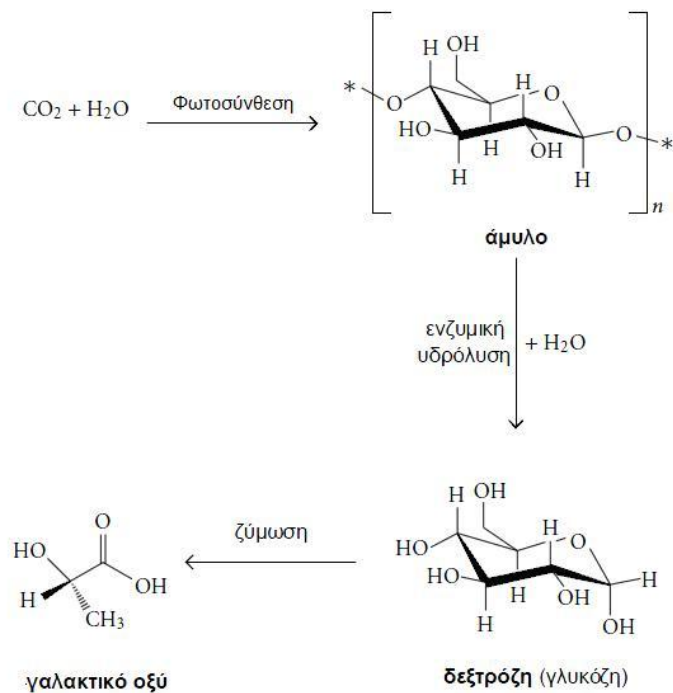
Πίνακας 2.2.1, Ιδιότητες του Πολυ(γαλακτικού οξέος)

Ιδιότητες	PDLA	PLLA	PDLLA
Διαλυτότητα	-Όλα είναι διαλυτά σε βενζόλιο, χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο, τετραϋδροφουράνιο (THF), διοξάνη κλπ -Όλα είναι αδιάλυτα σε αιθανόλη, μεθανόλη, και αλειφατικούς υδρογονάνθρακες		
Κρυσταλλική δομή	Κρυσταλλικό	Ημι-κρυσταλλικό	Άμορφο
Θερμοκρασία τήξης / Tm(°C)	~180	~180	μεταβλητή
Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης / Tg (°C)	50-60	55-60	μεταβλητή
Θερμοκρασία αποικοδόμησης(°C)	~200	~200	185-200
Επιμήκυνση κατά τη θραύση (%)	20-30	20-30	μεταβλητή
Αντοχή στη θραύση (g/d)	4-5	5-6	μεταβλητή
Χρόνος ημίσειας ζωής σε φυσιολογικό ορό(37 ° C)	4-6 μήνες	4-6 μήνες	2-3 μήνες

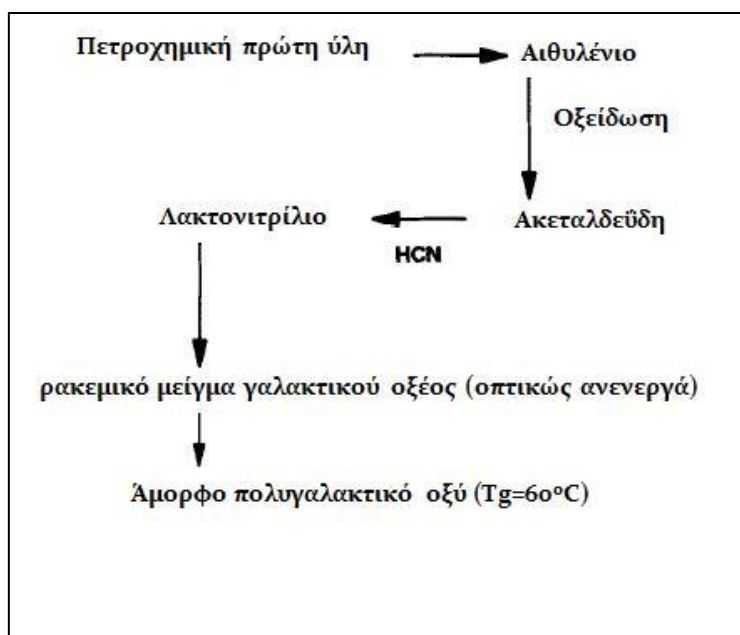
2.3 Σύνθεση του Πολυ(γαλακτικού οξέος)

2.3.1 Σύνθεση γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ (2-υδρόξυ προπανοϊκό οξύ), μπορεί να προέρχεται είτε από ανανεώσιμες πηγές όπως από το άμυλο του καλαμποκιού, από ρίζες ή ζαχαροκάλαμο(Εικόνα 2.3.1.1) είτε από την επεξεργασία Πετροχημικής πρώτης ύλης (Εικόνα 2.3.1.2) . Το γαλακτικό οξύ προκύπτει από την ζύμωση της γλυκόζης ,παρουσία μικροοργανισμών, όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται το νερό. Η γλυκόζη προκύπτει από ενζυμική υδρόλυση του αμύλου των φυτών. Από κάθε μόριο γλυκόζης δημιουργούνται σχεδόν δύο μόρια γαλακτικού οξέος και ανάλογα με το είδος του βακτηρίου *Lactobacillus* που χρησιμοποιείται λαμβάνεται το L-ισομερές ή το D-ισομερές ή μίγμα των δύο. Όσον αφορά τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος πετροχημικά, προκύπτει ένα ρακεμικό μίγμα των δύο ισομερών.^[32,33]



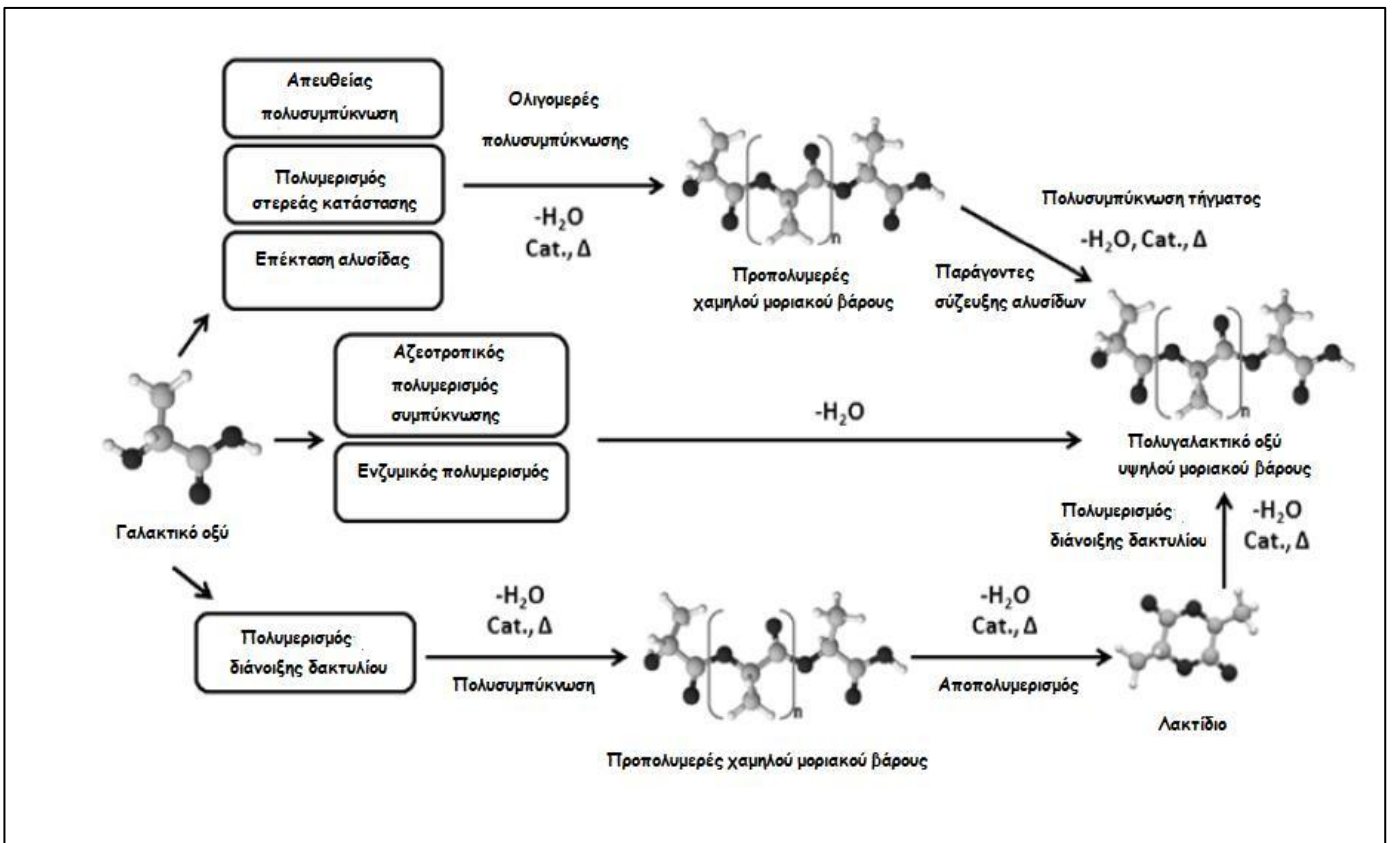
Εικόνα 2.3.1.1, Σύνθεση του γαλακτικού οξέος από ανανεώσιμες πηγές^[34]



Εικόνα 2.3.1.2, Πετροχημική διαδρομή για την παραγωγή γαλακτικού οξέος^[33]

2.3.2 Τρόποι σύνθεσης πολυ(γαλακτικού οξέος)

Η σύνθεση του πολυ(γαλακτικού οξέος) μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους πολυμερισμού του μονομερούς του γαλακτικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να *κατανεμηθούν* στις εξής κατηγορίες : Στην απευθείας πολυσυμπύκνωση ,στον πολυμερισμό στερεάς κατάστασης, στους παράγοντες σύζευξης αλυσίδων, στον αζεοτροπικό πολυμερισμό συμπύκνωσης, στον ενζυμικό πολυμερισμό και στον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου. Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές παραγωγής αφορούν την απευθείας πολυσυμπύκνωση του γαλακτικού οξέος παρουσία καταλύτη σε χαμηλή πίεση και τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του κυκλικού διμερούς του γαλακτικού οξέος δηλαδή του λακτιδίου, τα οποία αναφέρονται παρακάτω^[32,35]. Τέλος, στην Εικόνα 2.3.2.1 παρουσιάζονται οι κύριοι μέθοδοι σύνθεσης του PLA :



Εικόνα 2.3.2.1, Μέθοδοι σύνθεσης πολυ(γαλακτικού οξέος)^[35]

❖ *Απευθείας πολυσυμπύκνωση (Direct Polycondensation)*

Σύμφωνα με την Εικόνα 2.3.2.1, η απευθείας πολυσυμπύκνωση περιλαμβάνει δύο στάδια, την συμπύκνωση του γαλακτικού οξέος προς ολιγομερή με ταυτόχρονη απομάκρυνση του νερού και τον πολυμερισμό σε κατάσταση τήξης. Η ύπαρξη της καρβοξυλικής και της υδροξυλικής ομάδας στο μόριο του γαλακτικού οξέος, καθιστά δυνατή την απευθείας μετατροπή του σε πολυεστέρα μέσω της αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης.

❖ *Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (Ring Opening Polymerization)*

Ο πολυμερισμός διάνοιξης του δακτύλιου του λακτιδίου (Εικόνα 2.3.2.2) αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο παράγωγης πολυ(γαλακτικού οξέος), υψηλού μοριακού βάρους. Βάση της συγκεκριμένης μεθόδου, αρχικά πραγματοποιείται ο σχηματισμός του λακτιδίου από το γαλακτικό οξύ, το οποίο γίνεται σε δυο στάδια. Συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο το γαλακτικό οξύ συμπυκνώνεται προς ολιγομερή, τα οποία εν συνεχεία αποπολυμερίζονται προς τον σχηματισμό του λακτιδίου, που ευνοείται θερμοδυναμικά. Έπειτα, με την συνθήσει του λακτιδίου, ακολουθεί ο πολυμερισμός του με την μέθοδο διάνοιξης δακτυλίου.^[30]



Εικόνα 2.3.2.2, Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου

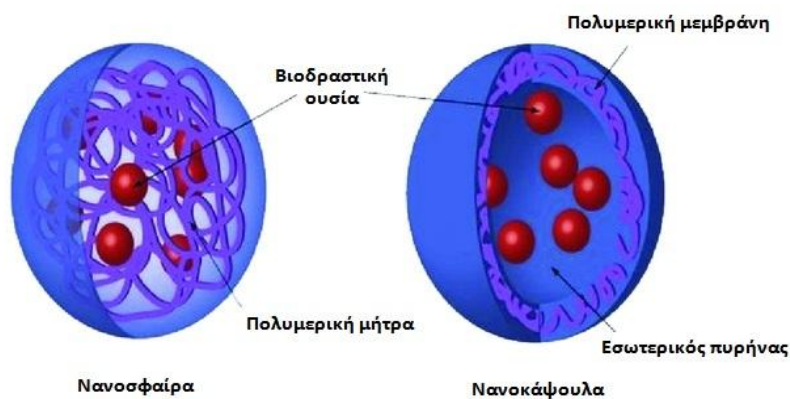
2.4 Πολυ(γαλακτικό οξύ) και νανοεγκλεισμός

Ένα από τα πολυμερή που χρησιμοποιείται για την διαμόρφωση νανοσωματιδίων είναι το Πολυ(γαλακτικό οξύ), το οποίο έχει ερευνηθεί εκτενώς για την απελευθέρωση διαφόρων φαρμάκων. Το PLA, προτάθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την απελευθέρωση φάρμακου για πρώτη φορά το 1971. Επίσης, έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), καθώς και από τις ευρωπαϊκές ρυθμιστικές αρχές. Το PLA ως πολυεστέρας στη φύση, υφίσταται υδρόλυση κατά την εμφύτευση στο σώμα. Συγκεκριμένα, κατά την αποικοδόμηση του μετατρέπεται σε μη τοξικά προϊόντα μέσω της διάσπασης του δεσμού του εστέρα και εν συνέχεια μετατρέπεται σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, τα πολυμερικά προϊόντα βιοαποικοδόμησης σχηματίζονται με πολύ αργό ρυθμό και ως εκ τούτου δεν επηρεάζουν την λειτουργία στα κύτταρα. Τέλος, τα πολυμερή αυτού του είδους, έχουν μελετηθεί για την τοξικότητα τους σε ζώα και έχει αποδεδειχθεί βάσει ερευνών ότι είναι μη τοξικά στον οργανισμό.^[36,37]

3. Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών

3.1 Εισαγωγή

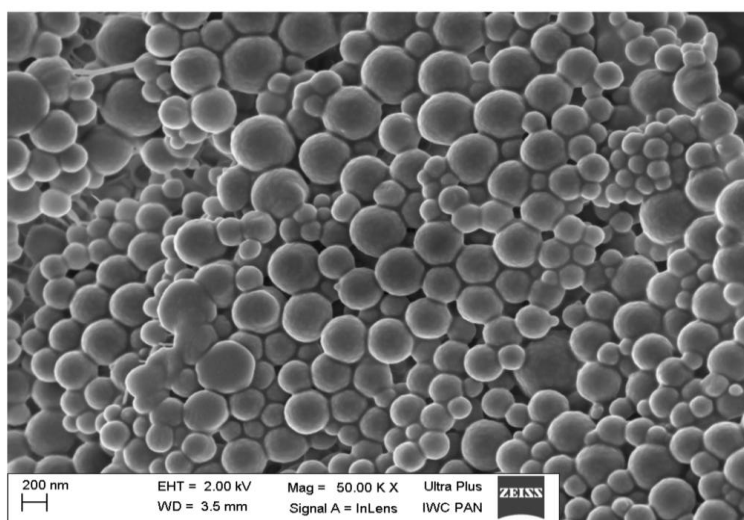
Τα νανοσωματίδια (NPs) ορίζονται ως στερεά κολλοειδή σωματίδια που διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες, τις νανοσφαίρες και τις νανοκάψουλες. Συγκεκριμένα, μπορεί να παρασκευάζονται είτε με μεθόδους πολυμερισμού είτε με σύνθεση, όπου γίνεται χρήση προμορφοποιημένων πολυμερών. Όσον αφορά τα νανοσφαιρίδια και τις νανοκάψουλες, υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορούν να οριστούν. Επικρατέστερα, ο όρος νανοσφαιρίδιο χρησιμοποιείται για σχηματισμούς στους οποίους η ενεργός ουσία βρίσκεται εγκλεισμένη, σε μορφή πυρήνα που περιβάλλεται πλήρως από το πολυμερές, ενώ ο όρος νανοκάψουλα για σχηματισμούς όπου η ενεργός ουσία βρίσκεται σε διασπορά σε όλη την επιφάνεια του πολυμερούς (Εικόνα 3.1.1). Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι το μέγεθος τους, γενικά θεωρείται ότι κυμαίνεται περίπου στα 5-100 nm με ένα ανώτερο όριο μεγέθους τα 1000 nm περίπου. Συγκεκριμένα, η περιοχή που λαμβάνεται πλέον είναι στα 100-500 nm.^[38,39]



Εικόνα 3.1.1, Οι δύο κύριοι τύποι πολυμερικών νανοσωματιδίων : νανοσφαίρα (σύστημα μήτρας - matrix system) και νανοκάψουλα (σύστημα μεμβράνης- reservoir system).

Τα συστήματα αυτά έχουν μελετηθεί εκτεταμένα ως φορείς φαρμάκων και έχουν κυρίαρχη εφαρμογή στον φαρμακευτικό κλάδο. Επίσης, η χρήση τέτοιου είδους συστημάτων βρίσκει εμπορικές εφαρμογές σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας, όπως στις βιομηχανίες των τροφίμων, των καλλυντικών, των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων. Τέλος, βρίσκει εφαρμογή και στον κλάδο των καυσίμων, στις γραφικές τέχνες και στα εκτυπωτικά και φωτογραφικά είδη.

Όπως έχει διαπιστωθεί από διαφορές μελέτες, η χρήση των πολυμερικών νανοσωματιδίων ως ενεργό φορέας ουσιών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος με μεγάλο πλήθος πλεονεκτημάτων. Συγκεκριμένα, τα NPs διαθέτουν την ικανότητα να απελευθερώνουν φάρμακα, εμφανίζουν υποκυτταρικό μέγεθος που τους επιτρέπει να κάνουν υψηλότερες ενδοκυτταρικές πρόσληψης σε σχέση με άλλα σωματιδιακά συστήματα και μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα δραστικών ουσιών. Επιπρόσθετα, όταν συντίθενται από υλικά που είναι βιοαποικοδομήσιμα, μπορεί να είναι βιοσυμβατά με τους ιστούς και τα κύτταρα με τα όποια έρχονται σε επαφή. Τέλος, εμφανίζουν υψηλή απόδοση εγκλωβισμού δραστικών ουσιών.^[39]



Εικόνα 3.1.2, Απεικόνιση πολυμερικών νανοσωματιδίων από ανάλυση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

3.2 Εφαρμογές και χρήση της μεθόδου του νανοεγκλείσμου

Ο νανοεγκλεισμός εφαρμόζεται κυρίως για την προστασία και την βελτίωση των ιδιοτήτων των δραστικών ουσιών. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη αποδέσμευση αυτών των ουσιών και για την ασφαλή διαχείριση τοξικών ουσιών, προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Παρακάτω γίνεται μια περιγραφή για τους κύριους λόγους για τους οποίους εφαρμόζεται ο εγκλεισμός δραστικών ουσιών.^[40]

Ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας

Ο εγκλεισμός βρίσκει εφαρμογή στην ελεγχόμενη αποδέσμευση ουσιών. Η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στο περιβάλλον ελέγχεται από μηχανισμούς διάχυσης μέσω του υλικού της μήτρας ή της μεμβράνης. Έτσι λαμβάνονται διάφοροι τρόποι αποδέσμευσης, ανάλογα με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

Προστασία βιοδραστικών μορίων

Ο εγκλεισμός εφαρμόζεται για την προστασία βιοδραστικών μορίων. Συγκεκριμένα, προστατεύει ευαίσθητες ουσίες (όπως βιταμίνες πρωτεΐνες και υγροσκοπικά υγρά) από αλλοιώσεις που προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ακτινοβολία, η υγρασία, η θερμότητα και το οξυγόνο. Επιπλέον, χημικά ενεργές ουσίες, όταν εγκλωβίζονται, προστατεύονται από χημική προσβολή.

Ασφαλής διαχείριση τοξικών ουσιών

Ο εγκλεισμός δραστικής ουσίας εφαρμόζεται σε περιπτώσεις τοξικών ουσιών με σκοπό την ασφαλέστερη διαχείριση από το χρήστη αλλά και για την ασφαλέστερη διάθεση των ουσιών στο περιβάλλον. Τέτοιες εφαρμογές υπάρχουν ήδη σε φυτοφάρμακα, λιπάσματα και παρασιτοκτόνα.

Προστασία Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων της δραστικής ουσίας

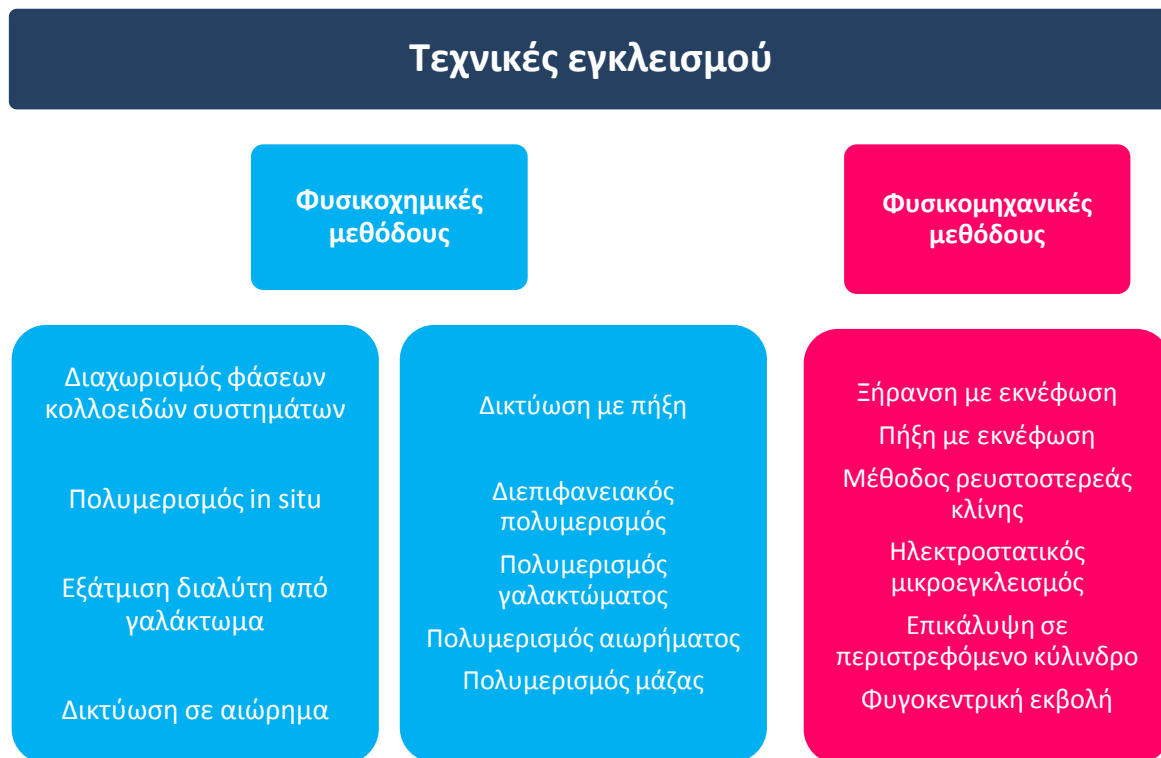
Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας προστατεύονται από το υλικό της μεμβράνης ή της μήτρας, μέχρι την αποδέσμευση της ουσίας. Τέτοιες ιδιότητες είναι η επίδραση στο pH, η πτητικότητα, η τοξικότητα, καταλυτικές ιδιότητες κ.ά. Οι κυριότερες εφαρμογές με σκοπό την προστασία των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της δραστικής ουσίας είναι η μείωση της τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών, ο έλεγχος της αλλαγής του χρώματος λευκοχρωστικών βαφών με τη μεταβολή του pH και η αποφυγή εξάτμισης αρωματικών ουσιών.

Προστασία της δραστικής ουσίας από ανεπιθύμητες ιδιοότητες

Ο εγκλεισμός δραστικών ουσιών σε νανοσωματίδια χρησιμοποιείται και για την κάλυψη ανεπιθύμητων ιδιοτήτων της δραστικής ουσίας. Στην περίπτωση των φαρμακευτικών ουσιών, καλύπτεται η δυσάρεστη γεύση ή οσμή του φαρμάκου. Επιπρόσθετα, είναι δυνατόν να αποφευχθούν κάποιες παρενέργειες του φαρμάκου, όπως γαστρικές και εντερικές ενοχλήσεις στην περίπτωση του θειικού σιδήρου και του ακετυλο-σαλικυλικού οξέος. Αυτό συμβαίνει επειδή η αποδέσμευση του φαρμάκου γίνεται σταδιακά και ελεγχόμενα στο πεπτικό σύστημα, σε αντίθεση με την ελεύθερη αποδέσμευση του μη εγκλωβισμένου φαρμάκου.

3.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε μικρό και νάνο σωματίδια^[40,41]

Οι τεχνικές εγκλεισμού ταξινομούνται με βάση το μέσο στο οποίο παράγονται τα σωματίδια. Διακρίνονται στις φυσικοχημικές μεθόδους, στις οποίες το συνεχές μέσο που χρησιμοποιείται είναι το νερό ή κάποιος οργανικός διαλύτης και στις φυσικομηχανικές, όπου το συνεχές μέσο της διεργασίας είναι ο αέρας. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι διαφορές φυσικοχημικές και φυσικομηχανικές μέθοδοι :



3.3.1 Φυσικοχημικές μεθόδους εγκλωβισμού

Στις φυσικοχημικές μεθόδους, στις οποίες το συνεχές μέσο που χρησιμοποιείται είναι το νερό ή κάποιος οργανικός διαλύτης, ανήκουν οι παρακάτω τεχνικές:

Διεπιφανειακός πολυμερισμός

Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από μία αντίδραση πολυσυμπύκνωσης, που πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια δύο μη αναμίξιμων φάσεων, μεταξύ ενός χλωριδίου οξέος και ενός μονομερούς που περιέχει ενεργά άτομα υδρογόνου. Όσον αφορά την προς εγκλωβισμού ουσία, βρίσκεται διεσπαρμένη σε μία από τις δύο φάσεις μαζί με ένα από τα δύο μονομερή. Έπειτα, προστίθεται το δεύτερο μονομερές με αποτέλεσμα την παραγωγή μια μεμβράνη πολυμερούς.

Πολυμερισμός in situ

Η μέθοδος αυτή είναι παρόμοια με τον διεπιφανειακό πολυμερισμό με τη διαφορά ότι το μονομερές προτίθεται μόνο σε μια από τις δύο φάσεις και ο πολυμερισμός πραγματοποιείται στην επιφάνεια των σωματιδίων.

Εξάτμιση διαλύτη από γαλάκτωμα

Στη μέθοδο αυτή η οργανική φάση που αποτελείται από το πολυμερές και τη δραστική ουσία σε οργανικό διαλύτη διασπείρεται σε μία υδατική φάση που περιέχει κατάλληλο σταθεροποιητή, και στη συνέχεια εξατμίζεται ο οργανικός διαλύτης. Η συγκεκριμένη μέθοδος θα αναλυθεί περαιτέρω σε παρακάτω κεφάλαιο.

Διαχωρισμός φάσεων κολλοειδών συστημάτων

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ένα κολλοειδές διάλυμα πολυμερούς το οποίο διαχωρίζεται σε δύο φάσεις υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, της μεταβολής του pH ή της προσθήκης ουσιών και λαμβάνεται υπό μορφή σταγονιδίων. Εν συνεχεία, τα σταγονίδια επικάθονται γύρω από τον πυρήνα του ενεργού συστατικού σχηματίζοντας έτσι τη μεμβράνη της μικροκάψουλας.

Δικτύωση σε αιώρημα

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, πραγματοποιείται η διάλυση ή η διασπορά της δραστικής ουσίας σε ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς προς το σχηματισμό ενός γαλακτώματος ύδατος/ελαίου, με την προσθήκη του διαλύματος του πολυμερούς σε ένα ελαιώδες διάλυμα που περιέχει σταθεροποιητή και στη συνέχεια λαμβάνει μέρος η σκλήρυνση των σταγόνων του πολυμερούς με την προσθήκη του μέσου δικτύωσης.

Πήξη σε αιώρημα

Στην τεχνική πήξης σε αιώρημα, η ενεργός ουσία και το πολυμερές διασπείρονται σε μια συνεχή φάση και στη συνέχεια οι σταγόνες της διεσπαρμένης φάσης μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια με πήξη.

Πολυμερισμός μάζας

Το μονομερές ή το μίγμα των μονομερών μαζί με τη δραστική ουσία θερμαίνονται παρουσία καταλύτη. Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού αυξάνεται το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Αναλόγως αν το πολυμερές διαλύεται ή όχι, το σύστημα στερεοποιείται ή το πολυμερές καθιζάνει.

Πολυμερισμός γαλακτώματος

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη διασπορά του μονομερούς (ή του μίγματος των μονομερών) και της ενεργούς ουσίας σε υδατικό μέσο που περιέχει το γαλακτωματοποιητή με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γαλακτώματος ελαίου/ ύδατος. Στο γαλάκτωμα προστίθεται ένας υδατοδιαλυτός εκκινητής και μετά την έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού, σχηματίζονται τα σωματίδια.

Πολυμερισμός αιωρήματος

Ο πολυμερισμός αιωρήματος είναι παρόμοιος με τον πολυμερισμό γαλακτώματος. Η διαφοροποίηση βρίσκεται στο ότι ο εκκινητής προστίθεται στο μίγμα των μονομερών, και χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα σταθεροποιητή. Στην μέθοδο αυτή, τα τελικά σωματίδια είναι μεγαλύτερα.

3.3.2 Φυσικομηχανικές μεθόδους εγκλωβισμού

Στις φυσικομηχανικές μεθόδους, όπου το συνεχές μέσο της διεργασίας είναι ο αέρας, ανήκουν οι εξής τεχνικές:

Μέθοδος ρευστοστερεάς κλίνης

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια τεχνική επικάλυψης των στερεών σωματιδίων με υδατοδιαλυτά πολυμερικά υλικά. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει ένα τμήμα ψεκασμού, όπου το πολυμερές που ψεκάζεται καλύπτει τα σωματίδια και ένα τμήμα εκτόνωσης, όπου τελικά τα σωματίδια επιβραδύνονται και υπό την επίδραση της βαρύτητας αρχίζουν να κινούνται προς τα κάτω.

Ηλεκτροστατικός μικροεγκλεισμός:

Στην τεχνική αυτή το πολυμερές και η δραστική ουσία ψεκάζονται σε κοινό θάλαμο και φορτίζονται με αντίθετα φορτία. Έτσι, λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται σχηματίζονται τα επιθυμητά σωματίδια.

Επικάλυψη σε περιστρεφόμενο κύλινδρο

Στη μέθοδο αυτή τα σωματίδια της δραστικής ουσίας κινούνται με μεγάλη ταχύτητα στον κύλινδρο της συσκευής ενώ το πολυμερές ψεκάζεται και καλύπτει ομοιόμορφα τα σωματίδια.

Φυγοκεντρική εκβολή

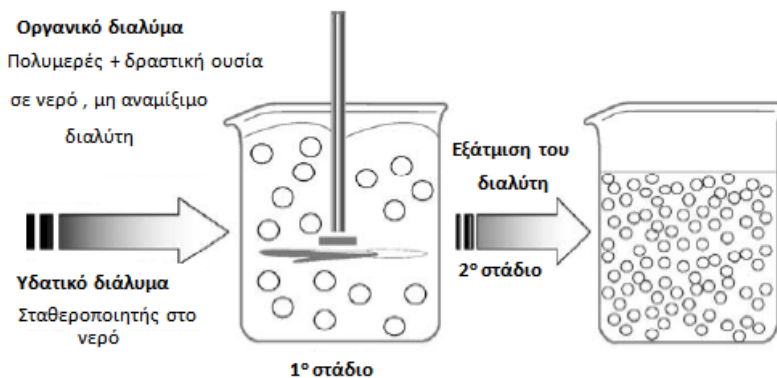
Η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιείται με τη χρήση μιας συσκευής, η οποία περιλαμβάνει έκκεντρα ακροφύσια όπου εκβάλλονται ταυτόχρονα η δραστική ουσία και το πολυμερές, το οποίο στη συνέχεια περιβάλλει τη δραστική ουσία.

Ξήρανση και πήξη με εκνέφωση

Στην τεχνική της ξήρανσης με εκνέφωση, ένα αιώρημα της ενεργούς ουσίας και του πολυμερούς διέρχεται μέσω ειδικού ακροφυσίου και ρεύματος θερμού αέρα με αποτέλεσμα την εξάτμιση του διαλύτη. Στην τεχνική της πήξης με εκνέφωση, η όποια είναι παρόμοια με την τεχνική της ξήρανσης, η διαφορά βρίσκεται στο γεγονός ότι η ενεργός ουσία διασπείρεται σε τήγμα του πολυμερούς και όχι σε διάλυμά του.

3.4 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη^[42]

Η τεχνική της γαλακτωματοποίησης -εξάτμισης του διαλύτη μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους, ανάλογα με τη φύση της προς εγκλωβισμού δραστικής ουσίας. Οι δυο τεχνικές είναι οι εξής: Η Τεχνική του απλού γαλακτώματος (ύδωρ σε έλαιο, w/o) και η τεχνική του διπλού γαλακτώματος (w/o/w).



Εικόνα 3.4.1, Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης

Τεχνική απλού γαλακτώματος (ύδωρ σε έλαιο, w/o)

Με την τεχνική του απλού γαλακτώματος πραγματοποιείται ο εγκλωβισμός υδρόφοβων ουσιών. Συγκεκριμένα, το πολυμερές διαλύεται σε κατάλληλο πτητικό οργανικό διαλύτη, το οποίο είναι μη αναμίξιμο με το νερό. Παράλληλα, η ουσία που πρόκειται να εγκλωβιστεί διαλύεται επίσης σε κατάλληλο διαλύτη, και το διάλυμα αυτό αναμιγνύεται με το διάλυμα του πολυμερούς (οργανική φάση). Η οργανική αυτή φάση γαλακτωματοποιείται μέσα σε μία υδατική φάση που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μιας επιφανειοδραστικής ουσίας (χολικό νάτριο ή πολυβυνυλική αλκοόλη). Έπειτα, πραγματοποιείται η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, υπό ήπιες συνθήκες (ελαφριά θέρμανση, εφαρμογή κενού). Με την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη, προκύπτει η σκλήρυνση του περιβλήματος. Τα μικρο/νάνο-σωματίδια που σχηματίζονται συλλέγονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια επαναδιασπείρονται σε απιονισμένο νερό και λυοφιλοποιούνται.

Η τεχνική του διπλού γαλακτώματος (w/o/w)

Με την τεχνική του διπλού γαλακτώματος πραγματοποιείται ο εγκλωβισμός υδρόφιλων ουσιών. Αρχικά η δραστική ουσία διαλύεται σε μια υδατική φάση, η οποία γαλακτωματοποιείται μέσα σε πτητική οργανική φάση, μέσα στην οποία βρίσκεται διαλυμένο το πολυμερές. Το γαλάκτωμα που σχηματίζεται, διασπείρεται σε μια δεύτερη υδατική φάση με αποτέλεσμα το σχηματισμό του διπλού γαλακτώματος. Στη συνέχεια, η διαδικασία είναι όμοια με την τεχνική του απλού γαλακτώματος.

3.5 Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων

3.5.1 Μέγεθος (size)

Το επιθυμητό μέγεθος των νανοσωματιδίων, αλλάζει ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. Συγκεκριμένα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του πολυμερούς και της δραστικής ουσίας, αλλά και από τις παραμέτρους και τις συνθήκες της διεργασίας. Θεωρητικά, το μέγεθος των νανόσφαιρων κυμαίνεται από 100 έως 200 nm, ενώ των νανοκαψουλών μεταξύ 100-300 nm. Όσον αφορά τους περιορισμούς που σχετίζονται με το μέγεθος των νανοσωματιδίων, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες τα νανοσωματίδια δεν πρέπει να υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Επίσης, άλλοι περιορισμοί δεν επιτρέπουν τα νανοσωματίδια να είναι μικρότερα από ένα προκαθορισμένο μέγεθος. Για παράδειγμα, σε φαρμακευτικές εφαρμογές όπου τα νανοσωματίδια χορηγούνται ενδοφλέβια, το μέγεθός τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5μm, αλλά και η διάμετρός τους να είναι μικρότερη από 200 nm, ώστε να μην διηθούνται από τον σπλήνα.^[43]

Από την άλλη, το πολύ μικρό μέγεθος των σωματιδίων έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενδοκυτταρική πρόσληψη. Βάσει ερευνών, έχει αποδειχθεί ότι νανοσωματίδια μεγέθους 100nm έχουν 2,5 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη στην κυτταρική μεμβράνη του

CaCO₂ σε σχέση με σωματίδια μεγέθους 1 μm και 6 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη συγκριτικά με σωματίδια μεγέθους 10μm.^[44]

3.5.2 ζ-δυναμικό (*zeta potential*)

Η εμφάνιση φορτίου επιφανείας στα περισσότερα υδατικά εναιωρήματα σωματιδίων οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων στα σωματίδια ή και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Τα ιόντα, που είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, έλκουν από το διάλυμα θετικά ιόντα δημιουργώντας το ηλεκτροκινητικό ή ζ-δυναμικό, το οποίο αποτελεί την διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων με την ηλεκτρικά ουδέτερη περιοχή του διαλύματος. Το δυναμικό μηδενίζεται στην διάχυτη στοιβάδα. Συγκεκριμένα, κατά την κίνηση του σωματιδίου, η διάχυτη στοιβάδα απομακρύνεται και αποκαλύπτει το δυναμικό επιφάνειας (ζ-δυναμικό). Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων (κυρίως ιονικών επιφανειοδραστικών) και την σύνθεση του μέσου διασποράς. Ο υπολογισμός του ζ-δυναμικού πραγματοποιείται με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου.

Το ζ-δυναμικό σχετίζεται με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Για σωματίδια μικρού μεγέθους, ένα υψηλό ζ-δυναμικό προσδίδει σταθερότητα στο σύστημα των νανοσωματιδίων, δηλαδή το διάλυμα ή διασπορά θα αντιστέκονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Από την άλλη, η εμφάνιση χαμηλού ζ-δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα η έλξη να υπερβαίνει την άπωση και η διασπορά θα αρχίσει να εμφανίζει φαινόμενα κροκιδώσης και συσσωματωμάτων. Συμπερασματικά, τα συστήματα με υψηλό ζ-δυναμικό (αρνητικό ή θετικό) είναι ηλεκτρικά σταθεροποιημένα ενώ τα συστήματα με χαμηλό ζ-δυναμικό τείνουν να πήζουν ή να κροκιδώνονται.^[45,46,47]

3.5.3 Φυσικοχημική Σταθερότητα (*stability*)

Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το pH της υδατικής διασποράς, τον τύπο του πολυμερούς, τη χημική σταθερότητα της δραστικής ουσίας και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Ένα μειονέκτημα χρήσης νανοσωματιδίων είναι αστάθεια τους. Συγκεκριμένα, όταν τα υδατικά διαλύματα πολυμερικών νανοσωματιδίων αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρείται συχνά δημιουργία συσσωματωμάτων (φυσική αστάθεια) ή/και υδρόλυση του πολυμερούς και κατά συνέπεια διαρροή της δραστικής ουσίας (χημική αστάθεια). Για να βελτιωθεί τόσο η φυσική όσο και η χημική σταθερότητα των σωματιδίων χρειάζεται να απομακρυνθεί το νερό. Η πιο γνωστή διεργασία που επιτρέπει τη μετατροπή διαλυμάτων ή εναιωρημάτων σε στερεά, με επαρκή σταθερότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικές εφαρμογές είναι η λυοφιλοποίηση (*freeze drying*). Η διεργασία αυτή βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού μέσω εξάχνωσης και εκρόφησης υπό κενό, από ένα παγωμένο δείγμα. Παρόλα αυτά η διεργασία αυτή προκαλεί αρκετές καταπονήσεις στο δείγμα. Έτσι, προτείνετε πολλές φορές αναγκαία η προσθήκη συστατικών που θα προστατεύσουν το δείγμα από τις καταπονήσεις αυτές.^[48,49,50]

4. Κυκλοδεξτρίνες (CD)

4.1 Εισαγωγή

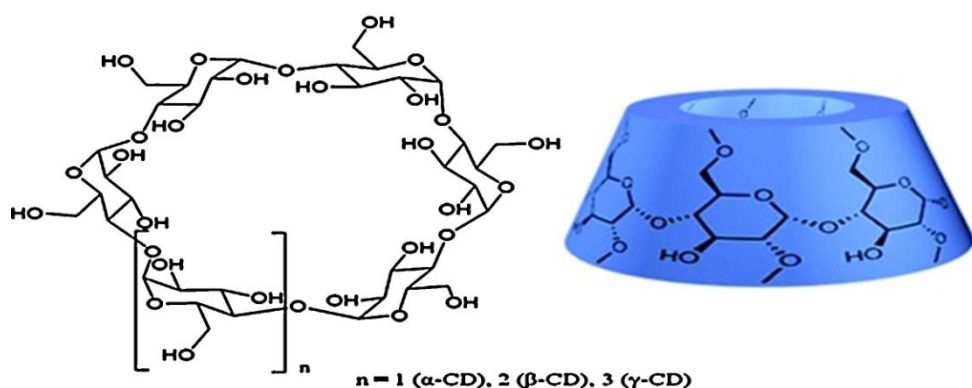
Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι πολύτιμα μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην φαρμακευτική βιομηχανία. Ταξινομούνται σε υδρόφιλα, υδρόφοβα και ιοντικά παράγωγα. Η βιοσυμβατότητα και η ευελιξία τους, τους καθιστά ικανά μόρια για την μείωση των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων που φέρουν ορισμένα δραστικά συστατικά των φαρμάκων. Αυτό πραγματοποιείται με τον σχηματισμό συμπλοκών εγκλεισμού της κυκλοδεξτρίνης με την δραστική ουσία.

Τα πολυάριθμα παράγωγα των CDs εξετάζονται συνεχώς με σκοπό να συμβάλλουν στην βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φαρμάκων για την απόκτηση υψηλής σταθερότητας και διαλυτότητας. Οι κυκλοδεξτρίνες, όταν λειτουργούν ως φορείς ουσιών έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την ενθυλάκωση του προς εγκλωβισμού μορίου, να βελτιώνουν την σταθερότητα και να ρυθμίζουν την απελευθέρωση του φαρμάκου. Τα κύρια πλεονεκτήματα των φυσικών CD (α , β και γ -CD) είναι η χαμηλή τοξικότητα, η χαμηλή φαρμακολογική δράση και η καθορισμένη χημική δομή τους.^[51]

Όσον αφορά την β -κυκλοδεξτρίνη, είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη από τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες λόγω της διαθεσιμότητας της και του κατάλληλου μεγέθους της κοιλότητας της. Επιπλέον, παρέχει χρήσιμα χαρακτηριστικά συμπλοκοποίησης για ευρύ φάσμα φαρμάκων.^[52] Ωστόσο, η χρήση της περιορίζεται λόγω της χαμηλής διαλυτότητας στο νερό και της τοξικότητας που εμφανίζει. Για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος, έχουν μελετηθεί η ιδιότητες των υδρόφιλων παραγώγων της β -CD, όπως η υδροξυπροπυλο- β -κυκλοδεξτρίνη (HP- β -CD), ο σουλφοβουτυλαιθέρας- β -κυκλοδεξτρίνη (SBE- β -CD) και η τυχαία μεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη (RM- β -CD).^[53,54]

4.2 Δομή και ιδιότητες της κυκλοδεξτρίνης

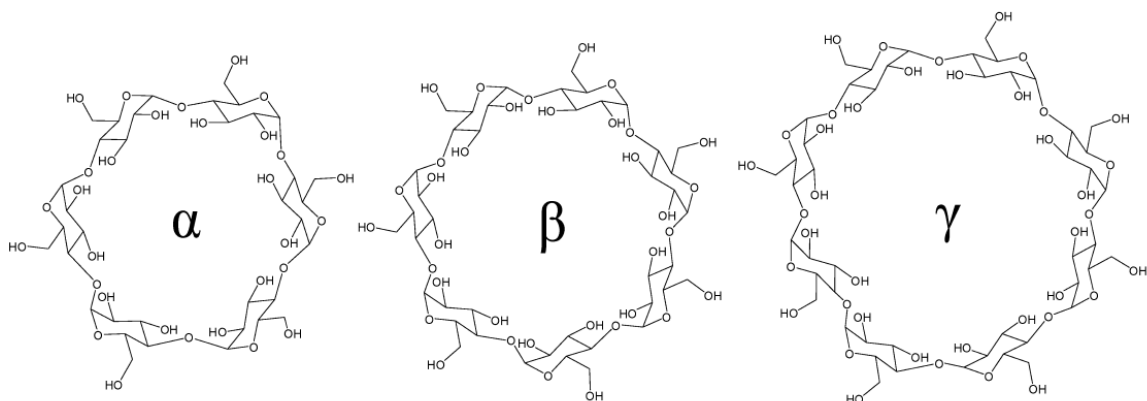
Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) αποτελούνται από έξι ή περισσότερες μονάδες D-γλυκοκυρανόζης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με α - [1,4] γλυκοζιτικούς δεσμούς και έχουν σχήμα κυλινδρικού δακτυλίου (Εικόνα 4.2.1). Όταν αποτελούνται από 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης χαρακτηρίζονται με το πρόθεμα α , β , ή γ , αντίστοιχα. Όσο ο αριθμός των μονάδων γλυκοκυρανόζης αυξάνει τόσο αυξάνει και η διάμετρος του κώνου που σχηματίζει το μόριο της κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 4.2.1 , Χημική δομή (αριστερά) και τρισδιάστατη δομή (δεξιά) των CD.

Όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα, το μόριο τους σε κάθετη τομή μοιάζει με κώλο κώνο. Το εσωτερικό της κοιλότητάς τους είναι σχετικά υδρόφοβο λόγω της παρουσίας των μεθυλενομάδων, ενώ φέρουν υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια λόγω της παρουσίας πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του μορίου, προσδίδουν στην κυκλοδεξτρίνη την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με μεγάλο αριθμό μορίων.^[55]

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες α-, β- και γ- αποτελούνται αντίστοιχα από έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης. Τα μόρια αυτά διαφέρουν μεταξύ τους, ως προς τις διαστάσεις τους και την διαλυτότητα τους στο νερό. Η χημική τους δομή παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 4.2.2).^[56]

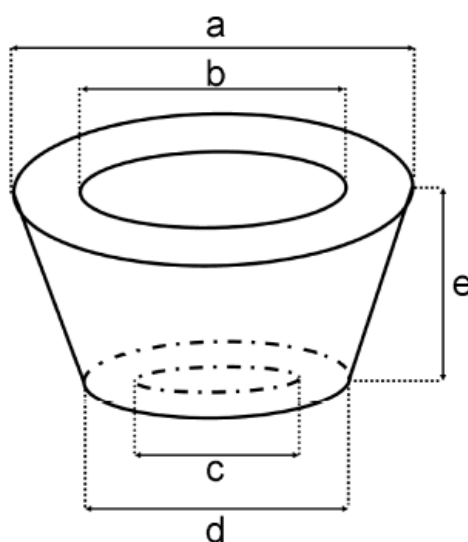


Εικόνα 4.2.2, Χημικές δομές των α-CD, β-CD και γ-CD , αντίστοιχα.

Στο παρακάτω πινάκα παρουσιάζονται οι κύριες ιδιότητες και διαστάσεις των φυσικών α,β και γ- κυκλοδεξτρινών.

Πίνακας 4.2.1, Κύριες ιδιότητες και διαστάσεις των φυσικών κυκλοδεξτρινών.^[56,57]

	α-Κυκλοδεξτρίνη	β-Κυκλοδεξτρίνη	γ-Κυκλοδεξτρίνη
Ιδιότητες			
Αριθμός μονάδων γλυκόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος (g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (%w/v)	14,5	1,85	23,2
Διαστάσεις (Εικόνα 4.2.3)			
a (nm)	1,37	1,53	1,69
b (nm)	0,57	0,78	0,95
c (nm)	0,45	0,61	0,77
d (nm)	1,32	1,49	1,61
e (nm)	0,78	0,78	0,78



Εικόνα 4.2.3, Σχηματική απεικόνιση των διαστάσεων της κυκλοδεξτρίνης

4.3 Προέλευση και παραγωγή των κυκλοδεξτρίνων

Όπως έχει αναφερθεί, οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από μονάδες γλυκόζης, συνδεδεμένες μεταξύ τους με α -[1,4] γλυκοζιτικούς δεσμούς. Είναι επίσης γνωστές ως κυκλοαμυλόζες, κυκλομαλτόζες και δεξτρίνες του Schardinger.^[57] Η παραγωγή των κυκλοδεξτρίνων είναι μία σχετικά απλή διεργασία η οποία περιλαμβάνει την κατεργασία του αμύλου με μία σειρά ενζύμων. Από αυτά, το κυριότερο ενζυμο είναι η γλυκοσυλο-τρανσφεράση των κυκλοδεξτρίνων (CGTase), η οποία παράγεται από μικροοργανισμούς, όπως είναι ο *Bacillus macerans*, η *Klebsiella oxytaca* και ο *Bacillus circulans*. Στη φύση, η ενζυματική πέψη του αμύλου με την CGTase παράγει ένα μίγμα κυκλοδεξτρίνων το οποίο αποτελείται από 6, 7 και 8 μονάδες γλυκόζης.^[58]

Κατά την παραγωγή των κυκλοδεξτρίνων, αρχικά το άμυλο υγροποιείται είτε με θέρμανση είτε με την προσθήκη α -αμυλάσης και στη συνέχεια προστίθεται η CGTάση. Η CGTάση έχει την ικανότητα να συνθέτει και τις τρεις μορφές κυκλοδεξτρίνων (α -, β - και γ -κυκλοδεξτρίνης), έτσι η ενζυμική αυτή μετατροπή οδηγεί σ' ένα μίγμα και των τριών τύπων των φυσικών κυκλοδεξτρίνων, σε αναλογίες οι οποίες εξαρτώνται από τη μορφή της κυκλοδεξτρίνης ή του ενζύμου που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Για των διαχωρισμό των τριών φυσικών κυκλοδεξτρίνων πραγματοποιείται μια σειρά τεχνικών, οι οποίες βασίζονται στη διαφορετική υδατοδιαλυτότητα των μορίων. Ειδικότερα, η β -κυκλοδεξτρίνη έχει πολύ μικρή υδατοδιαλυτότητα (18,5 g/l) και μπορεί να ανακτηθεί εύκολα με κρυστάλλωση, ενώ οι περισσότερο διαλυτές α -CD και γ -CD (145 και 232 g/l αντίστοιχα) διαχωρίζονται με τη βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών.

Επίσης, κατά τη διάρκεια της ενζυμικής μετατροπής μπορεί να προστεθεί ένας παράγοντας συμπλοκοποίησης με στόχο τον σχηματισμό συμπλόκου με την επιθυμητή κυκλοδεξτρίνη, το οποίο στη συνέχεια καθιζάνει. Ο σχηματισμός του συμπλόκου κατευθύνει την μετατροπή του αμύλου προς τη κατεύθυνση της σύνθεσης της επιθυμητής κυκλοδεξτρίνης, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα της κυκλοδεξτρίνης αυτής στο τελικό μείγμα. Στο τελικό στάδιο η κυκλοδεξτρίνη ανακτάται με φυγοκέντρηση και διαχωρίζεται από τον παράγοντα συμπλοκοποίησης. Αξίζει να αναφερθεί πως οι κυριότεροι παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το τολουολίου, η ακετόνη και η δεκανόλη. Η προσθήκη τολουενίου οδηγεί προς το σχηματισμό β -CD, η προσθήκη 1-δεκανόλης προς α -CD και η κυκλοεξαδεκανόλη προς γ -CD. Η τελική καθαρότητα των προϊόντων είναι της τάξης του 99%.^[59,60]

4.4 Εφαρμογές κυκλοδεξτρίνων (CDs)^[57,61]

Χιλιάδες τόνοι CDs παράγονται κάθε χρόνο μέσω τεχνολογιών που είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό η τιμή τους για βιομηχανικές εφαρμογές είναι πλέον προσιτή στην σημερινή αγορά. Η χρήση των CDs αφορούν εφαρμογές που αναφέρονται στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων και στη γεωργία. Στη βιομηχανία

φαρμάκων τα CDs έχουν κύρια εφαρμογή στην τυποποίηση των φαρμάκων σε μορφή ταμπλέτας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται για την μείωση της πτητικότητας, την μετατροπή υγρών ενώσεων σε κρυσταλλική μορφή, την κάλυψη δυσάρεστων οσμών ή γεύσεων στα φάρμακα και για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας. Επίσης, συμβάλλουν στην αύξηση της σταθερότητας ενός θερμικά και φωτοευαίσθητου, οξειδωτικού φαρμάκου. Στη βιομηχανία καλλυντικών, τα CDs χρησιμοποιούνται για τον μοριακό εγκλεισμό δραστικών ουσιών στα καλλυντικά. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν τις CDs ως σταθεροποιητές γαλακτωματοποιητές σε κρέμες ευρείας κατανάλωσης και σε αποσμητικά και σπρέυ.

Όσον αφορά την βιομηχανία των τροφίμων, το 80-90% της παγκόσμιας παράγωγής τους προορίζεται χάρη της σταθερότητας που προσφέρει η χρήση τους σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Επίσης, οι κυκλοδεξτρίνες καθιστούν την ανθεκτικότητα διαφόρων αρωματικών ενώσεων έναντι της οξείδωσης και της θερμικής διάσπασης. Στη γεωργία οι CDs χρησιμοποιούνται για να σχηματίζουν σύμπλοκα με αγροχημικές ουσίες, όπως ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, εντομοαπωθητικά, μυκητοκτόνα και φερομόνες.

Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή και στην αναλυτική χημεία για τον διαχωρισμό εναντιομερών. Συγκεκριμένα, οι φυσικές ή τροποποιημένες CD χρησιμοποιούνται ως πληρωτικό υλικό σε χρωματογραφικές τεχνικές, όπως την υγρή (HPLC) και αέρια χρωματογραφία (GC) και την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

4.5 Επιχλωρυδρίνη-β-κυκλοδεξτρίνη (EP-β-CD ή β-CDP)

4.5.1 Πολυμερισμένες β-κυκλοδεξτρίνες (β-CDP)

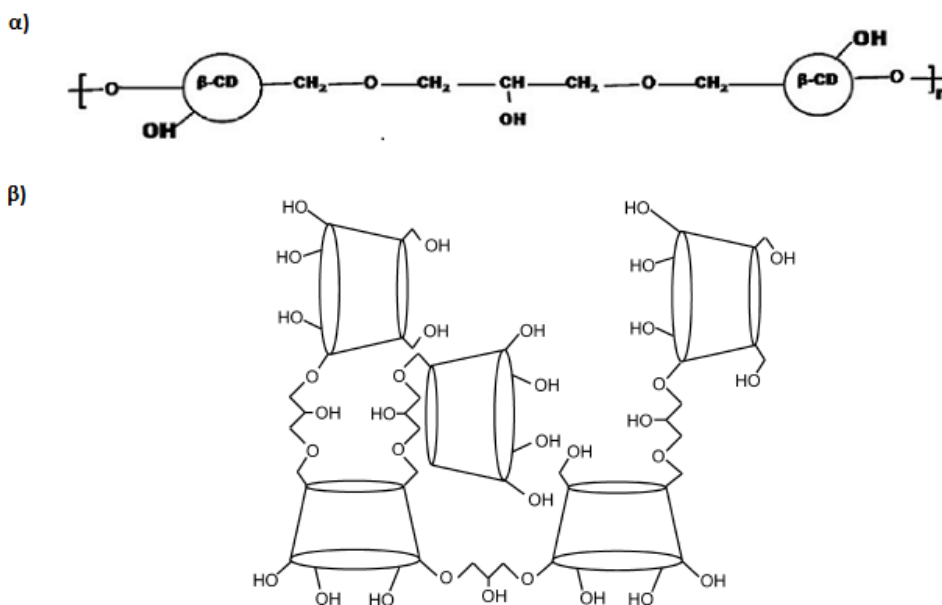
Οι πολυμερισμένες β-κυκλοδεξτρίνες (β-CDP) μπορεί να παρασκευαστούν με διασταυρώσεις (cross-linking) μεταξύ των δακτυλίων της κυκλοδεξτρίνης, με πολυμερισμό στους διλειτουργικούς υποκατάστατες που περιέχουν οι κυκλοδεξτρίνες ή με την σύνδεση της κυκλοδεξτρίνης με αλλά πολυμερή. Λόγω της εξειδικευμένης δομής τους τα μόρια β-CD διαθέτουν την ικανότητα να σχηματίζουν δίκτυα διασταυρώσεων. Συγκεκριμένα, μπορεί να σχηματίσουν σταυροδεσμούς με άμεση αντίδραση μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου τους και με έναν παράγοντα σύζευξης, ώστε να σχηματιστούν υδατοδιαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό πολυμερή.

Το β-CDP, βάσει της μεθόδου σύνθεσης του, μπορεί να είναι γραμμικό ή διακλαδωμένο. Ειδικότερα, ένας από τους τρόπους σχηματισμού των γραμμικών β-CDP είναι με τον συμπολυμερισμό των παραγώγων του βινυλίου CD. Από την άλλη, τα διακλαδωμένα β-CDP παρασκευάζονται με πολυσυμπύκνωση των CD με διλειτουργικά αντιδραστήρια οδηγώντας στον σχηματισμό υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών. Επίσης, οι πολυμερισμένες κυκλοδεξτρίνες μπορεί να είναι κατιονικής, ανιονικής ή μη ιονικής φύσης. Λόγω της παρουσίας του φορτίου τους, τα φορτισμένα β-CDP εμφανίζουν την ικανότητα συμπλοκοποίησης και διαλυτοποίησης. Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται έξω

από την κοιλότητα τους και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εντός της κοιλότητας, συμβάλλουν στη διαλυτοποίηση του φαρμάκου.^[62]

Οι πολυμερισμένες κυκλοδεξτρίνες τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να κερδίζουν το ενδιαφέρον κυρίως για εφαρμογές διαχωρισμού και καθαρισμού, για την απομάκρυνση ακαθαρσιών όπως τους ρύπους και τις τοξίνες από λύματα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτών τον σκοπό είναι οι χρωματογραφικές τεχνικές, όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και αέρια χρωματογραφία (GC). Ειδικότερα, οι πολυμερισμένες κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για την αύξηση της σταθερότητας, για την ικανότητα ενθυλάκωσης που διαθέτουν και για τον διαχωρισμό των ρύπων. Όμως, λόγω της διαλυτότητας τους στο νερό, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα. Πρόσφατα, έχουν συντεθεί αδιάλυτα στο νερό διασταυρωμένα πολυμερή επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης, τα οποία έχουν διερευνηθεί για την χρησιμότητα τους σε περιβαλλοντικές εφαρμογές. Ειδικότερα, τα πολυμερή αυτού του είδους χρησιμοποιούνται ως απορροφητικά υλικά για την απομάκρυνση των ρύπων και των χρωστικών ουσιών από τα λύματα και επίσης για την παρασκευή των υδρογελών, λόγω των ιδιοτήτων διόγκωσης που εμφανίζουν.^[63]

Κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα, η χρήση υδατοδιαλυτών πολυμερών β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD ή β-CDP) ήταν περιορισμένη. Από τον 21^ο αιώνα, και τις προσεχείς δεκαετίες, αναφέρεται η εκτεταμένη χρήση τέτοιου είδους πολυμερών. Η σύνθεση του EP-β-CD πραγματοποιείται σε ένα στάδιο συμπύκνωσης και εν συνεχεία λαμβάνει μέρος ο πολυμερισμός. Γενικά παρασκευάζεται με την προσθήκη επιχλωρυδρίνης σε β-CD, υπό αλκαλικές συνθήκες.^[62] Παρακάτω απεικονίζεται η χημική δομή και η αναλυτική αναπαράσταση της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 4.5.1, α) Χημική δομή επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης και β) αναλυτική αναπαράσταση της υδατοδιαλυτής επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης

4.5.2 Η χρήση της επιχλωρυδρίνης (EP)

Η χημική διασταύρωση (chemical cross-linking) των μορίων της κυκλοδεξτρίνης με την επιχλωρυδρίνη αποτελεί την βασική μέθοδο παράγωγης του πολυμερούς της β-CD. Αυτός ο τρόπος σύνθεσης είναι γνωστός εδώ και 50 χρόνια και είναι σχετικά εύκολος στη χρήση. Η επιχλωρυδρίνη (1-χλωρο-2,3-εποξυπροπάνιο) αποτελεί τον πιο κοινό παράγοντα διασταύρωσης στην χημεία των πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα, είναι ένας δι-λειτουργικός παράγοντας που περιέχει δυο δραστικές λειτουργικές ομάδες, την ομάδα του εποξειδίου και την χλωροαλκύλο μονάδα, οι οποίες μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς με το β-CD ή/και το ίδιο το μόριο τους. Τα πολυμερή που παρασκευάζονται καθαρίζονται πριν από τη χρήση τους και η ποσότητα της επιχλωρυδρίνης που δεν έχει αντίδραση απορρίπτεται.^[64]

4.5.3 Ιδιότητες της Επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης

Στο παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι βασικές ιδιότητες που εμφανίζει η επιχλωρυδρίνη-β-κυκλοδεξτρίνη (Πίνακας 4.5.3.1).

Πίνακας 4.5.3.1, Ιδιότητες της Επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης^[62]

Συνώνυμο	Διαλυτό πολυμερές της β-κυκλοδεξτρίνη διασταυρωμένο με 1-χλωρο-2,3-εποξυπροπάνιο
Μοριακό βάρος	112 kDa / 112.000 Da
Εμφάνιση	Λευκή ή ανοιχτόχρωμη κίτρινη άμορφη σκόνη
Καθαρότητα	>95%
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C	>50g/100mL
pH	6,5
Σημείο τήξης	230-240 °C
Φύση	Υδρόφιλο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης

Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Υλικών

2. Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης-Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Υλικών

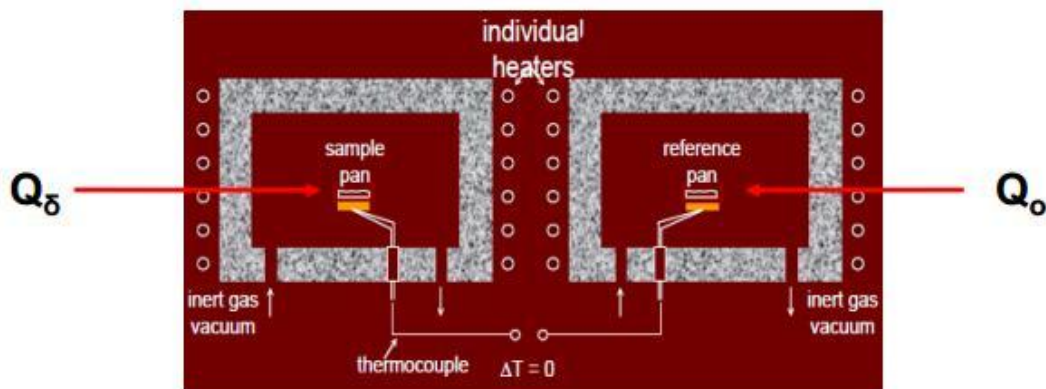
2.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calometry, DSC) ^[65]

2.1.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Κατά την διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), μελετάται η συμπεριφορά του δείγματος του πολυμερούς καθώς θερμαίνεται, σε μια θερμοκρασιακή περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφεται το ποσό θερμότητας που απαιτείται για να διατηρείται η ίδια θερμοκρασία μεταξύ του δείγματος και ενός δείγματος αναφοράς.

2.1.2 Περιγραφή διάταξης

Σε δυο θερμαινόμενους υποδοχείς τοποθετούνται κατάλληλες κυψελίδες (Αεροστεγής κάψουλα). Η μια κάψουλα, περιέχει το δείγμα και η άλλη (κάψουλα αναφοράς) είναι συνήθως κενή. Στο περιβάλλον των υποδοχέων, διοχετεύεται άζωτο, έτσι ώστε να δημιουργείται αδρανείς ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, ο θερμικός ελεγκτής αρχίζει να θερμαίνει τους υποδοχείς με συγκεκριμένο σταθερό ρυθμό θέρμανσης. Ο προσδιορισμός των θερμοκρασιών στους υποδοχείς γίνεται μέσω των θερμοστοιχείων.



Εικόνα 2.1.2.1, Απεικόνιση φούρνου DSC

2.1.3 Μελέτη με την τεχνική DSC

Με την τεχνική της DSC, μελετούνται φυσικοχημικές αλλαγές σε ένα πολυμερές. Ενδόθερμες και εξώθερμες διεργασίες καταγράφονται ως κορυφές σε γραφήματα DSC και τα αντίστοιχα εμβαδά εκφράζουν την απορροφώμενη ή εκλυόμενη ενέργεια. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να μετρηθεί η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), η θερμοκρασία (T_c) και ενθαλπία (ΔH_c) κρυσταλλώσεως, η θερμοκρασία (T_m) και ενθαλπία (ΔH_m) τήξης και η θερμοκρασία θερμικής διάσπασης (T_d). Επίσης, μπορεί να προσδιοριστεί η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης, η οποία περιλαμβάνει συνήθως ενδόθερμες αντιδράσεις. Επιπλέον, μπορούν να μελετηθούν

χημικές αλλαγές λόγω αντιδράσεων πολυμερισμού ή αντιδράσεων σκλήρυνσης ρητινών. Τέλος, μέσω της ανάλυσης DSC , γίνεται η μελέτη της κινητικής κρυστάλλωσης.

2.2 Θερμοσταθμική Ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)

2.2.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Κατά τη μέθοδο της θερμοσταθμικής ανάλυσης καταγράφεται συνεχώς η μεταβολή της μάζας μιας ουσίας κατά τη διάρκεια της θέρμανσης της. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται για την μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητας ενός υλικού. Επίσης, χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση φαινομένων αποσύνθεσης και οξειδωσης ή για την μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων, που εμφανίζονται κατά την θερμική καταπόνηση ενός δείγματος και έχουν σαν συνέπεια μεταβολές στη μάζα του.^[65]

2.2.2 Περιγραφή διάταξης

Η διάταξη αποτελείται από ένα ζυγό ακριβείας, ένα φούρνο και ένα σύστημα καταγραφής της μάζας του δείγματος έναντι του χρόνου ή της θερμοκρασίας. Η θέρμανση του δείγματος γίνεται με σταθερούς ρυθμούς θέρμανσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο ρυθμός ροής θέρμανσης είναι 5-20 °C/min. Όσον αφορά την μέτρηση της θερμοκρασίας, χρησιμοποιούνται συνήθως θερμοηλεκτρικά ζεύγη, θερμομέτρα αντίστασης ή οπτικά πυρόμετρα. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι η μέτρηση της θερμοκρασίας με την χρήση θερμοηλεκτρικού ζεύγους, το οποίο είναι τοποθετημένο πολύ κοντά στο εξεταζόμενο δείγμα.^[66]

2.2.3 Μελέτη με την τεχνική TGA

Η θερμοσταθμική καμπύλη (TG) παρουσιάζει την εξάρτηση της μεταβολής της μάζας (Δm) του δείγματος από τη θερμοκρασία (T) ή το χρόνο (t). Η παράγωγος της θερμοσταθμικής καμπύλης (DTG) εκφράζει τη μεταβολή της μάζας με το χρόνο (dm/dt) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο. Οι καμπύλες των DTG χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διακριτικότητα σε σχέση με εκείνες των TG σε διαδοχικές κυρίως αντιδράσεις. Επιπρόσθετα, στα γραφήματα αυτού του είδους εμφανίζονται πιο ευδιάκριτα διάφορες δευτερεύουσες μεταβολές στην κλίση, που συνεπάγεται αλλαγή του ρυθμού της αντίδρασης και επιπλέον η αρχική και τελική θερμοκρασία της μεταβολής. Από την άλλη, οι καμπύλες TG δίνουν περισσότερες πληροφορίες που συνδέονται με μεταβολές μάζας.^[66] Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι , σημαντικότερες παράμετροι στην θερμοσταθμική ανάλυση είναι ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος, η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, ο χρόνος ισοθερμοκρασιακής καταπόνησης, το περιβάλλον αερίου μέσα στο φούρνο και η ποσότητα του αναλυόμενου δείγματος.^[67]

2.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)^[68]

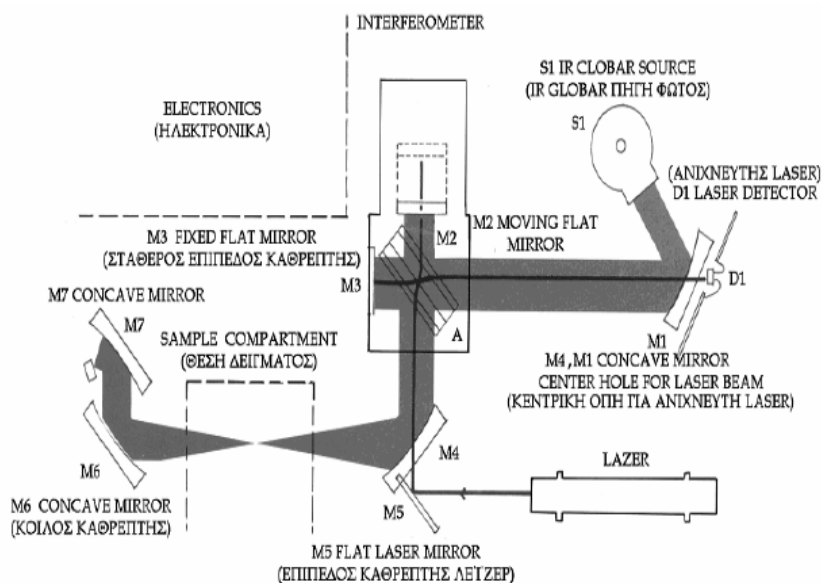
Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερύθρου στηρίζεται στην ολική ή μερική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων του φωτός, όταν αυτό διέλθει μέσω ενός δείγματος. Όποτε , μετρώντας τις επί τοις εκατό (%) μεταβολές στο υπέρυθρο φως που εξέρχεται από το δείγμα σαν συνάρτηση του μήκους κύματος ή της συχνότητας, λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης. Επίσης , η απορροφούμενη ακτινοβολία αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για

δονήσεις των ατόμων που συνιστούν το μόριο. Κατ'επέκταση, κάθε διαφορετικό μόριο δίνει το δικό του χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης.

Η υπέρυθη ακτινοβολία που απορροφάται από ένα μόριο σε συχνότητες μικρότερες των 100 cm^{-1} , μετατρέπεται σε ενέργεια μοριακής περιστροφής δεσμών (energy of molecular rotation) . Αντίστοιχα, η υπέρυθη ακτινοβολία που απορροφάται από ένα μόριο μεταξύ $10000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ μετατρέπεται σε ενέργεια μοριακής δόνησης δεσμών (energy of molecular vibration). Η συχνότητα ή το μήκος κύματος μιας απορρόφησης εξαρτώνται από τις σχετικές μάζες των ατόμων, τις σταθερές ισχύος δεσμών και τη γεωμετρία των ατόμων. Οι διάφορες θέσεις στο φάσμα IR χαρακτηρίζονται ως μονάδες μήκους κύματος, η μονάδα των οποίων είναι cm^{-1} . Επίσης , υπάρχουν δύο τύποι μοριακών δονήσεων: η δόνηση τάσης και η δόνηση κάμψης. Πιο συγκεκριμένα, η δόνηση τάσης περιλαμβάνει τη ρυθμική κίνηση κατά μήκος του άξονα του δεσμού, έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ των ατόμων να αυξάνεται ή να μειώνεται υπό μορφή ταλάντωσης. Κατά τη δόνηση κάμψης παρατηρείται είτε μεταβολή στη γωνία δύο δεσμών με κοινό άτομο, είτε μετακίνηση μιας ομάδας ατόμων ως προς το υπόλοιπο του μορίου υπό την προϋπόθεση ότι τα άτομα της εν κινήσει ομάδας μένουν ακίνητα το ένα ως προς το άλλο.

Στη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), το συμβολόμετρο Michelson αποτελεί το βασικό τμήμα της τεχνικής. Σύμφωνα με την αρχή των συμβολόμετρων Michelson, η ακτινοβολία αρχικά φθάνει σε κατανεμητή ακτινοβολίας και οι δύο επιμέρους ακτίνες συμβάλλουν μετά την ανάκλαση τους σε κάτοπτρο. Η ένταση της ακτινοβολίας μετράται συναρτήσει της μετατόπισης του κατόπτρου. Τα λαμβανόμενα συμβολογραφήματα (interferogram) δίνουν πληροφορίες σχετικά με τη συνολική απορρόφηση της ακτινοβολίας του δείγματος ανά μήκος κύματος και ένταση ως άθροισμα Fourier όλων των φασματικών γραμμών . Η διάταξη του μηχανισμού στο φασματόμετρο για τη διεργασία Fourier παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 2.3.1).

Συγκεκριμένα, το συμβολόμετρο (interferometer) είναι μια πλάκα κατασκευασμένη από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr που δεν απορροφά την IR ακτινοβολία, και κατεργασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να ανακλά το 50% της ακτινοβολίας που πέφτει πάνω της. Η πλάκα διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη και στέλνει το ένα στον καθρέπτη M1 και το άλλο μισό στον M2. Οι δύο δέσμες ανακλώνται στους καθρέπτες και γυρνούν στην πλάκα-διαχωριστή (plate-beam splitter) της δέσμης φωτός, όπου συνενώνονται πάλι σε μία δέσμη φωτός με κατεύθυνση το δείγμα της ουσίας και μετά στον ανιχνευτή .

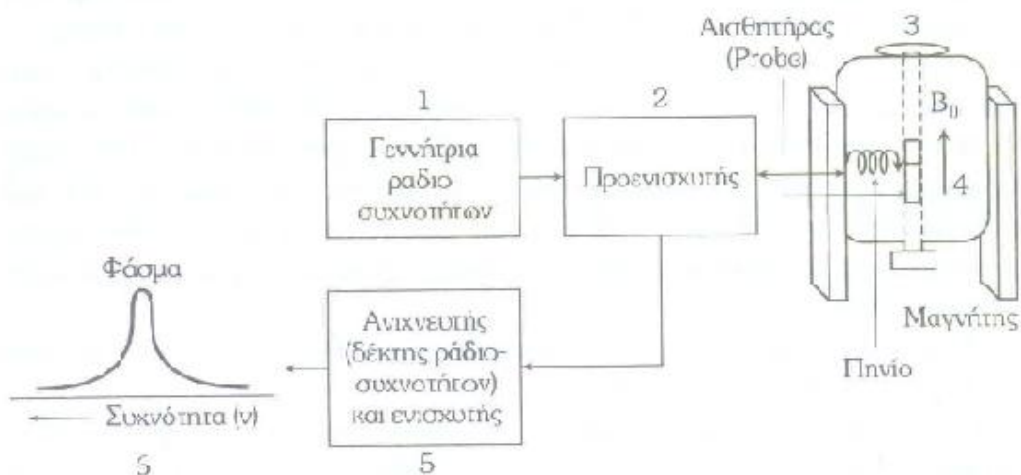


Εικόνα 2.3.1, Διάταξη φασματόμετρου μετασχηματισμού Fourier

2.4 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR)^[69]

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και με αναστροφή του σπιν οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Κατ' επέκταση, με την αναστροφή οι πυρήνες συντονίζονται με την εφαρμογή της ακτινοβολίας. Από την άλλη, η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλοεπίδραση της με τους πυρήνες του αναλυτή, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων.

Υπάρχουν δυο τύποι οργάνων NMR, τα φασματόμετρα συνεχούς κύματος (continuous wave, CW) και τα παλμικά (pulsed) ή φασματόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR). Συγκεκριμένα, στα φασματόμετρα CW συχνότητα της πηγής ή το εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο σαρώνονται αργά καταγράφοντας τα αντίστοιχα σήματα απορρόφησης. Από την άλλη, στα παλμικά φασματόμετρα NMR, το δείγμα ακτινοβολείται κάθετα προς το μαγνητικό πεδίο με περιοδικούς παλμούς ραδιοσυχνότητας, προκαλώντας ένα αποσβενυόμενο σήμα στο χρονικό διάστημα μεταξύ των παλμών. Με το μετασχηματισμό Fourier προκύπτει φάσμα NMR παρόμοιο με αυτό που λαμβάνετε από τα όργανα συνεχούς κύματος (ένταση ως προς συχνότητα).



Εικόνα 2.4.1, Σχηματική απεικόνιση ενός φασματόμετρου NMR

2.5 Υπεριώδης και Ορατή Φασματομετρία (Ultraviolet & Visible Spectrometry, UV-vis)^[70]

Η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού φωτός στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (100-800nm) από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία και υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Ειδικότερα τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας (σ , π και η τροχιακά, αντίστοιχα) μεταπηδούν στα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας. Στην πράξη οι μετρήσεις περιορίζονται στην περιοχή 800-400 nm (ορατό) και 400-190 nm (εγγύς υπεριώδες), αφού στην περιοχή 190-100 nm (άπω υπεριώδες) απορροφάει τόσο ο αέρας όσο και το υλικό κατασκευής των κυψελίδων (χαλαζίας). Η συγκέντρωση ενός στοιχείου σε διάλυμα του μπορεί να προσδιορίσει με τη μέτρηση της απορροφητικότητας του σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και εφαρμογή του νόμου του Lambert-Beer.

Στην εργαστηριακή πράξη μετράται η απορρόφηση πρότυπων διαλυμάτων και με μαθηματική επεξεργασία συσχετίζεται η συγκέντρωση με την απορρόφηση και τελικά σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς (working curve). Έτσι με την μέτρηση της απορρόφησης του αγνώστου διαλύματος προκύπτει η αντίστοιχη συγκέντρωση του από την καμπύλη αναφοράς. Τέλος η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού φωτός χρησιμοποιείται κυρίως για ποσοτικούς προσδιορισμούς, αφού τα αντίστοιχα φάσματα δίνουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες ατόμων μέσα στο μόριο και δεν χαρακτηρίζουν το μόριο ως σύνολο.

Όσον αφορά την οργανολογία της συγκεκριμένης μεθόδου, η χρησιμοποιούμενη πηγή φωτός είναι συνήθως λυχνία υδρογόνου ή δευτερίου για μετρήσεις UV και λαμπτήρας βολφραμίου για μετρήσεις στην περιοχή του ορατού. Για την απομόνωση της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χρησιμοποιείται μονοχρωμάτορας. Τα φασματόμετρα μπορεί να χωριστούν σε απλής (single beam uv-vis spectrometer) και διπλής δέσμης (dual beam uv-vis spectrometer).

2.6 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)^[71]

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο ότι, τα μόρια σε ένα διάλυμα πολυμερούς βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, λόγω της θερμικής ενέργειας που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω των συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown), με αποτέλεσμα η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα να συνδέεται ποσοτικά με την κίνηση των μορίων. Η σκέδαση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς, οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, οι οποίες συνδέονται με την κίνηση Brown. Κατ'επέκταση, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου. Παράλληλα, ο συντελεστής διάχυσης D περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σώματος μέσα σε ένα διάλυμα. Είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του πολυμερούς και με χρήση της εξίσωσης Stokes-Einstein είναι δυνατό να υπολογιστεί η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς σε αραιά διαλύματα. Επιπρόσθετα, για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας από την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, πρέπει να προηγηθεί κατάλληλη μαθηματική ανάλυση. Παρακάτω αναγράφεται η εξίσωση Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (2.6.1)$$

όπου k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα.

2.7 Ιξωδομετρία διαλύματος πολυμερούς^[65]

Με την μελέτη της ιξωδομετρίας διαλύματος πολυμερούς πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους. Η ιξωδομετρία, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη για τέτοιου είδους προσδιορισμούς γιατί συνδυάζει ταχύτητα και ευκολία στην υλοποίηση. Προϋποθέτει όμως την ύπαρξη κατάλληλου διαλυτή για το εξεταζόμενο πολυμερές.

Το ιξώδες ενός αραιού διαλύματος πολυμερούς αποτελεί το μέτρο μεγέθους ή της έκτασης των διαλυμένων μορίων του στο χώρο. Το απόλυτο ιξώδες(η) συσχετίζεται με το χρόνο εκροής του υγρού και με τις διαστάσεις του ιξωδομέτρου σύμφωνα με την εξίσωση του Poiseuille:

$$\eta = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 V l} \quad (2.7.1)$$

όπου, ΔP : η διαφορά πίεσης ανάμεσα στα δυο άκρα του τριχοειδούς (mPa)
 r : η ακτίνα του τριχοειδούς (cm)
 t : ο χρόνος εκροής του υγρού (s)
 V : ο όγκος του εκρέοντος υγρού (mL)
 l : το μήκος του τριχοειδούς του ιξωδομέτρου(cm)

Όταν η πίεση στα άκρα του σωλήνα είναι ίση με την υδροστατική πίεση(την εξασκούμενη από τη στήλη του υγρού), η σχέση Poiseuille συμπεριλαμβάνει την πυκνότητα του υγρού (ρ) και την επιτάχυνση της βαρύτητας (g):

$$\eta = \frac{\rho g h \pi r^4 t}{8 V l} \quad (2.7.2)$$

ή

$$\eta = K_{\text{ιξωδομέτρου}} \cdot t \cdot \rho \quad (2.7.3)$$

όπου, η : το απόλυτο ιξώδες (cP)
 ρ : η πυκνότητα του υγρού (g/mL)
 $K_{\text{ιξωδομέτρου}} = \frac{g h \pi r^4}{8 V l}$: η σταθερά του ιξωδομέτρου (mm^2/s^2)
 t : ο χρόνος εκροής (s)

Στην ιξωδομετρία πολυμερών , η εξίσωση (2.7.3) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των διαφόρων εκφράσεων ιξώδους (όπως : Κινηματικό ιξώδες(ν), Σχετικό ιξώδες(RV) , Ειδικό ιξώδες(η_{sp}), Ανηγμένο ιξώδες(η_{red}), Συμφυές ιξώδες(η_{inh}), Εσωτερικό ιξώδες($[\eta]$)), τόσο του διαλυτή όσο και του διαλύματος του πολυμερούς, με την χρήση των αντίστοιχων χρόνων εκροής. Αξίζει να αναφερθεί ότι , ο οριακός αριθμός ιξώδους συνδέετε με το μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος μέσω της εξίσωσης των Mark-Houwling-Sakurada (2.7.4) , η όποια αναγράφεται παρακάτω :

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad (2.7.4)$$

όπου, K και a σταθερές για ορισμένη θερμοκρασία και σύστημα πολυμερούς-διαλύτη.

Πειραματικό μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

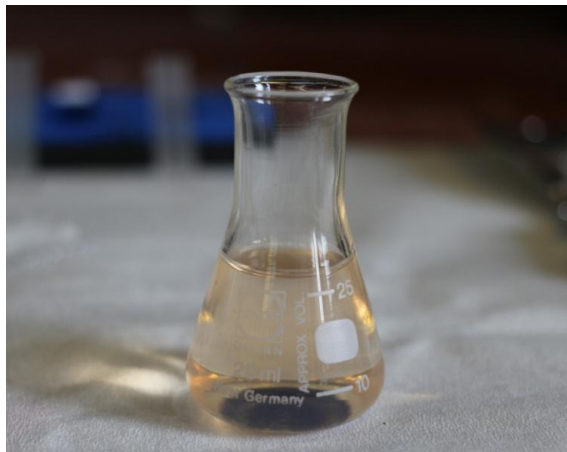
Σκοπός της Εργασίας

3. Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των παραμέτρων της διεργασίας εγκλεισμού ενός φυσικού προϊόντος (υδροξυτυροσόλη) σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) και η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με διασταυρωμένο πολυμερές επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης(EP-β-CD).

Ο νανοεγκλεισμός των ενώσεων συμβάλλει στην προσαρμογή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους, όπως την φωτοευαισθησία και υδροφοβικότητα, και στην βελτίωση της σταθερότητας τους.

Η υδροξυτυροσόλη (HT), που επιλέχθηκε για μελέτη στην παρούσα εργασία, είναι ένα φυσικό προϊόν με εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση, το οποίο εμφανίζει ευαισθησία στον αέρα και στο φως, καθώς μπορεί εύκολα να αποικοδομηθεί και να μετατραπεί σε μη επιθυμητά αδρανή παράγωγα. Κατ' επέκταση, ο εγκλεισμός της σε πολυμερικά νανοσωματίδια αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη βελτίωση της σταθερότητας της ένωσης. Παρακάτω παρουσιάζεται η μορφή του διαλύματος της HT, όταν αφηθεί για λίγη ώρα στο περιβάλλον. Όπως φαίνεται, από διαφανές διάλυμα μετατρέπεται σε πορτοκαλί.



Εικόνα 3.1, Διάλυμα αποικοδομημένης HT

Ένα από τα προβλήματα που παρουσιάζεται με τη χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων, είναι η τάση τους να εμφανίζουν το φαινόμενο της απότομης αποδέσμευσης (Initial drug release-burst effect). Βάσει διαφόρων ερευνητικών άρθρων έχει προταθεί για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, η χρήση της κυκλοδεξτρίνης ως μέσο επικάλυψης στα νανοσωματίδια. Συγκεκριμένα, η κυκλοδεξτρίνη διαθέτει την ικανότητα να απορροφάται πάνω στην υδρόφοβη επιφάνεια των νανοσωματιδίων του πολυ(γαλακτικού οξέος) και συμβάλλει στην διαλυτότητα και σταθερότητα τους στο νερό. Κατά συνέπεια, δημιουργούνται νανοσωματίδια PLA που εμφανίζουν υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και η έτσι αυξάνεται η σταθερότητα τους στο μέσο αποδέσμευσης και επιβραδύνεται η απελευθέρωση των εγκλωβισμένων ουσιών.

Για τον παραπάνω λόγο, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ικανότητα επικάλυψης νανοσωματιδίων πολυ(γαλακτικού) οξέος, που προέρχονται από πολυμερή διαφορετικών μοριακών βαρών, από διασταυρωμένο πολυμερές EP-β-CD. Επιλέχθηκε αυτό το πολυμερές ως υλικό επικάλυψης γιατί είναι υδατοδιαλυτό και μπορεί εύκολα να παρασκευαστεί μέσω αντίδρασης της β-κυκλοδεξτρίνης με επιχλωρυδρίνη παρουσία βάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματικές Διεργασίες

4. Πειραματικές Διεργασίες

4.1 Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης

❖ Αντιδραστήρια

- 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ
- Μεθανόλη υψηλής καθαρότητας
- Πυκνό θειικό οξύ (H₂SO₄)
- Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl
- Θειικό νάτριο (Na₂SO₄)
- Άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF)
- Υδριδίο λιθίο-αργιλίο (LiAlH₄)
- Υδατικό διάλυμα 5% HCl

❖ Όργανα & Συσκευές

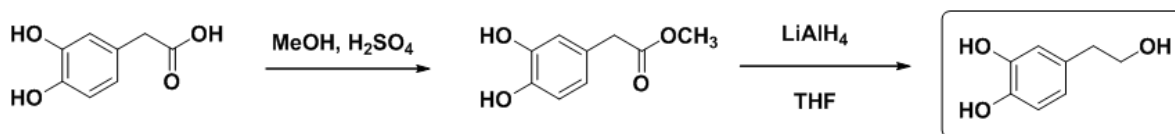
- Σφαιρική φιάλη, 50 mL
- Κάθετος ψυκτήρας
- Περιστροφικός εξατμιστήρας
- Μαγνητικός αναδευτήρας

❖ Πειραματική Διαδικασία

Εισαγωγή

Η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιείται σε δυο στάδια. Συγκεκριμένα, λαμβάνει μέρος η αντίδραση εστεροποίησης του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος, προς σχηματισμό του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος. Κατά το δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η ανάγωση του εστέρα, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό της υδροξυτυροσόλης όπως παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 4.1.1).^{[1],[2]}

¹ Narayanan J., Hayakawa Y., Fan J., Kirk K., "Convenient Synthesis of biogenic aldehydes, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde", *J. Bioorganic Chemistry*. **2013**,31, 191-197.



Εικόνα 4.1.1, Στάδια σύνθεσης της Υδροξυτυροσόλης

4.1.1 Σύνθεση του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται κατά σειρά οι εξής ουσίες : 17,5 mL μεθανόλης , 0,5 g (3 mmol) 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 0,5 mL πυκνού H_2SO_4 . Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες, στη θερμοκρασία βρασμού του διαλύτη ($78^{\circ}C$). Αξίζει να αναφερθεί ότι, λόγω της φωτο-ευαισθησίας του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος, προσαρμόζεται στη σφαιρική φιάλη αλουμινοχάρτο. Παράλληλα, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα προκειμένου να εξατμιστεί η μεθανόλη που απομένει. Στο υπόλειμμα, προστίθενται 20 mL οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και το διάλυμα εκχυλίζεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα $NaHCO_3$ και κορεσμένο διάλυμα $NaCl$. Τέλος, η οργανική φάση απομονώνεται και με προσθήκη Na_2SO_4 ξηραίνεται. Ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση υπό πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης εμφανίζει ελαιώδη μορφή με ανοιχτό καφέ χρώμα.

- ✓ **Απόδοση αντίδρασης :** 377mg (67 %)
- ✓ **Ανάλυση NMR:**
 - 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6.75-6.59 (m, 3H, αρωματικά H), 3.66 (s,3H, OCH_3), 3.48 (s,2H, CH_2)
 - ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 40.34, 52.37, 115.51, 116.424, 121.577, 125.963, 143.243, 143.994, 173.863

² Zhang Z., Xiao B., Lian X., " Synthesis and Biological Evaluation of Caffeic Acid 3,4- Dihydroxyphenyl Ester", *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 252-254.

4.1.2 Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL διαλύονται 0,377g του εστέρα ,που παράχθηκε στο προηγούμενο στάδιο, σε 24 mL άνυδρου THF και κατά σειρά προστίθενται 0,16 g υδριδίου λιθίου-αργιλίου (LiAlH_4), με προσοχή γιατί είναι εύφλεκτη ουσία. Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστίθενται περίπου 10 mL υδατικού διαλύματος 5% HCl και πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με περίπου 8 mL EtOAc, η κάθε εκχύλιση. Εν συνεχεία, με στόχο την εξάτμιση των διαλυτών που απομένουν, το διάλυμα τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και σε αντλία υψηλού κενού. Κατ' επέκταση , λαμβάνεται το τελικό προϊόν το οποίο εμφανίζει υψηλή καθαρότητα.

- ✓ **Απόδοση αντίδρασης :** 350 mg(75 %)
- ✓ **Ανάλυση NMR:**
 - $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 6.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H)
 - $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 145.77, 144.25, 131.61, 121.18, 116.95, 116.22, 64.39, 39.31



Εικόνα 4.1.2.1, Πειραματική διάταξη της αντίδρασης

4.2 Σύνθεση πολυμερούς β-κυκλοδεξτρίνης (poly-β-CD ή EP-β-CD)

❖ Αντιδραστήρια

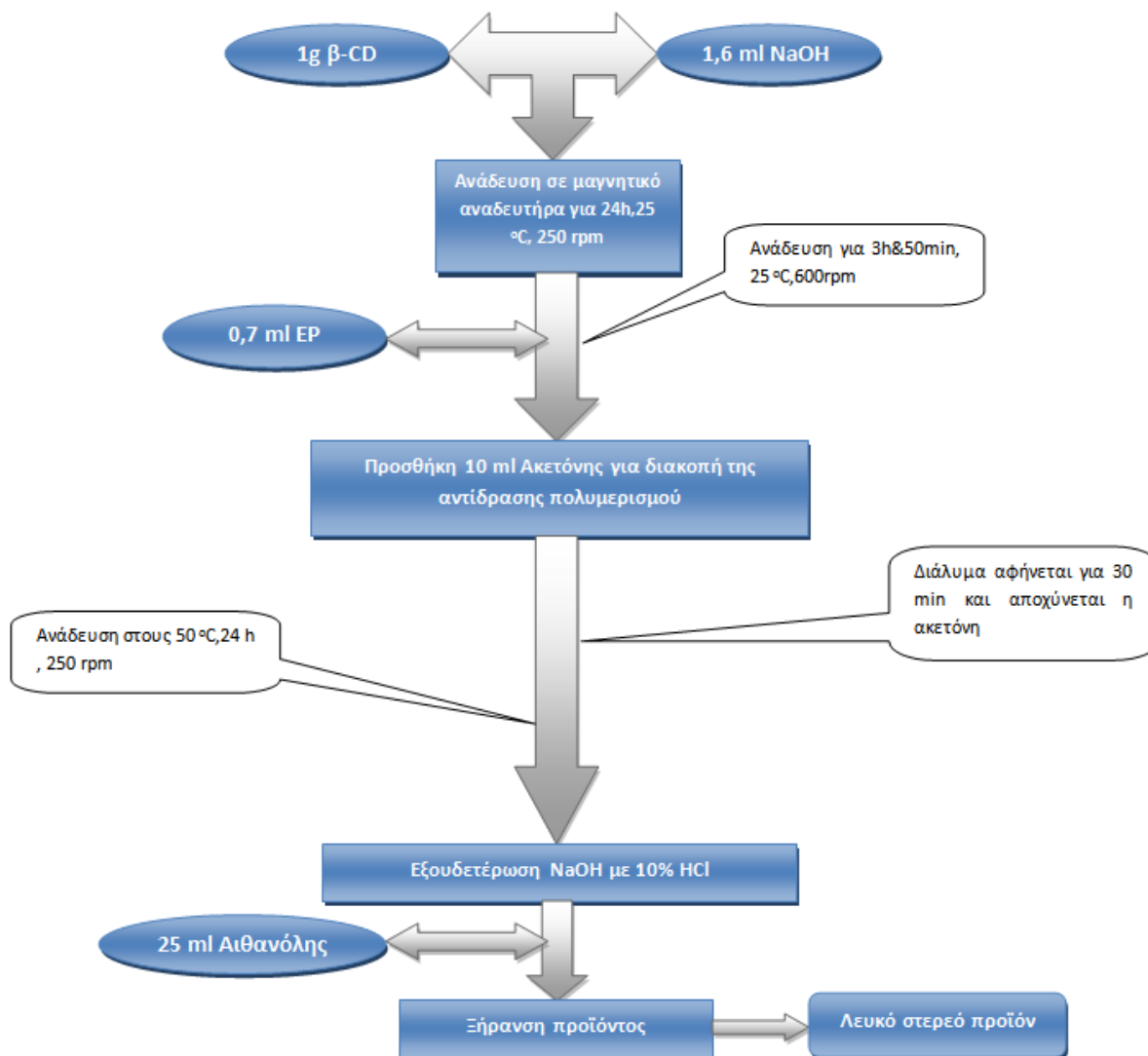
- β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD)
- Επιχλωρυδρίνη (EP)
- NaOH
- Ακετόνη, υψηλής καθαρότητας
- Διάλυμα 10% HCl
- Αιθανόλη , υψηλής καθαρότητας

❖ Όργανα & Συσκευές

- Σφαιρική των 100 ml και 50 ml
- Ψυκτήρας
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Πεχαμετρικό χαρτί
- Σύριγγα 1 ml
- Φιάλη διήθησης υπό κενό
- Ξηραντήρας

❖ Πειραματική Διαδικασία

Παρακάτω παρουσιάζεται μια ενδεικτική διαδικασία σύνθεσης του EP-β-CD, στην οποία βασίζονται οι διαδικασίες σύνθεσης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Χρήσιμες πληροφορίες για την σύνθεση :

- Το μοριακό βάρος της β-CD είναι: $MB=1134,98 \text{ g/mol}$
- Η EP έχει πυκνότητα, $\rho=1,180 \text{ g/ml}$, και μοριακό βάρος, $MB=92,52 \text{ g/mol}$
- Διάλυμα NaOH 33% w/w παρασκευάζεται με αραιώση 5 g NaOH σε 10 ml απιονισμένου νερού.

A) 1g β-CD, γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10, $t_{\text{πολυμερισμού}}=3\text{hr \& 50 min}$

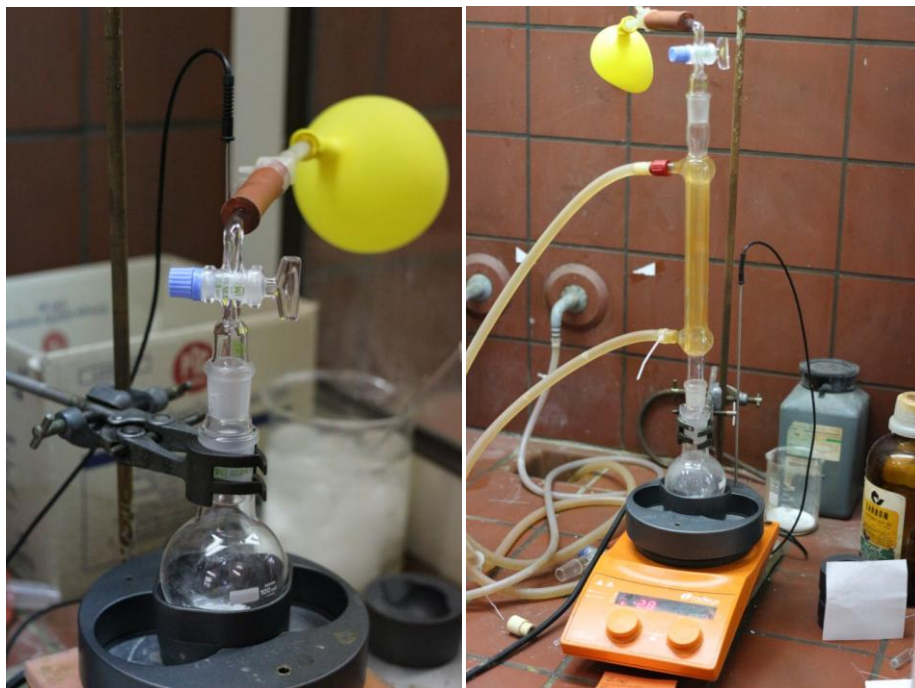
Η διαδικασία σύνθεσης του πολυμερούς της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10 και NaOH=33% w/w , έχει ως εξής :

Σε μια σφαιρική των 100 ml προστίθεται 1,6 ml διαλύματος NaOH και 1 g β-CD (0,881 mmol). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση (250 rpm) για 24 ώρες , σε θερμοκρασία δωματίου και σε αδρανή ατμόσφαιρα. Έπειτα , το λευκό τήγμα που προκύπτει θερμαίνεται μέχρι τους 30 °C και προστίθενται 0,7 ml EP ραγδαία, με χρήση σύριγγας* του 1 ml. Στη σφαιρική εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα τίθεται σε ανάδευση στα 600 rpm, σε θερμοκρασία 30 °C και για χρόνο πολυμερισμού 3 ώρες και 50 λεπτά. Για την διακοπή της αντίδρασης, προστίθενται 10 ml ακετόνης και αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου . Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόχυση για την απομάκρυνση της ακετόνης και προκύπτει ένα λευκό τήγμα. Το τήγμα πολυμερούς θερμαίνεται στους 50 °C και τίθεται σε ανάδευση στα 250 rpm για 24 ώρες.

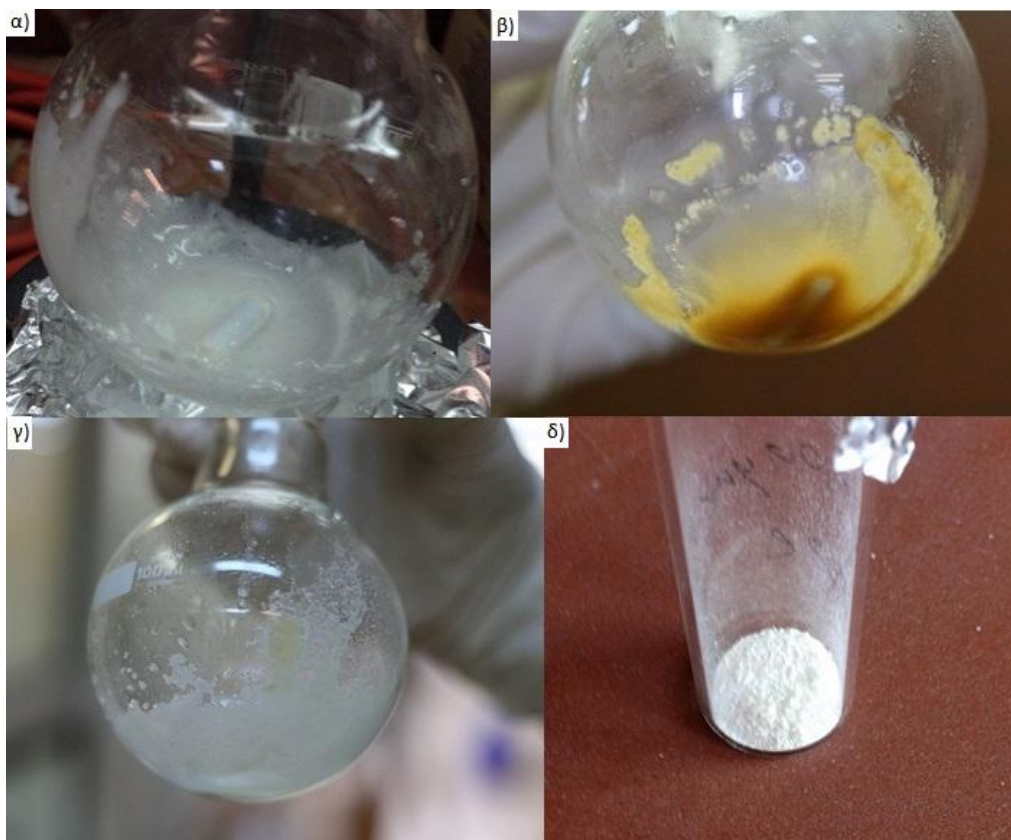
Μετά το πέρας των 24 ωρών, το τήγμα αφήνεται να επέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και πραγματοποιείτε η εξουδετέρωση του NaOH που έχει απομείνει. Συγκεκριμένα, καθώς αναδεύεται το διάλυμα προστίθεται ποσότητα 10% HCl, και παράλληλα μετριέται το pH του. Η προσθήκη συνεχίζεται μέχρι το διάλυμα να γίνει ουδέτερο (pH=7). Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη αιθανόλης (25 ml) και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να καταβυθιστεί η ποσότητα του πολυμερούς. Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί ότι, η προσθήκη αυτή πραγματοποιείται και για να απομακρυνθεί το διάλυμα του HCl γιατί το πολυμερές σε όξινες συνθήκες αποικοδομείται, δηλαδή από χρώμα λευκό μετατρέπεται σε κόκκινο-μπορντό. Εν συνεχεία, μόλις καταβυθιστεί όλη η ποσότητα του πολυμερούς , το διάλυμα οδηγείται προς διήθηση και λαμβάνεται μια άσπρη σκόνη το οποίο φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

**Χρήση EP : Η επιχλωρυδρίνη είναι τοξική και εύφλεκτη ουσία , για το λόγο αυτό κατά την χρήση της χρησιμοποιούνται γυαλιά προστασίας και διάλυμα διχλωρομεθανίου (DCM) για την έκπλυση της ουσίας από την σύριγγα.*

- ✓ **Τελικό προϊόν που παραλήφτηκε : 600 mg**
- ✓ **Ανάλυση NMR του EP-β-CD : $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 4.96 (br s), 3.79-3.55(m)**
- ✓ **Ανάλυση του β-CD : $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 4.99 (d, $J=3.6$ Hz,1H,H-1), 3.89 (t, $J=9.3$ Hz, 1H, H-5), 3.81-3.77 (m,3H), 3.60-3.48 (m,2H)**



Εικόνα 4.2.1, Πειραματική διάταξη ανάδευσης β-CD και NaOH (Αριστερά). Πειραματική διάταξη αντίδρασης πολυμερισμού (Δεξιά)



Εικόνα 4.2.2, α) Λευκό τήγμα πολυμερούς, β) Τήγμα πολυμερούς μετά την θέρμανση στους 50 °C, γ) Καταβυθισμένο προϊόν πολυμερούς μετά την απόχωση της αιθανόλης, δ) Τελικό προϊόν



Εικόνα 4.2.3, Αποικοδομημένο πολυμερές

**B) 500 mg β-CD, γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10,
 $t_{\text{πολυμερισμού}}=16\text{hr}$**

Η διαδικασία σύνθεσης του πολυμερούς της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10 , NaOH=33% w/w και $t_{\text{πολυμερισμού}}=16\text{hr}$ είναι ίδια με την προαναφερόμενη πειραματική διαδικασία. Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζει έχουν ως εξής :

- ✓ Σε μια σφαιρική των 50 ml προστίθεται 0,8 ml διαλύματος NaOH σε 500 mg β-CD (0,44 mmol).
- ✓ Προστίθενται 0,35 ml EP
- ✓ Ο χρόνος πολυμερισμού είναι 16 ώρες

Μετά τον πολυμερισμό διακόπτεται η σύνθεση γιατί εμφανίζεται το ζελάρισμα του πολυμερούς (Εικόνα 4.2.4).



Εικόνα 4.2.4, Κίτρινο ζελέ- Φαινόμενο ζελαρίσματος της δομής του πολυμερούς

Γ) 500 mg β-CD, γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10, $t_{\text{πολυμερισμού}}=6\text{hr}$

Η διαδικασία σύνθεσης του πολυμερούς της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10 , NaOH=33% w/w και $t_{\text{πολυμερισμού}}=6\text{hr}$ είναι ίδια με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην 4.2 Α). Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζει έχουν ως εξής :

- ✓ Σε μια σφαιρική των 50 ml προστίθεται 0,8 ml διαλύματος NaOH σε 500 mg β-CD (0,44 mmol).
- ✓ Προστίθενται 0,35 ml EP
- ✓ Ο χρόνος πολυμερισμού είναι 6 ώρες

Μετά τον πολυμερισμό διακόπτεται η σύνθεση γιατί εμφανίζεται το ζελάρισμα του πολυμερούς.

Δ) 500 mg β-CD, γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=12, $t_{\text{πολυμερισμού}}=3\text{hr}$ & 50 min

Η διαδικασία σύνθεσης του πολυμερούς της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=12 , NaOH=33% w/w και $t_{\text{πολυμερισμού}}=3\text{hr}\&50\text{min}$ είναι ίδια με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην 4.2 Α). Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζει έχουν ως εξής :

- ✓ Σε μια σφαιρική των 50 ml προστίθεται 0,8 ml διαλύματος NaOH σε 500 mg β-CD (0,44 mmol).
- ✓ Προστίθενται 0,41 ml EP

Σε αυτή την περίπτωση παραλαμβάνεται άσπρη σκόνη το οποίο φυλάσσεται σε ξηραντήρα

- ✓ **Τελικό προϊόν που παραλήφτηκε : 285,7 mg**

4.3 Χαρακτηρισμός των πολυμερών

❖ Αντιδραστήρια

- Χλωροφορμίο
- Απιονισμένο νερό (d.H₂O)
- PLA (MB=51.700 g/mol)
- β-κυκλοδεξτρίνη
- Poly-β-CD

❖ Όργανα & Συσκευές

- Κωνική φιάλη με σμύρισμα
- Ιξωδόμετρο τριχοειδούς μορφής τύπου Ubbelohde
- Θερμαινόμενο υδατόλουτρο
- Συσκευή Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System
- Θερμοζυγός Mettler Toledo TGA/DSC 1 STAR^e System

❖ Πειραματική Διαδικασία

4.3.1 Ανάλυση ιξωδομετρίας- Προσδιορισμός μέσου ιξώδους μοριακού βάρους

Στην παρούσα εργασία προσδιορίζεται το μοριακό βάρος του πολυ(γαλακτικού οξέος) και τον οριακό αριθμό ιξώδους ($[\eta]$) του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης. Συγκεκριμένα, για τις μετρήσεις ιξωδομετρίας χρησιμοποιείται ιξωδόμετρο τριχοειδούς μορφής τύπου Ubbelohde (Εικόνα 4.3.1.1) σταθεράς $K= 0,002807 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$.



Εικόνα 4.3.1.1, Ιξωδόμετρο τύπου Ubbelohde

Όπως έχει αναφερθεί, το σχετικό και το ειδικό ιξώδες υπολογίζονται απευθείας από το χρόνο εκροής του διαλύματος του πολυμερούς και το χρόνο εκροής του καθαρού διαλύτη. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο ίδιο ιξωδόμετρο και η πυκνότητα του διαλύματος θεωρείται ίση με αυτή του διαλύτη, λόγω της παραδοχής των αραιών διαλυμάτων. Το σχετικό ιξώδες υπολογίζεται από την εξής σχέση:

$$RV = \frac{t}{t_0} \quad (4.3.1.1)$$

Ο προσδιορισμός του οριακού αριθμού ιξώδους $[\eta]$, για τα δυο συστήματα πολυμερούς-διαλύτη που μελετάτε, γίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$[\eta] = \frac{1}{c} \sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_{red})} \quad (4.3.1.2)$$

Τέλος, βάσει της εξίσωσης Mark-Houwink-Sakurada ($[\eta]=K \cdot M^a$) προσδιορίζεται το μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος (\overline{M}_v), υπολογίζοντας αρχικά το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$. Οι εξισώσεις και η ονομασία των διαφορετικών ιξώδων που χρησιμοποιούνται, αναγράφονται στο παρακάτω Πίνακα.

Πινάκας 4.3.1.1, Εξισώσεις και ορολογία ιξώδων^[3]

Όρος	ISO (IUPAC)	BS 5168
$RV = \eta/\eta_0$ Όπου, η το απόλυτο ιξώδες διαλύματος, και η_0 το απόλυτο ιξώδες του διαλύτη	Λόγος ιξώδους (Viscosity Ratio)	Σχετικό ιξώδες (Relative viscosity)
$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = RV - 1$	Σχετική αύξηση ιξώδους	Ειδικό ιξώδες (Specific Viscosity)
$\eta_{red} = (\eta - \eta_0)/(\eta_0 \cdot C)(dl/g)$ Όπου, C η συγκέντρωση του διαλύματος (g/100mL διαλύτη)	Αριθμός ιξώδους	Ανηγμένο ιξώδες (Reduced Viscosity)

³ Κ.Δ. Παπασπυρίδης, "ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ", Αθήνα 2014, σελ. 49-53.

❖ Προετοιμασία διαλύματος PLA

Για την παρασκευή διαλύματος 0.2% κ/β διαλύτη , αρχικά ζυγίζονται 0,06 g δείγματος PLA, το οποίο έχει υποστεί ξήρανση και εν συνέχεια το δείγμα διαλύεται σε 25 ml χλωροφορμίου (CHCl₃) σε κωνική φιάλη , το οποίο έχει σμύρισμα έτσι ώστε να μην εξατμιστεί ο διαλύτης . Η ανάδευση του διαλύματος πραγματοποιείται μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές (περίπου 2 ώρες). Παράλληλα, 25 ml χλωροφόρμιου προστίθενται στο ιξωδόμετρο σε σημείο μεταξύ της κάτω και άνω χαραγής του. Το ιξωδόμετρο τοποθετείται στο λουτρό το οποίο βρίσκεται στους 30 °C και μετά από 20 λεπτά , υπολογίζεται ο χρόνος εκροής του διαλύτη (t_0) ανάμεσα στις δύο χαραγές του ιξωδομέτρου ,με αναρρόφηση του διαλύματος. Στη συνέχεια το προς μέτρηση διάλυμα εισάγεται στο ιξωδόμετρο και επαναλαμβάνεται η προαναφερθείσα διαδικασία ,στους 30 °C ,με σκοπό τον υπολογισμό του χρόνου εκροής του διαλύματος πολυμερούς(t). Για κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις, η απόκλιση μεταξύ των οποίων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2% και λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων αυτών.

Η σταθερές της εξισώσεως Mark-Houwling-Sakurada που χρησιμοποιούνται για το PLA στους 30°C και σε διαλύτη χλωροφόρμιο, είναι $K=1,31 \cdot 10^{-4}$ dL/ g και $a=0,777$.^[4]

❖ Προετοιμασία διαλύματος Poly-β-CD

Για την παρασκευή διαλύματος 0.5% κ/β διαλύτη , αρχικά ζυγίζονται 0,15 g δείγματος Poly-β-CD, το οποίο έχει υποστεί ξήρανση και εν συνέχεια το δείγμα διαλύεται σε 30 ml απιονισμένου νερού σε κωνική φιάλη , το οποίο έχει σμύρισμα. Η ανάδευση του διαλύματος πραγματοποιείται μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές (περίπου 24 ώρες). Για τον προσδιορισμό του χρόνου εκροής του διαλυτή και του διαλύματος πολυμερούς , η διαδικασία είναι ίδια με την προαναφερθείσα του PLA, με την διάφορα ότι η μέτρηση του ιξώδους γίνεται στους 25 °C.

Αξίζει να αναφερθεί ότι , για την σωστή χρήση του ιξωδόμετρου και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του με ακετόνη ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα ή ακαθαρσίες από προηγούμενες μετρήσεις .

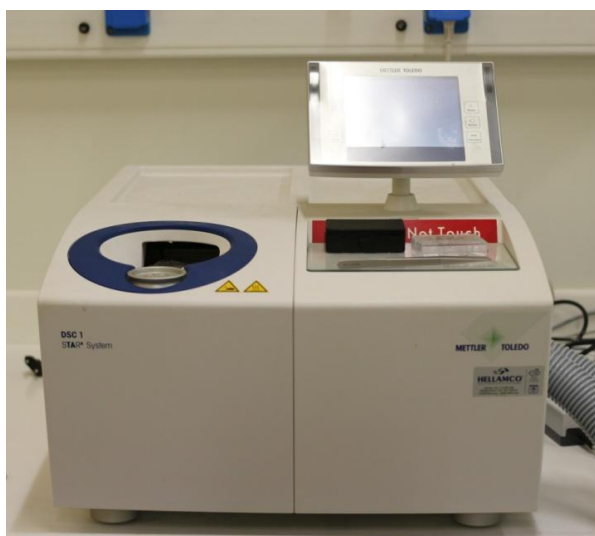
⁴ Janzen, J., Dorgan, J.R., Knauss, D.M., Hait, S.B., and Limoges, B.R., "Fundamental solution and single-chain properties of polylactides", *Macromolecules*, **2003**.

4.3.2 Ανάλυση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Εισαγωγή

Με την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), μπορεί να προσδιοριστούν φυσικές και χημικές αλλαγές σε ένα πολυμερές. Συγκεκριμένα, η ανάλυση παρέχει πληροφορίες για την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), θερμοκρασία (T_c) και ενθαλπία (ΔH_c) κρυσταλλώσεως, θερμοκρασία (T_m) και ενθαλπία (ΔH_m) τήξης, θερμοκρασία θερμικής διάσπασης (T_d) και την θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης. Οι πληροφορίες αυτές, λαμβάνονται μέσω ενός θερμογραφήματος με την βοήθεια ειδικού λογισμικού.

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω.

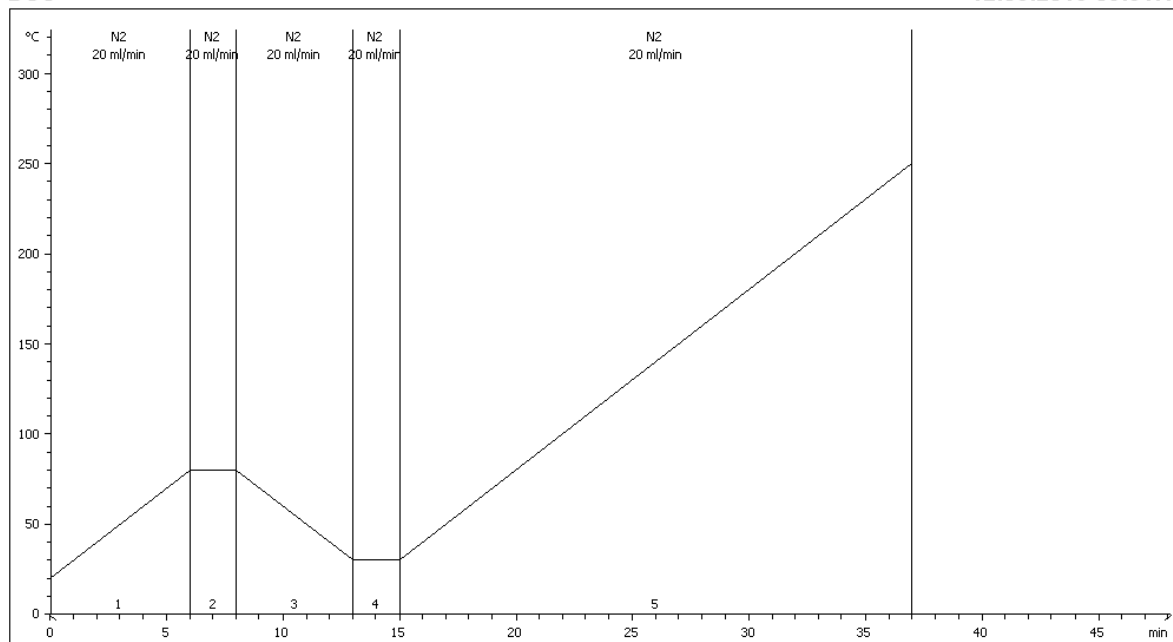


Εικόνα 4.3.2.1, συσκευή Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System

Ανάλυση DSC για το PLA (MB=51.700 g/mol)

Αρχικά, ποσότητα PLA ξηραίνεται και στη συνέχεια ζυγίζονται 7,23 mg, τα οποία τοποθετούνται σε ειδικό καψίδιο (pan) που σφραγίζεται αεροστεγώς. Έπειτα, επιβάλλεται στο δείγμα θέρμανση με θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 180 °C, με συνεχή παροχή αζώτου 20 ml/min και με ρυθμό ροής θερμότητας 10 °C/min.

Η μέθοδος που επιλέγεται για την ανάλυση έχει ως εξής: Αρχικά πραγματοποιείται θέρμανση για 2 λεπτά στους 80 °C, με σκοπό να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα και υγρασία. Εν συνεχεία, το δείγμα ψύχεται στους 30 °C όπου υπάρχει περίπτωση να εμφανιστεί στο γράφημα η T_g . Η θερμοκρασία αφήνεται για 2 λεπτά στους 30 °C, ώστε να σταθεροποιηθεί. Τέλος, θερμαίνεται με ρυθμό ροής 10 °C/min μέχρι τους 250 °C όπου αναμένεται να αντληθούν πληροφορίες για την T_g , T_m και ΔH_m . Η μέθοδος παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα.



Lab: METTLER

STAR® SW 9.20

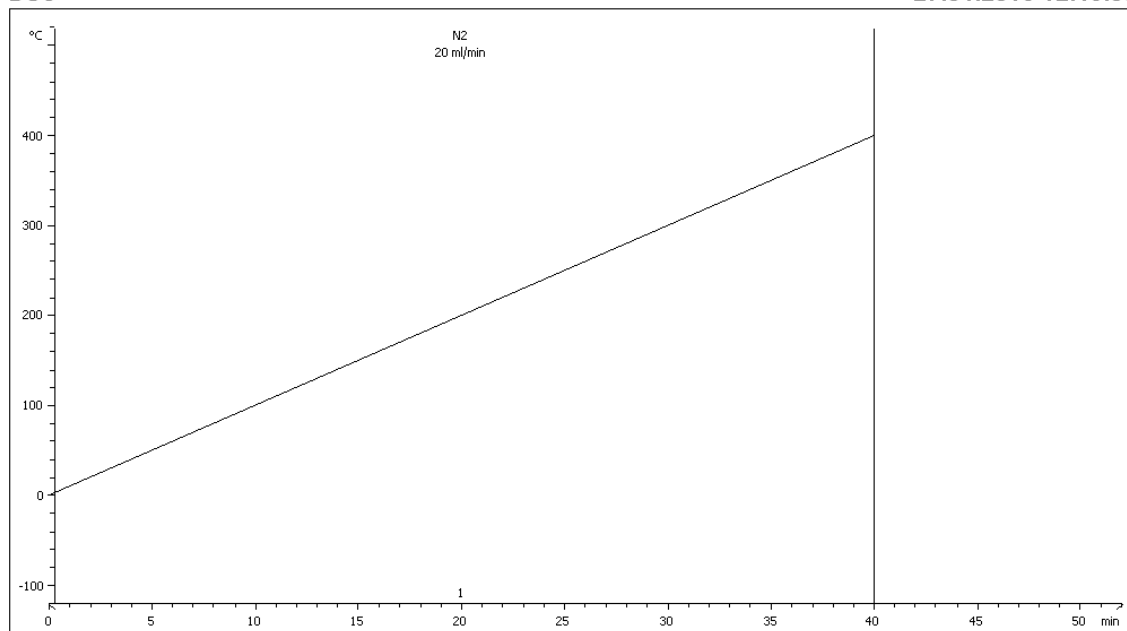
Διάγραμμα 4.3.1, Μέθοδος ανάλυσης DSC

Ανάλυση DSC για το β-CD και Poly-β-CD

Αρχικά ζυγίζονται 7,99 mg β-CD και 7,59 mg Poly-β-CD , τα οποία τοποθετούνται σε καψίδια. Η ανάλυση που πραγματοποιείται είναι ίδια και για τα δυο δείγματα. Συγκεκριμένα, επιβάλλεται σε κάθε δείγμα θέρμανση με θερμοκρασιακό εύρος από 0 έως 400 °C, με συνεχή παροχή αζώτου 20 ml/min και με ρυθμό ροής θερμότητας 10 °C/min. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση φαίνεται παρακάτω.

DSC

27.04.2015 12:43:00



Lab: METTLER

STAR® SW 9.20

Διάγραμμα 4.3.2, Μέθοδος ανάλυσης DSC

4.3.3 Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA)

Εισαγωγή

Με την Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA), καταγράφεται η απώλεια μάζας του δείγματος καθώς θερμαίνεται σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Με κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων, απορρέουν πληροφορίες σχετικά με την θερμοκρασία αποικοδόμησης και το % υπόλειμμα μάζας. Ειδικότερα, το % υπόλειμμα μάζας δίνεται από την παρακάτω σχέση (Εξίσωση 4.3.3.1):

$$\% \text{ Υπόλειμμα μάζας} = \frac{m_{\text{τελική}}}{m_{\text{αρχική}}} \cdot 100\%$$

Όπου, $m_{\text{τελική}}$ είναι η μάζα του δείγματος που έχει παραμείνει στον θερμοζυγό.

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε, ο θερμοζυγός Mettler Toledo TGA/DSC 1 STAR^e System το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 4.3.3.1, Θερμοζυγός Mettler Toledo TGA/DSC 1 STAR^e System

Ανάλυση TGA για το PLA (MB=51.700 g/mol)

Αρχικά ζυγίζεται δείγμα PLA , αφού πρώτα έχει ξηρανθεί, και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικά καψίδια μέσα στο θερμοζυγό. . Έπειτα, επιβάλλεται στο δείγμα θέρμανση με θερμοκρασιακό εύρος από 10 έως 500 °C, με συνεχή παροχή αζώτου 10 ml/min και με ρυθμό ροής θερμότητας 10 °C/min.

Ανάλυση TGA για το Poly-β-CD

Αρχικά ζυγίζεται δείγμα Poly-β-CD και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικά καψίδια μέσα στο θερμοζυγό. . Έπειτα, επιβάλλεται στο δείγμα θέρμανση με θερμοκρασιακό εύρος από 25 έως 600 °C, με συνεχή παροχή αζώτου 10 ml/min και με ρυθμό ροής θερμότητας 10 °C/min.

4.4 Σχηματισμός Νανοσωματιδίων (NPs) και Εγκλεισμός της ένωσης HT

❖ Αντιδραστήρια

- Πολυβυνυλική αλκοόλη (PVA)
- Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA)
- Ακετόνη υψηλής καθαρότητας
- Απιονισμένο νερό (d.H₂O)
- Εμπορική υδροξυτυροσόλη
- Μεθανόλη υψηλής καθαρότητας

❖ Όργανα & Συσκευές

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αναδευτήρα Vortex
- Ηλεκτρονική πιπέτα των 100μL και 1000μl
- Δοκιμαστικός σωλήνας
- Κωνική φιάλη (1000ml)
- Ποτήρι ζέσεως
- Erpendorf
- Γυάλινο φιαλίδιο (Vial)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotary Evaporator
- Φυγόκεντρος 4239R ALC International
- Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP
- Κυψελίδα (Disposale capillary cell DTS1070)

❖ Πειραματική Διαδικασία

Εισαγωγή

Για την παρασκευή των κενών και φορτωμένων με υδροξυτυροσόλη νανοσωματιδίων , έλαβε μέρος η μέθοδος γαλακτωματοποίησης – εξάτμισης του οργανικού διαλύτη. Συγκεκριμένα , παρασκευάζεται ένα γαλάκτωμα το οποίο αποτελείται από δυο φάσεις. Η μια φάση , η υδατική , αποτελεί την συνεχής φάση και είναι ένα υδατικό διάλυμα πολύ(βινυλικής) αλκοόλης (PVA). Η δεύτερη φάση, η ασυνεχής φάση, αποτελείται από ένα οργανικό διάλυμα πολυγαλακτικού οξέος, που στην περίπτωση των φορτωμένων νανοσωματιδίων , βρίσκεται αναμιγμένο με το οργανικό διάλυμα της προς εγκλωβισμού ένωσης.^[5]

4.4.1 Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολύ(βινυλικής) αλκοόλης (PVA)

Για την παρασκευή υδατικού διαλύματος διάλυμα πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) περιεκτικότητας 1% w/v, αρχικά ζυγιστήκαν 10 g PVA. Εν συνεχεία , τα 10 g PVA μαζί με 1L απιονισμένου νερού , προστεθήκαν σε μια κωνική των 1000ml. Το διάλυμα τέθηκε για ανάδευση σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα, για 24 ώρες στους 45 °C. Μετά τις 24 ώρες ανάδευσης, το διάλυμα αφήνεται να επέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια μεταφέρεται σε κλειστό μπουκάλι προς φύλαξη.

⁵ O'Donnell P., McGinity J., "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique", *USA Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, 28, 25–42.

4.4.2 Παρασκευή κενών πολυμερικών Νανοσωματιδίων (Blank NPs)

Βήμα 1 : Παρασκευή διαλύματος πολυμερούς PLA ,C=10mg/ml

Για την παρασκευή διαλύματος PLA, αρχικά ζυγίζονται 34 mg PLA και στη συνέχεια τοποθετείται, μαζί με 3,4 ml ακετόνης, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, το διάλυμα πολυμερούς υπόκειται μηχανική ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex για 10 λεπτά, μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης.

Βήμα 2 : Έγχυση οργανικής φάσης – δημιουργία νανοσωματιδίων

Υδατικό διάλυμα PVA, 34 ml, τοποθετείται σε ένα ποτήρι ζέσεως και αφήνεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 10 λεπτά, στα 250 rpm και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η έγχυση του διαλύματος PLA με σύριγγα, το οποίο τίθεται σε ανάδευση (250 rpm), για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, το γαλάκτωμα που προκύπτει οδηγείται προς εξάτμιση για 2 ώρες σε συσκευή rotary, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η ακετόνη. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, το διάλυμα τοποθετείται σε errendorf των 1,5 ml, τα οποία οδηγούνται προς φυγοκέντρηση για την απομόνωση των νανοσωματιδίων.

Βήμα 3 : Απομόνωση νανοσωματιδίων

Όπως αναφέρθηκε, για την απομόνωση των νανοσωματιδίων πραγματοποιούνται τρεις φυγοκεντρήσεις. Η πρώτη φυγοκέντρηση εφαρμόζεται για 20 min, στους 17.000 rpm και σε 0-10 °C. Αξίζει να αναφερθεί ότι η συνθήκες αυτές είναι ίδιες και για την 2^η και 3^η φυγοκέντρηση. Μετά το πέρας της 1^η φυγοκέντρου, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα σωματίδια που καταβυθίζονται ανακτώνται, με έκπλυση απιονισμένου νερού. Έπειτα, η διασπορά που προκύπτει τοποθετείται σε ένα errendorf μέχρι τα 1,5ml και οδηγείται προς τη 2^η φυγοκέντρηση. Η επεξεργασία και διαδικασία ανάκτησης των σωματιδίων που λαμβάνονται από την 2^η και 3^η φυγόκεντρο είναι ίδια με την προαναφερθείσα.

Βήμα 4 : Αποθήκευση διασποράς νανοσωματιδίων

Σε αυτό το βήμα, τα σωματίδια που λαμβάνονται από την 3^η φυγόκεντρο εκπλένονται με ένα 1 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα που προκύπτει επαναδιασπείρεται σε 3ml απιονισμένου νερού και φυλάσσεται σε vial, που αποθηκεύεται στους 4 °C.

4.4.3 Εγκλεισμός HT σε πολυμερικά Νανοσωματίδια (Loaded NPs)

Αναφερόμενοι στη διαδικασία παρασκευής φορτωμένων με HT νανοσωματιδίων, είναι παρόμοια με την προαναφερθείσα των κενών νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση βρίσκεται στα έξης σημεία: Αρχικά, 14 mg PLA διαλύονται σε 1,4 ml ακετόνης σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύονται για 10 λεπτά σε αναδευτήρα Vortex. Παράλληλα, διαλύονται 2,8 mg υδροξυτυροσόλης σε 0,5 mL μεθανόλης, με σκοπό να

πραγματοποιηθεί 20% θεωρητική φόρτωση της ουσίας (20% Drug loading). Τα δύο παραπάνω διαλύματα αναμειγνύονται και με χρήση σύριγγας προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 14 mL υδατικού διαλύματος PVA, 1% w/v και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την παραπάνω. Η δεύτερη διαφοροποίηση βρίσκεται στη μεθοδολογία ανάκτησης των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, κατά της τρεις φυγοκεντρήσης, τα υπερκείμενα S1,S2 και S3 φυλάσσονται ξεχωριστά σε vial, αντί να απορρίπτονται όπως γίνεται με τα κενά νανοσωματιδία. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα υπερκείμενα S1, S2 και S3, αντιστοιχούν στα υπερκείμενα που λαμβάνονται από την 1^η, 2^η και 3^η φυγόκεντρο, αντιστοίχως.

4.4.4 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

A. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους & Z- δυναμικό

Για τον χαρακτηρισμό των κενών και φορτωμένων νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) με την συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια εξετάστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης, λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού R.I.=1.330.



Εικόνα 4.4.4.1, Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP

Σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος, λαμβάνονται 20 μL από την διασπορά των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν, τα οποία υπόκεινται αραιώση με 2,98 ml δις-απιονισμένου νερού και τοποθετείται το τελικό διάλυμα σε κλειστό γυάλινο φιαλίδιο. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα Vortex για 10 λεπτά, ώστε να αποκτήσει καλή διασπορά. Έπειτα τοποθετείται σε κυψελίδα (disposable capillary cell DTS1070) και οδηγείται για τον χαρακτηρισμό του διαλύματος των νανοσωματιδίων. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται ο μέσος όρος. Όλες οι μετρήσεις έλαβαν μέρος στους 25±1 °C.

B. Ποσοστό εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης στα PLA Νανοσωματίδια (EE%)

Για την μέτρηση του ποσοστού εγκλωβισμού (Encapsulation efficiency) της HT στα νανοσωματίδια PLA, έλαβε μέρος η μέθοδος της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Για τον υπολογισμό του ποσοστού εγκλωβισμού, χρησιμοποιήθηκε η εξής σχέση(Εξίσωση 4.4.4.1) :

$$\%EE = \frac{\text{Αρχική ποσότητα ουσίας}(mg) - \text{Ποσότητα ουσίας στα υπερκείμενα}(mg)}{\text{Αρχική ποσότητα ουσίας}(mg)} \cdot 100$$

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της μη εγκλεισμένης HT , το οποίο βρίσκεται στα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων (S1,S2,S3). Αρχικά, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς (working curve), με χρήση πρότυπων διαλυμάτων υδροξυτυροσόλης με γνωστή συγκέντρωση , μήκος κύματος και απορρόφηση. Έπειτα με την χρήση καταλλήλων υπολογισμών , βρέθηκε η ποσότητα της HT στα υπερκείμενα.

4.5 Επικάλυψη Κενών Νανοσωματιδίων με Poly-β-CD

❖ Αντιδραστήρια

- Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), μοριακού βάρους 138.000g/mol
- Πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), μοριακού βάρους 51.700 g/mol
- Νανοσωματίδια PLA , μοριακού βάρους 138.000g/mol και 51.700 g/mol
- Απιονισμένο νερό (d.H2O)
- Poly-β-CD

❖ Όργανα & Συσκευές

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ηλεκτρονική πιπέτα 1000 μl
- Κωνική φιάλη με σμύρισμα
- Eppendorf
- Γυάλινο φιαλίδιο (Vial)
- Φυγόκεντρος 4239R ALC International

❖ Πειραματική Διαδικασία

Επικάλυψη Κενών Νανοσωματιδίων με poly-β-CD

Η επικάλυψη των κενών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε σε PLA μοριακού βάρους 138.000g/mol και σε PLA μοριακού βάρους 51.700 g/mol. Για τα νανοσωματίδια που παρασκευαστήκαν από PLA μοριακού βάρους 138.000 g/mol και PLA μοριακού βάρους 51.700 g/mol χρησιμοποιήθηκαν 26 mg, αντίστοιχα. Αρχικά, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα Poly-β-CD συγκέντρωσης 10 mg/ml. Συγκεκριμένα, 80 mg Poly-β-CD προστίθεται σε κωνική φιάλη με σμύρισμα και το δείγμα διαλύεται σε 8 ml απιονισμένου νερού . Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες.

Η δεύτερη φάση της διαδικασίας επικάλυσης περιλαμβάνει την ανάμιξη του υδατικού διαλύματος Poly-β-CD με ποσότητα από την διασπορά των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, 4 ml υδατικού διαλύματος Poly-β-CD αναμιγνύονται με 4 ml διασποράς νανοσωματιδίων μοριακού βάρους 138.000 g/mol και τα εναπομένοντα 4 ml υδατικού διαλύματος Poly-β-CD αναμιγνύονται με 4 ml διασποράς νανοσωματιδίων μοριακού βάρους 51.700 g/mol. Τα δυο διαλύματα τίθενται σε ανάδευση για 17 ώρες. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι , η ποσότητα του υδατικού διαλύματος Poly-β-CD και της διασποράς των νανοσωματιδίων πρέπει να βρίσκονται σε 1:1 αναλογία.

Για την ανάκτηση των επικαλυμμένων σωματιδίων πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση. Ειδικότερα, η φυγόκεντρος ορίζεται στα 17.000 rpm και σε $T= 4^{\circ}\text{C}$ για 40 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και με έκπλυση 1 ml απιονισμένου νερού τα σωματίδια που καταβυθίζονται ανακτώνται. Το διάλυμα που προκύπτει επαναδιασπείρεται σε 3ml απιονισμένου νερού και φυλάσσεται σε vial ,που αποθηκεύεται στους 4°C .

4.6 Χαρακτηρισμός PLA-Poly-β-CD NPs

❖ Αντιδραστήρια

- Δις-απιονισμένο νερό
- Διασπορά επικαλυμμένων PLA-Poly-β-CD NPs

❖ Όργανα & Συσκευές

- Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP
- Αναδευτήρα Vortex
- Ηλεκτρονική πιπέτα των 100μL και 1000μL
- Γυάλινο φιαλίδιο (Vial)
- Κυψελίδα (Disposable capillary cell DTS1070)

❖ Πειραματική Διαδικασία

4.6.1 Μέγεθος και κατανομή μεγέθους & Z- δυναμικό

Για τον χαρακτηρισμό των επικαλυμμένων κενών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) με την συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP. Πιο συγκεκριμένα, τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια εξετάστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό τους και το πάχος της επικάλυψης. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης, λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού $n=1.330$ και όλες οι μετρήσεις έλαβαν μέρος στους 25 ± 1 °C.

Σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος, λαμβάνονται 40 μL από την διασπορά των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο της απορρόφησης. Έπειτα, αραιώνεται με 2,98 ml δις-απιονισμένου νερού και τοποθετείται το τελικό διάλυμα σε κλειστό γυάλινο φιαλίδιο. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύεται σε αναδευτήρα Vortex για 10 λεπτά, ώστε να αποκτήσει καλή διασπορά. Έπειτα ακολουθεί η ακριβώς ίδια διαδικασία μέτρησης και επεξεργασίας του δείγματος, όπως στην παράγραφο « 4.4.4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων ».

4.6.2 Μελέτη Σταθερότητας επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων

Η μελέτη της σταθερότητας πραγματοποιήθηκε για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 138.000 g/mol (ZS12_ZS21) και για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol (ZS22_Abs). Τα σωματίδια φυλάσσονται σε σταθερές συνθήκες στο ψυγείο. Η μελέτη σταθερότητας που αφορά τα σωματίδια ZS12_ZS21 πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 40 ημερών, από την αρχική μέτρηση. Για τα σωματίδια ZS22_Abs, η μελέτη έλαβε μέρος σε διάστημα 40 ημερών, από την αρχική μέτρηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αποτελέσματα

Συζήτηση αποτελεσμάτων

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση αποτελεσμάτων

5.1 Σύνθεση πολυμερούς β-κυκλοδεξτρίνης - Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία, όπως έχει αναφερθεί, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πολυμερούς με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους, αλλάζοντας τις βασικές συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας, με σκοπό την παραλαβή προϊόντος με υψηλό μοριακό βάρος. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τους διάφορους τρόπους σύνθεσης :

Πίνακας 5.1.1, Δεδομένα και αποτελέσματα της σύνθεσης του πολυμερούς

Δείγμα	Αρχική ποσότητα β-CD (g)	Γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD	NaOH %w/w	Χρόνος πολυμερισμού	Φαινόμενο ζελαρίσματος	Ποσότητα (mg)
EP_b_CD_5	1	10	33	3h & 50 min	-	600
EP_b_CD_14	0,5	10	33	16h	Ναι	-
EP_b_CD_17	0,5	10	33	6h	Ναι	-
EP_b_CD_18	0,5	12	33	3h&50 min	-	285,7

*Τα δείγματα EP_b_CD_5, EP_b_CD_14, EP_b_CD_17 και EP_b_CD_18 παρασκευάστηκαν με βάση την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.2 Α, 4.2 Β, 4.2 Γ και 4.2 Δ, αντίστοιχα.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων και αποτελεσμάτων, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Για χρόνο πολυμερισμού 3h&50 min και 33 % w/w NaOH, η γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10, δίνει το καλύτερο προϊόν αφού δεν πραγματοποιείται το ζελάρισμα του πολυμερούς. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και βάσει ερευνών^[6].
- ❖ Για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10 και 33 % NaOH, οι χρόνοι πολυμερισμού 16 h και 6 h, δεν καταλήγουν στην παραλαβή προϊόντος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εμφανίστηκε το φαινόμενο του ζελαρίσματος του πολυμερούς και δεν μπορούσε να επεξεργαστεί περαιτέρω η ουσία.

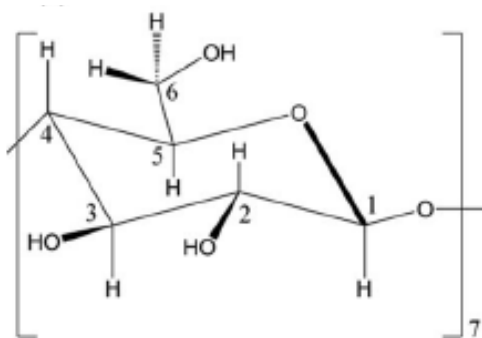
⁶ E. Renard, A. Deratani, G. Volet, B. Seville, "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF WATER SOLUBLE HIGH MOLECULAR WEIGHT β-CYCLODEXTRIN-EPICHLOROHYDRIN POLYMERS", *European Polymer Journal*, **1997**, 33, 49-57.

5.2 Χαρακτηρισμός του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD)

5.2.1 Μελέτη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η μελέτη της δομής της β-κυκλοδεξτρίνης και του πολυμερούς της, που συντέθηκε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε με την Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) πρωτονίου ^1H NMR. Επίσης, για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το δευτεριωμένο νερό D_2O . Συγκεκριμένα, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα δείγματα που παρασκευάστηκαν από την σύνθεση του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης (το δείγμα EP_b_CD_5 και EP_b_CD_18) και στη β-κυκλοδεξτρίνη. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων και ο αντίστοιχος σχολιασμός τους. Οι σχολιασμοί των φασμάτων, βασίστηκαν σε διάφορες μελέτες που αφορούν την β-κυκλοδεξτρίνη και το πολυμερές της.^{[7],[8]}

Η ανάλυση της δομής βασίστηκε στην εξής αναπαράσταση της χημικής δομής της β-κυκλοδεξτρίνης :

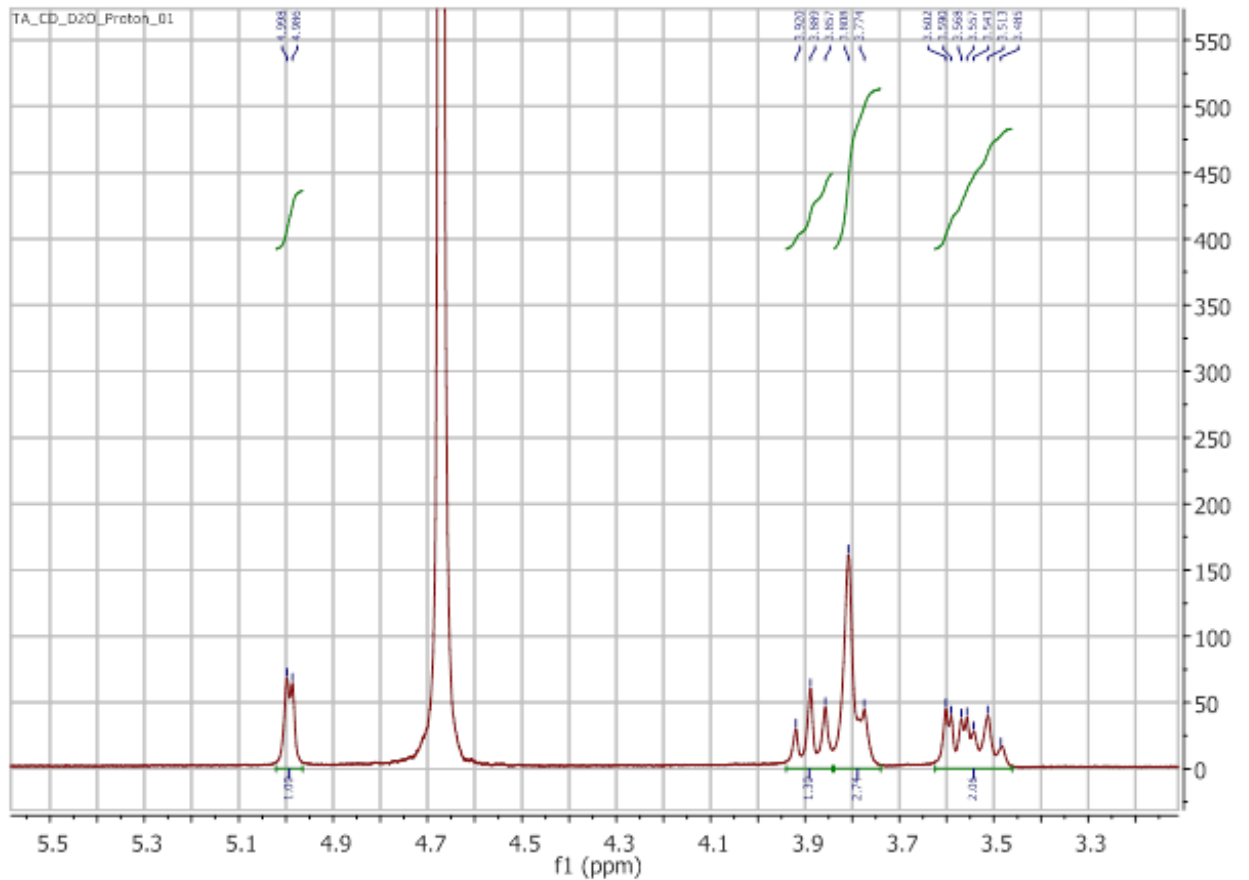


Εικόνα 5.2.1.1, Χημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης

⁷ Chang Liu ,et al, " A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer b-Cyclodextrin: A Novel Anti- Inflammation Agent with Low Toxicity", PLOS ONE, Vol 9, Issue 7, 2014.

⁸ Phendukani Ncube, Rui W.M. Krause, Bhekile B. Mamba, "Detection of chloroform in water using an azo dye-modified b-cyclodextrin – Epichlorohydrin copolymer as a fluorescent probe", *Physics and Chemistry of the Earth*, 2014,79–85.

Φάσμα ^1H NMR της β -κυκλοδεξτρίνης

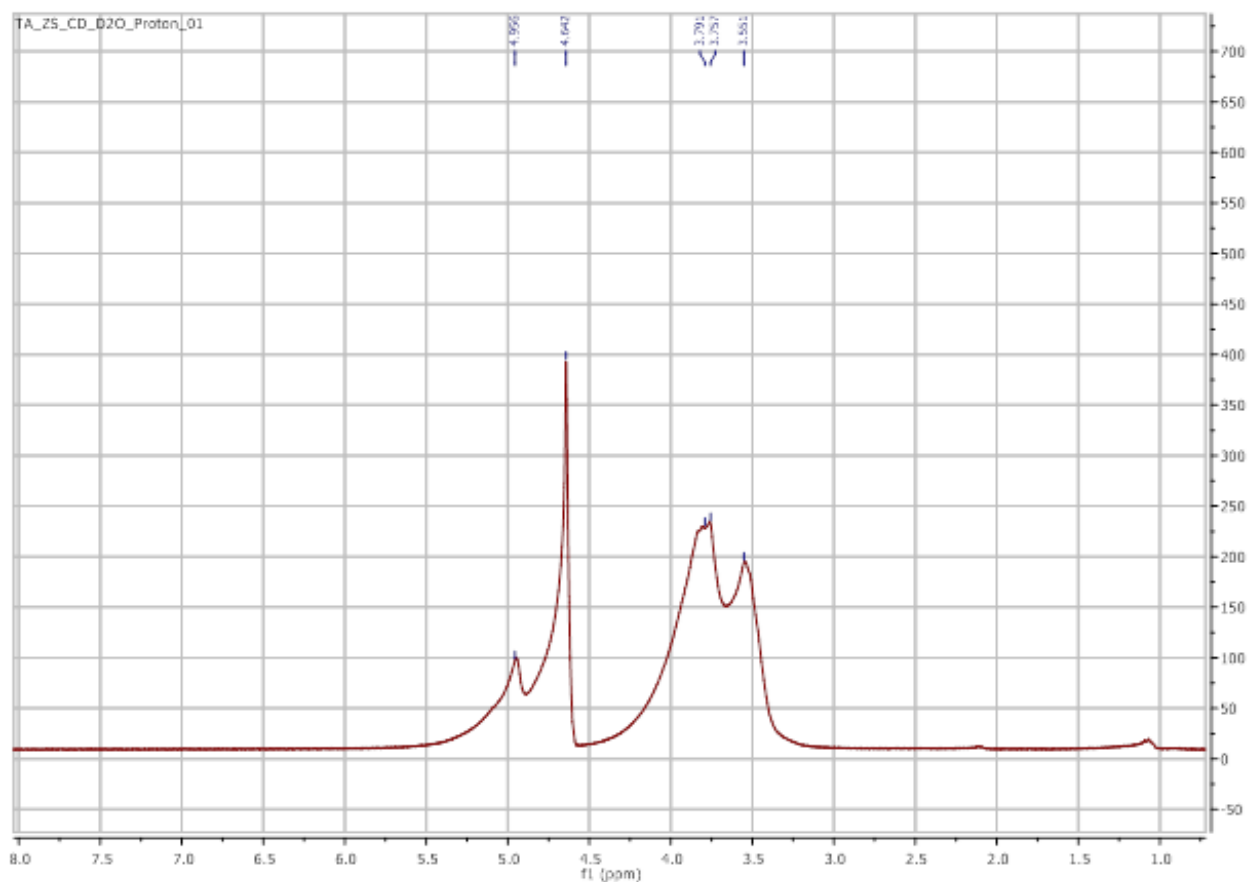


Διάγραμμα 5.2.1, Φάσμα ^1H NMR της β -κυκλοδεξτρίνης

Σχολιασμός φάσματος

Μελετώντας το φάσμα από αριστερά προς τα δεξιά, αρχικά παρατηρείται μια κορυφή η οποία εμφανίζει χημική μετατόπιση στα 4.99 ppm και σταθερά σύζευξης $J=3,6$ Hz. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή είναι διπλή, ολοκληρώνεται για 1 H και αποδίδεται στο ανωμερικό πρωτόνιο της θέσης 1 της γλυκοπυρανόζης. Στα 3.89 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή ($J=9.3\text{Hz}$), η οποία ολοκληρώνεται για 1 H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Τέλος, στα 3.81-3.77 ppm και στα 3.60-3.48 ppm παρατηρούνται πολλαπλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνονται για 3 H και 2 H, αντίστοιχα και αποδίδονται στα υπόλοιπα πρωτόνια του γλυκοπυρανοζιτικού δακτυλίου.

Φάσμα ^1H NMR της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (Δείγμα EP_b_CD_5)



Διάγραμμα 5.2.2, Φάσμα ^1H NMR του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης, του δείγματος EP_b_CD_5

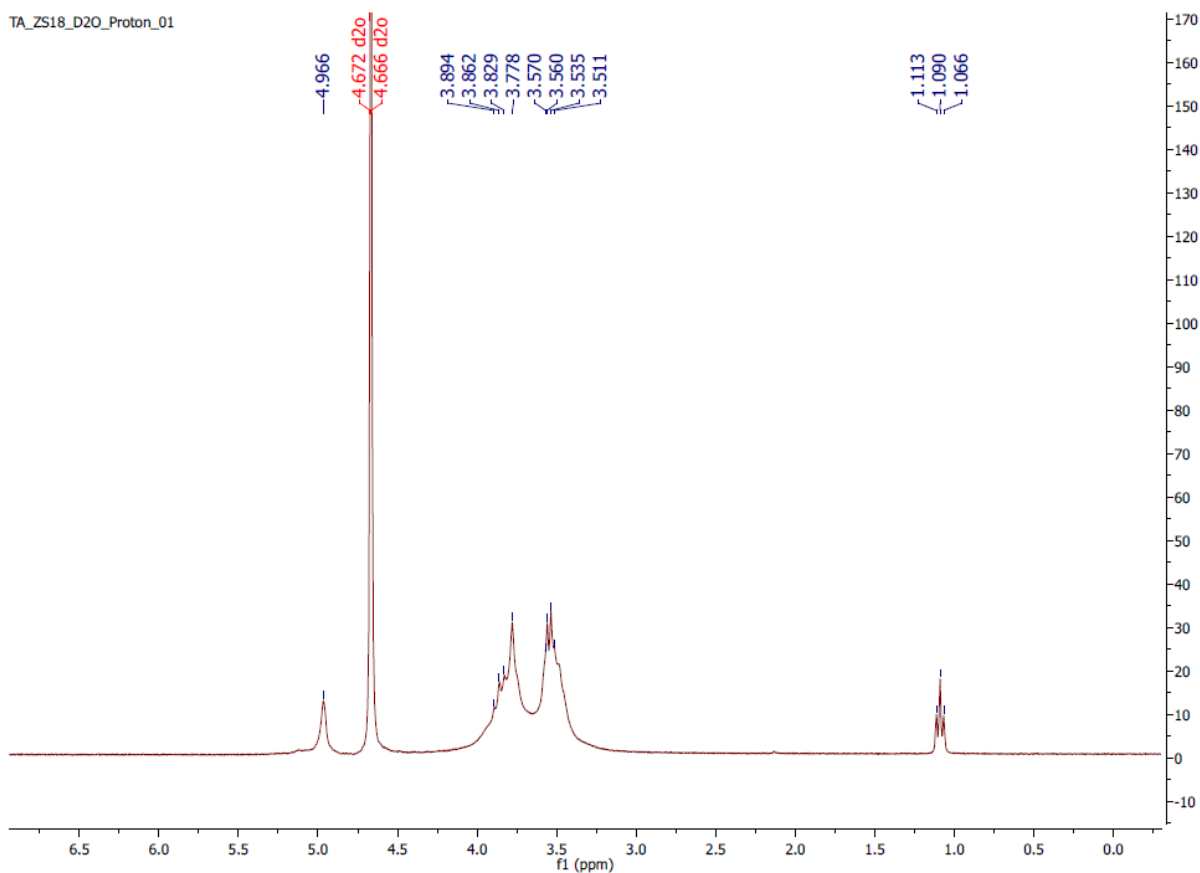
Σχολιασμός φάσματος

Το φάσμα λήφθηκε με σκοπό να χαρακτηριστεί το δείγμα ως πολυμερές. Με μια πρώτη ματιά, συγκρίνοντας το φάσμα με τα φάσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία^{[9],[10]}, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το δείγμα είναι πολυμερές. Επίσης, παρατηρείται μια διαφοροποίηση του φάσματος σε σχέση με το φάσμα της β-κυκλοδεξτρίνης, κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη πολυμερούς. Στο φάσμα παρουσιάζεται μια ευρεία απλή κορυφή για χημική μετατόπιση στα 4.96 ppm. Έτσι, συγκρίνοντας τα δυο φάσματα, παρατηρείται μια μετατόπιση για το πρωτόνιο της θέσης 1, από 4.99 στα 4.96 ppm, δηλαδή υπάρχει αλλαγή στη δομή του μορίου της β-κυκλοδεξτρίνης. Τέλος, ένα άλλο χαρακτηριστικό της ύπαρξης πολυμερούς είναι η ευρείες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα.

⁹Chang Liu, Wang Zhang, et al, "A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer β-Cyclodextrin: A Novel Anti- Inflammation Agent with Low Toxicity", PLOS ONE, Vol 9, Issue 7, 2014.

¹⁰Phendukani Ncube, Rui W.M. Krause, Bhekile B. Mamba, "Detection of chloroform in water using an azo dye-modified β-cyclodextrin – Epichlorohydrin copolymer as a fluorescent probe", *Physics and Chemistry of the Earth*, 2014, 79–85.

Φάσμα ^1H NMR της επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (Δείγμα EP_b_CD_18)



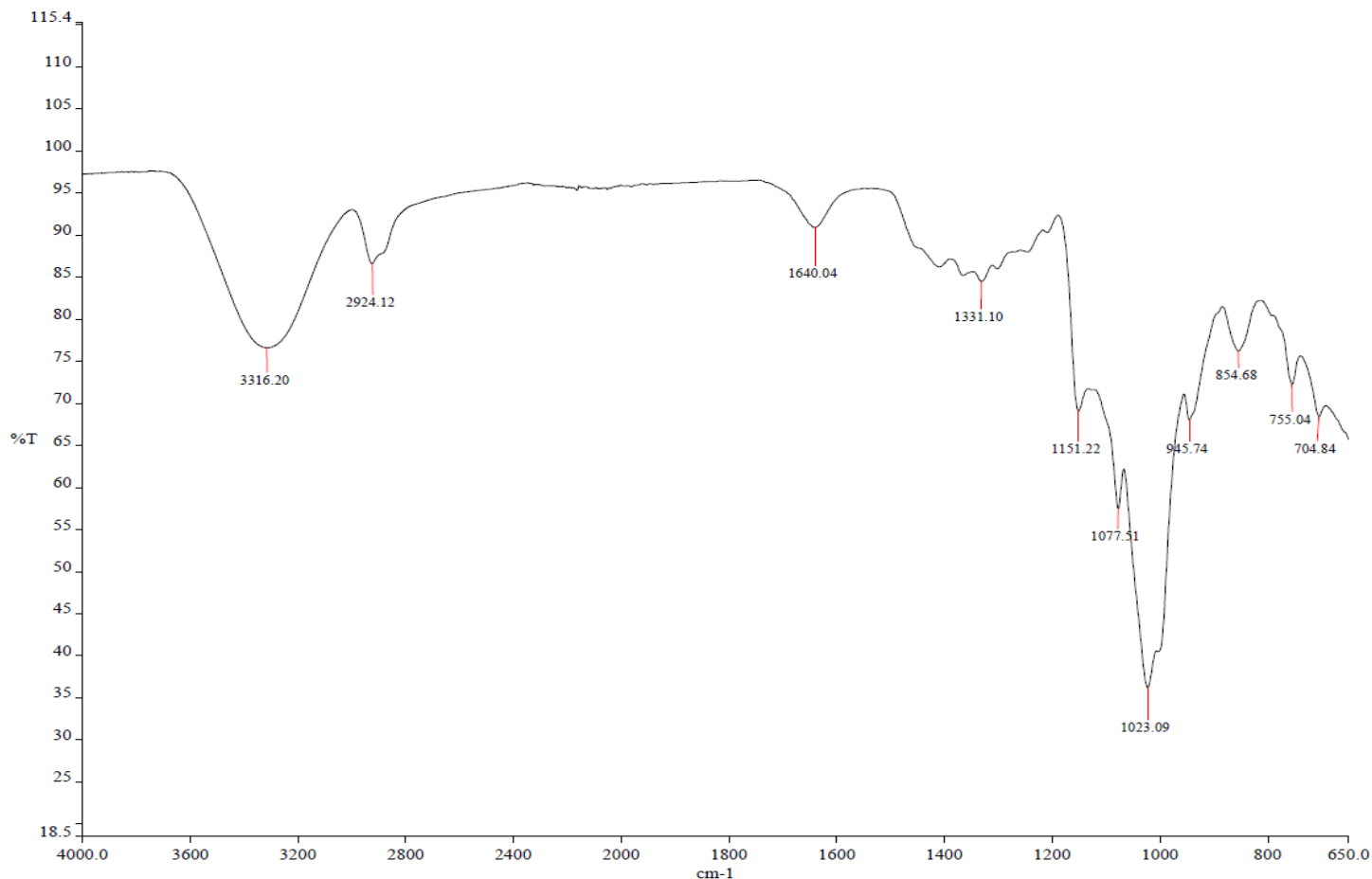
Διάγραμμα 5.2.3, Φάσμα ^1H NMR του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης, του δείγματος EP_b_CD_18

Σχολιασμός φάσματος

Μελετώντας το παραπάνω φάσμα, παρατηρείται ότι εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το φάσμα της β-κυκλοδεξτρίνης (Διάγραμμα 5.2.1). Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι μπορεί να μην έχει σχηματιστεί πολυμερές. Στη περίπτωση που έχει σχηματιστεί πολυμερές, είναι πολύ μικρού μοριακού βάρους.

5.2.2 Μελέτη Φασματοσκοπίας FT-IR

Στη παρούσα εργασία, για τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης πραγματοποιήθηκε συμπληρωματικά η ανάλυση FT-IR (ATR), για το δείγμα EP_b_CD_5. Βάσει της βιβλιογραφίας ^[11], η ουσία ενδείκνυται να είναι πράγματι πολυμερές. Παρακάτω απεικονίζεται το φάσμα που λήφθηκε από την συγκεκριμένη ανάλυση.



Διάγραμμα 5.2.4, Φάσμα FT-IR του πολυμερούς της β-κυκλοδεξτρίνης

¹¹ Chang Liu, Wang Zhang, et al, " A Water-Soluble Inclusion Complex of Pedunculoside with the Polymer b-Cyclodextrin: A Novel Anti- Inflammation Agent with Low Toxicity", PLOS ONE, Vol 9, Issue 7, 2014.

Σχολιασμός φάσματος FT-IR

Μελετώντας το παραπάνω γράφημα από τα αριστερά προς τα δεξιά, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα για τις χαρακτηριστικές κορυφές:

Συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική κορυφή που αποδίδεται στις ομάδες υδροξυλίου (OH) αντιστοιχεί στην απορρόφηση 3316.20 cm^{-1} και εμφανίζει δόνηση τάσης του δεσμού O-H. Παράλληλα, η κορυφή με απορρόφηση 2924.12 cm^{-1} , αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης των ομάδων του CH_2 . Επιπρόσθετα, η απορρόφηση στα 1151.22 cm^{-1} , αποδίδεται στη δόνηση τάσης των ομάδων C-O-C. Τέλος, η χαρακτηριστική κορυφή που εμφανίζει απορρόφηση στα 1023.09 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης των ομάδων C-O και C-C, αντίστοιχα.

5.2.3 Αποτελέσματα ιξωδομετρίας

Για τον υπολογισμό του οριακού αριθμού ιξώδους $[\eta]$, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ιξωδομετρίας διαλύματος στα δείγματα EP_b_CD_5 και EP_b_CD_18 με στόχο την εκτίμηση του μοριακού βάρους των σχηματισθέντων πολυμερών. Το δείγμα EP_b_CD_18, όπως έχει αναφερθεί, παρασκευάστηκε με γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=12. Η αύξηση της ποσότητας της επιχλωρυδρίνης πραγματοποιήθηκε γιατί το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε πιθανώς να είχε χάσει την δραστηριότητά του. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.3.1.

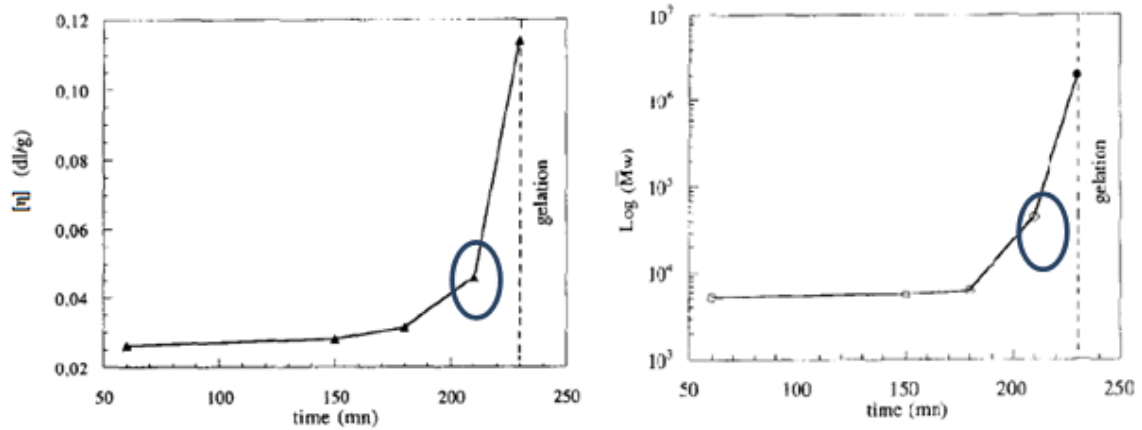
Πίνακας 5.2.3.1, Αποτελέσματα ιξωδομετρίας

Δείγμα	EP_b_CD_5	EP_b_CD_18
Θερμοκρασία (°C)	25	25
Διαλύτης	Απιονισμένο νερό	Απιονισμένο νερό
Χρόνος εκροής διαλύτη (sec)	328,98	327,35
Χρόνος εκροής δείγματος (sec)	338,0	333,4
Οριακός αριθμός ιξώδους (dL/g)	0,055±0,003	0,037±0,002

Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους βασιστήκαμε στα διαγράμματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 5.2.3.1), τα οποία παρουσιάζονται στο επιστημονικό άρθρο «PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF WATER SOLUBLE HIGH MOLECULAR WEIGHT β-CYCLODEXTRIN-EPICHLOROHYDRIN POLYMERS». ^[12] Αξίζει να αναφερθεί ότι, η σύνθεση του δείγματος EP_b_CD_5 πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες που αναφέρονται στην συγκεκριμένη βιβλιογραφία και βάσει του οριακού αριθμού ιξώδους παρατηρείται ότι βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με τα αντίστοιχα πειράματα. Σχετικά με το δείγμα EP_b_CD_18, παρατηρείται ότι με την αύξηση της ποσότητας της επιχλωρυδρίνης δεν

¹² E. Renard, A. Deratani, G. Volet, B. Sebillle, "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF WATER SOLUBLE HIGH MOLECULAR WEIGHT β-CYCLODEXTRIN-EPICHLOROHYDRIN POLYMERS", *European Polymer Journal*, **1997**, 33, 49-57.

ευνοήθηκε η τιμή του οριακού αριθμού ιξώδους, σε σύγκριση με το EP_b_CD_5. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, πιθανώς να πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις διακλάδωσης του πολυμερούς εις βάρος των αντιδράσεων πολυμερισμού.



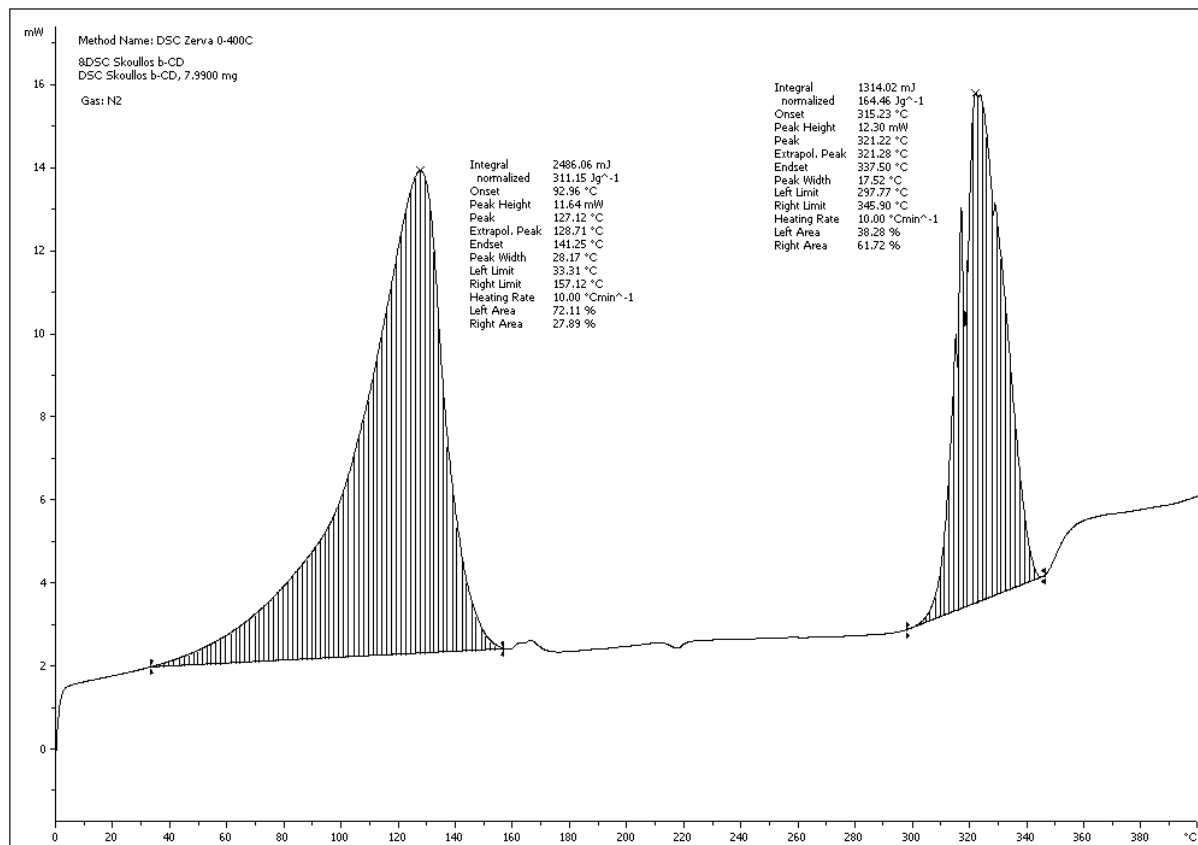
Εικόνα 5.2.3.1, Αναπαράσταση του οριακού αριθμού ιξώδους και μέσου αριθμού μοριακού βάρους συνάρτηση του χρόνου πολυμερισμού.

Συγκεκριμένα, από το πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα $[\eta]$ συνάρτηση του χρόνου πολυμερισμού) για τον χρόνο πολυμερισμού που εφαρμόσαμε (3 ώρες και 50 λεπτά) το δείγμα EP_b_CD_5 εμφανίζει $[\eta]=0,055$ dl/g και το μοριακό βάρος μπορεί να εκτιμηθεί σε $M_w=5 \cdot 10^4$ g/mol.

5.2.4 Αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA)

Τα γραφήματα που πρόεκυψαν από την ανάλυση DSC για τη β-κυκλοδεξτρίνη και την επιχλωρυδρίνη-β-κυκλοδεξτρίνη, παρουσιάζονται παρακάτω.

^endo



Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

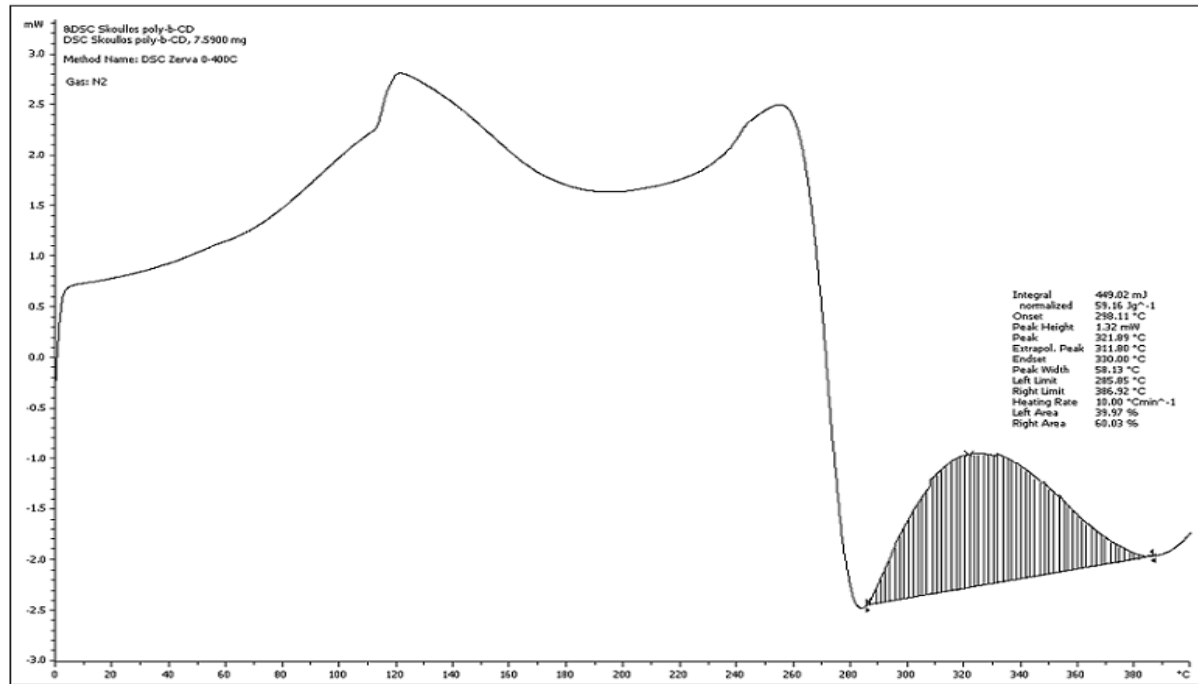
Διάγραμμα 5.2.5, Γράφημα ανάλυσης DSC του β-CD

Παρατηρείται ότι η β-κυκλοδεξτρίνη εμφανίζει δυο ενδόθερμες κορυφές. Συγκεκριμένα, η 1^η κορυφή οφείλεται στη τήξη του μονομερούς, και παρουσιάζει $\Delta H_f = 311,15 \text{ J/g}$ και $T_m = 127,12 \text{ }^\circ\text{C}$. Ακολούθησε η θερμική αποικοδόμηση του μονομερούς με κορυφή στους $T_d = 321,22 \text{ }^\circ\text{C}$. Η συγκεκριμένη τιμή έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία, όπου έχει βρεθεί ότι η αντίστοιχη κορυφή εμφανίζει $T_d = 320 \text{ }^\circ\text{C}$.^[13]

¹³ Cui L, Zhang ZH, Sun E, Jia XB. "Effect of β-Cyclodextrin Complexation on Solubility and Enzymatic Conversion of Naringin", *International Journal of Molecular Sciences*, **2012**, 13, 14251-14261

Για την πιστοποίηση της δομικής μονάδας του πολυμερούς που συντέθηκε , μαζί με την ανάλυση του NMR, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του DSC. Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα του DSC και TGA και το συγκριτικό γράφημα DSC του μονομερούς με το πολυμερές του.

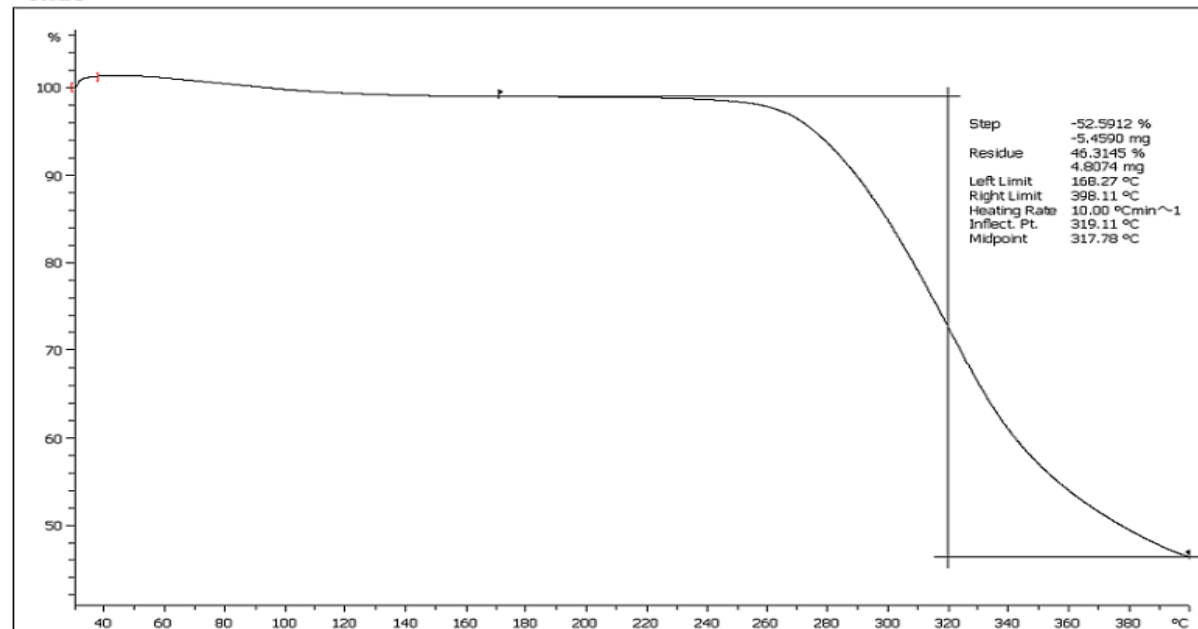
^endo



Lab: METTLER

STAR® SW 9.20

^endo

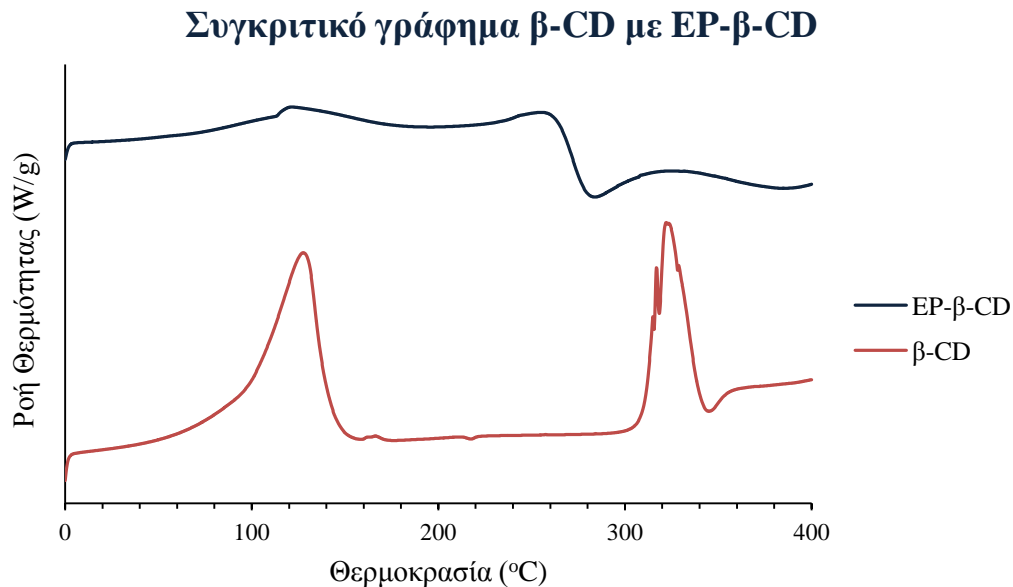


Lab: METTLER

STAR® SW 9.20

Διάγραμμα 5.2.6, Γραφήματα DSC και TGA για το πολυμερές της β-κυκλοδεξτρίνης

Μελετώντας το γράφημα του DSC σε συνδυασμό με το γράφημα του TGA διαπιστώνεται ότι πρόκειται για ένα άμορφο πολυμερές που δεν εμφανίζει κορυφή τήξης. Επίσης, προκύπτει ότι το πολυμερές αρχίζει να αποικοδομείται γύρω στους 260°C και εμφανίζει μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης στους 317,94 °C. Από το γράφημα του TGA , προσδιορίζεται ότι το στερεό υπόλειμμα του πολυμερούς είναι 46,31%.



Διάγραμμα 5.2.7, Γραφήματα DSC για το μονομερές και πολυμερές

Όσον αφορά το συγκριτικό γράφημα , παρατηρείται ότι το πολυμερές που συντέθηκε δεν φαίνεται να παρουσιάζει τις ίδιες κορυφές με το μονομερές , επομένως ταυτοποιείται ότι πρόκειται για άλλη χημική δομή. Στο γράφημα του πολυμερούς, η κορυφή που εμφανίζεται πάνω από την κορυφή τήξης του μονομερούς είναι πιθανώς να αντιστοιχεί σε ελάχιστη ποσότητα του μονομερούς που δεν έχει αντιδράσει.

5.3 Χαρακτηρισμός του Πολυ(γαλακτικού Οξέος)

Για τον χαρακτηρισμό του Πολυ(γαλακτικού οξέος), που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη υλη στα πειράματα του νανοεκγλεισμού, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της ιξωδομετρίας, ώστε να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος. Επίσης, για τον προσδιορισμό των θερμικών ιδιοτήτων του πολυμερούς, έλαβαν μέρος οι ανάλυσης DSC και TGA. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

5.3.1 Αποτελέσματα ιξωδομετρίας

Για τον υπολογισμό του μέσου ιξώδους μοριακού βάρους, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ιξωδομετρίας διαλύματος στο δείγμα PLA_1. Ειδικότερα, η ανάλυση της ιξωδομετρίας πραγματοποιήθηκε δυο φορές, ώστε να ληφθούν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3.1.1.

Πίνακας 5.3.1.1, Αποτελέσματα ιξωδομετρίας

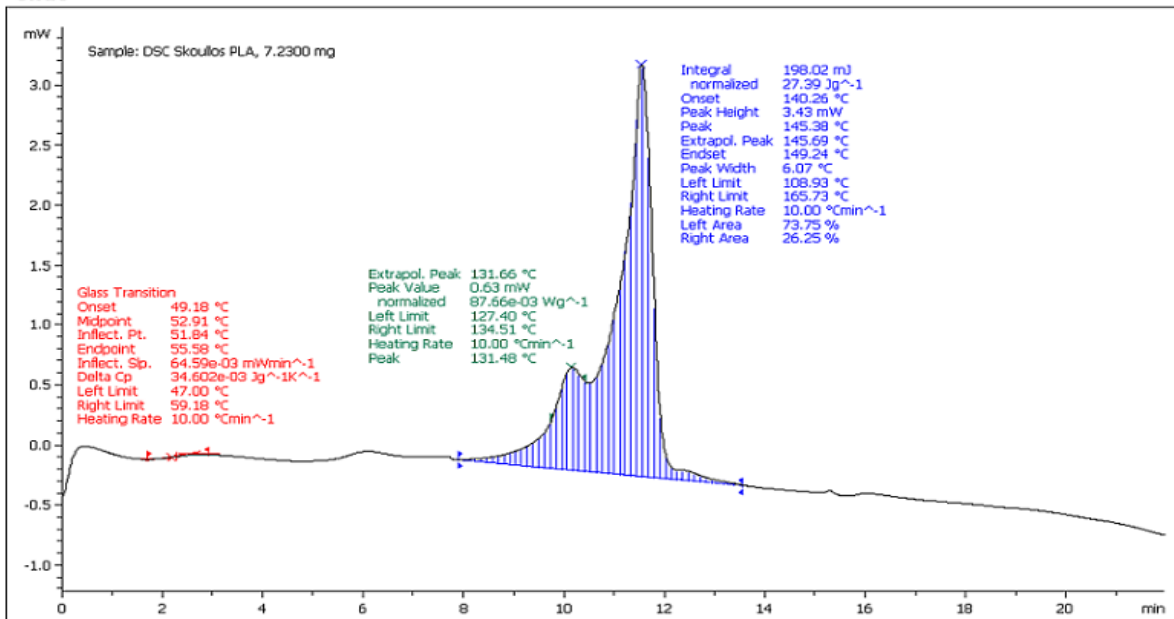
Επανάληψη	1 ^η	2 ^η	Μέσος Όρος
Θερμοκρασία °C	30 °C	30 °C	-
Διαλύτης	Χλωροφόρμιο	Χλωροφόρμιο	-
Οριακός αριθμός ιξώδους [η] (dL/g)	0,567	0,637	0,602±0,050
M _n (g/mol)	47.830	55.636	51.700±5000

Επομένως, το μέσο ιξώδες μοριακό βάρος του πολυ(γαλακτικού) οξέος υπολογίζεται, M_n=51.700 g/mol.

5.3.2 Αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA)

Τα γραφήματα που πρόεκυψαν από την ανάλυση DSC και TGA παρουσιάζονται παρακάτω :

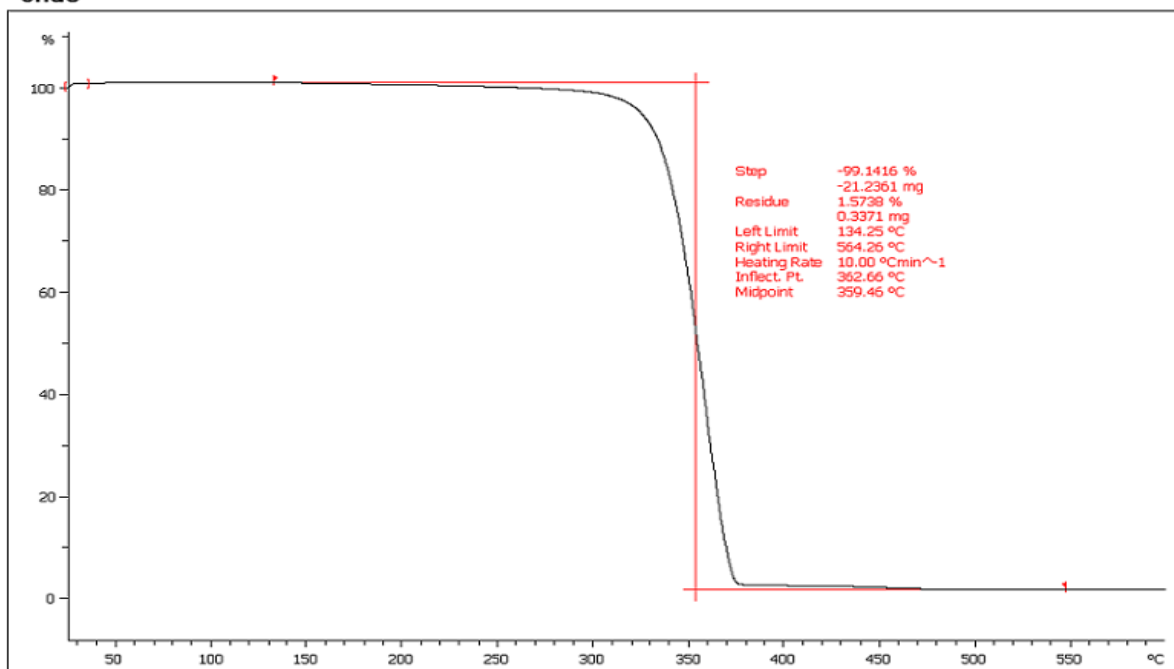
^endo



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

^endo



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Διάγραμμα 5.3.1, Γραφήματα ανάλυσης DSC και TGA του PLA

Βάσει του γραφήματος DSC παρατηρείται ότι, κατά την αύξηση της θερμοκρασίας εμφανίζεται μια ενδόθερμη κορυφή, που αντιστοιχεί στο φαινόμενο της τήξης των κρυσταλλικών περιοχών του πολυμερούς. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δυο επιμέρους κορυφές, η πρώτη εμφανίζει θερμοκρασία τήξης $T_m=131,66$ °C και η δεύτερη έχει $T_m=145,38$ °C. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στην ύπαρξη δυο πληθυσμών κρυστάλλων που εμφανίζουν διαφορετικά σημεία τήξης. Επιπρόσθετα, εμφανίζει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, $T_g=49,18$ °C. Όσον αφορά την ενθαλπία τήξης, το πολυμερές παρουσιάζει $\Delta H_f=27,39$ J/g.

Μια άλλη πληροφορία που απορρέει από το παραπάνω γράφημα , είναι ο βαθμός κρυσταλλικότητας (x_c) του πολυμερούς, το οποίο υπολογίζεται από την εξής σχέση :

$$x_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_0} \cdot 100$$

Συμφώνα με την βιβλιογραφία^[14], το πολυ(γαλακτικό οξύ) εμφανίζει ενθαλπία τήξης ολοκρυσταλλικού πολυμερούς $\Delta H_0=93,1$ J/g. Όποτε βάσει των παραπάνω ο βαθμός κρυσταλλικότητας υπολογίζεται, $x_c=29,42$ %.

Κατά την θερμοσταθμική ανάλυση καταγράφεται η μεταβολή της μάζας του πολυ(γαλακτικού οξέος) , όταν αυτό θερμαίνεται από τους 10-500 °C. Συγκεκριμένα, στο γράφημα παρουσιάζεται η αποικοδόμηση του πολυμερούς , η οποία πραγματοποιείται σε ένα στάδιο. Η αποικοδόμηση αρχίζει να εμφανίζεται γύρω στους 290°C και παρουσιάζει μέγιστη θερμοκρασία στους 364,21 °C. Στην θερμοκρασία αυτή , πραγματοποιείται ο μέγιστος ρυθμός αποικοδόμησης του PLA. Τέλος , προσδιορίζεται ότι το στερεό υπόλειμμα είναι 1,6%, το οποίο αντιστοιχεί στην ποσότητα του πολυμερούς που παραμένει μετά την αποικοδόμηση του.

5.4 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Πολυ(γαλακτικού) οξέος

5.4.1 Μέγεθος, δείκτης διασποράς και ζ-δυναμικό των κενών και φορτωμένων Νανοσωματιδίων

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός των κενών και φορτωμένων με HT νανοσωματιδίων , με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης που εμφανίζει η ουσία στα πολυμερικά νανοσωματίδια. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την παρασκευή των νανοσωματιδίων παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.4.1.1 , Συνθήκες παρασκευής κενών νανοσωματιδίων (blank NPs) και νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ουσία (HT-NPs)

Πείραμα	Mw PLA (g mol ⁻¹)	T(°C)	Ποσοστό Φόρτωσης	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Ποσότητα PLA (mg)	Ποσότητα PVA 1% (ml)
Blank NPs	51.700	25	-	250	25	25
HT NPs	51.700	25	20	250	23	23

¹⁴ Stamatina Vouyiouka , Pavlos Theodoulou , Antonia Symeonidou , Constantine D. Papaspyrides ,Rudolf Pfaendner et al,," Solid state polymerization of poly(lactic acid): Some fundamental parameters", *Polymer Degradation and Stability* ,**2013**, 98, 2473-2481.

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη διασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και ελήφθη ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.4.1.2 Αποτελέσματα μετρήσεων DLS

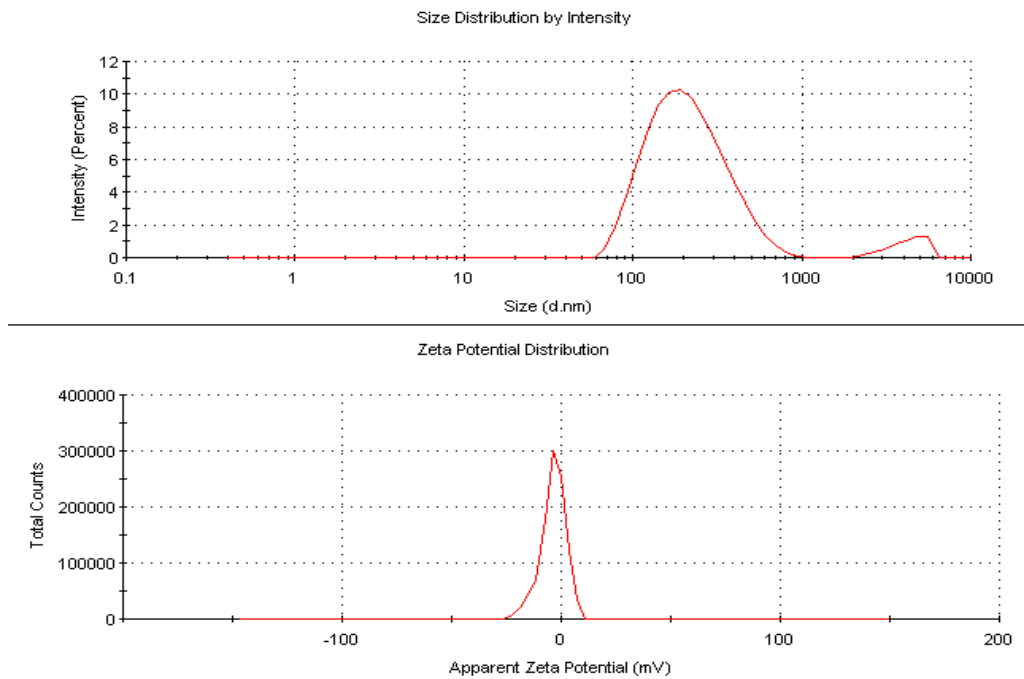
Δείγμα	Μέγεθος (nm)	Δείκτης διασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
Blank NPs	202,9	0,261	-24,3
	199,4	0,263	-25
	202,4	0,259	-24,3
	M.O	201,6± 1,9	0,261±0,002
HT NPs	300,8	0,404	-25,5
	321,4	0,438	-27,9
	314,7	0,368	-20,9
	M.O	312,3±10,5	0,403±0,035

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

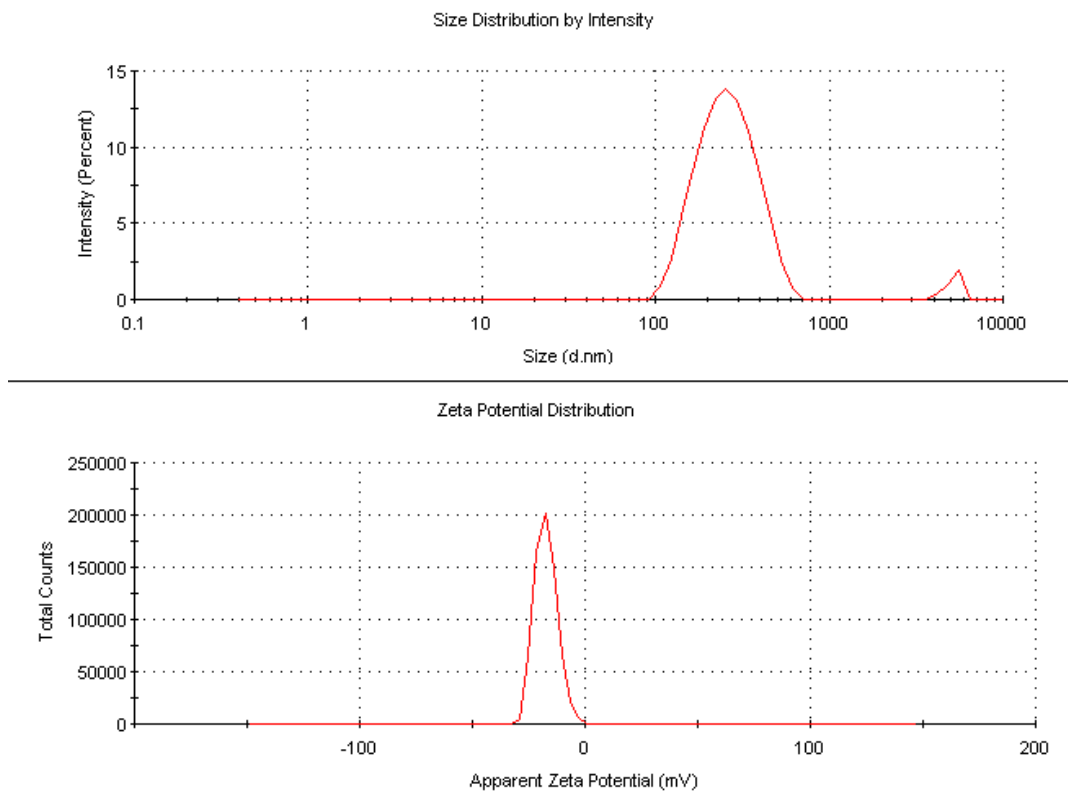
Όσον αφορά τα Blank NPs, παρατηρείται ότι το μέγεθος(201,6±1,9 nm) και η τιμή του ζ-δυναμικού(-24,5±0,4) είναι αρκετά ικανοποιητική. Συγκεκριμένα, η μεγάλη κατά απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού υποδηλώνει ότι στη διασπορά οι νανοσωματιδιακές δομές είναι σταθερές. Οι αρνητικές τιμές του ζ-δυναμικού μπορεί να αποδοθούν στο γεγονός ότι το πολυ(γαλακτικό οξύ) φέρει αρνητικά φορτισμένες καρβοξυ-τελικά άκρα, πάνω στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου.^[15] Επίσης, εμφανίζουν μικρή τιμή του δείκτη διασποράς (0,261±0,002), μικρότερη της μονάδας, κάτι που αποδεικνύει την καλή ομοιογένεια των νανοσωματιδίων στη διασπορά. Αναφερόμενοι στα νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη υδροξυτυροσόλη, παρατηρείται ότι το μέγεθος (312,3±10,5 nm) και η τιμή του ζ-δυναμικού(-24,8±3,6) είναι και εδώ αρκετά ικανοποιητική. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μεγάλη κατά απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού υποδηλώνει ότι στη διασπορά οι νανοσωματιδιακές δομές είναι σταθερές και η μικρή τιμή του δείκτη διασποράς (0,403±0,035) υποδηλώνει την καλή ομοιογένεια των νανοσωματιδίων στη διασπορά. Συμπερασματικά, ως προς το μέγεθος και την τιμή του ζ-δυναμικού, η ενσωμάτωση της HT στα πολυμερικά νανοσωματίδια δεν οδήγησε σε σημαντική αλλαγή αυτών των παραμέτρων.

Ενδεικτικά, απεικονίζονται τα διαγράμματα για τα δείγματα, όπως προέκυψαν από την μέτρησή της ανάλυσης DLS:

¹⁵ Roussaki M., Gaitanarou A., Diamanti P.Ch., Vouyiouka S., Papaspyrides C., Kefalas P., Detsi A., "Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles", *Polymer Degradation and Stability*, **2014**, *108*, 182-187.



Διάγραμμα 5.4.1, Κατανομή μεγέθους (πάνω) και κατανομή δυναμικού επιφάνειας (κάτω) του δείγματος Blank NPs



Διάγραμμα 5.4.2, Κατανομή μεγέθους (πάνω) και κατανομή δυναμικού επιφάνειας (κάτω) του δείγματος HT NPs

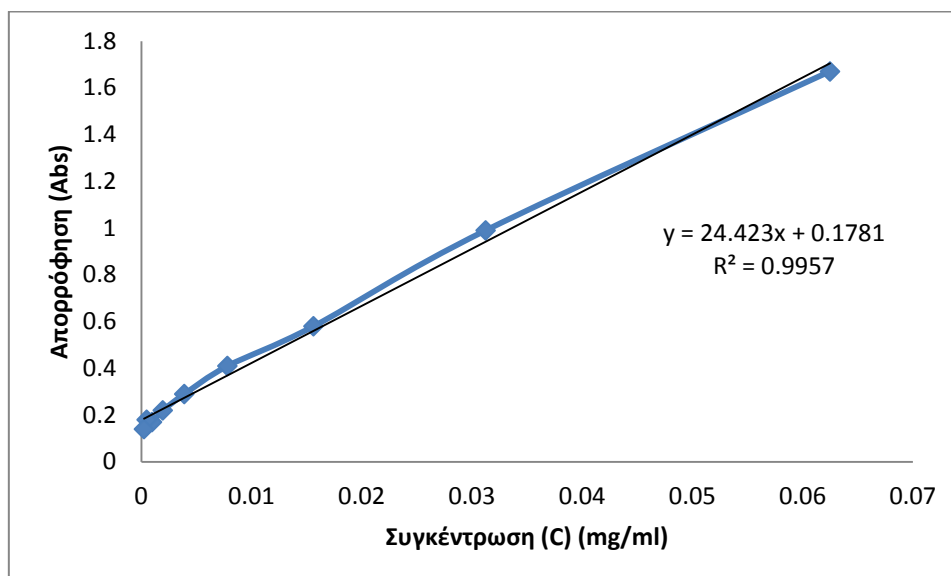
5.4.2 Ποσοστό εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης στα PLA Νανοσωματίδια (EE%)

Ο προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού της HT σε πολυμερικά νανοσωματίδια πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου της Φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-vis). Συγκεκριμένα, καταστρώθηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης προτύπων διαλυμάτων HT συναρτήσει της συγκέντρωσης τους, η όποια είναι γνωστή και στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε η μάζα της μη εγκλωβισμένης ουσίας. Αρχικά, προσδιορίζεται το μήκος κύματος της μεγίστης απορρόφησης, που βρέθηκε να είναι στα 277 nm. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων, στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα, αναπαρίστανται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.4.2.1):

Πίνακας 5.4.2.1, Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων

	Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση (Abs)
C ₁	0.0625	1.67
C ₂	0.03125	0.99
C ₃	0.015625	0.58
C ₄	0.007813	0.41
C ₅	0.0039	0.29
C ₆	0.00195	0.22
C ₇	0.000975	0.17
C ₈	0.0004875	0.18
C ₉	0.00024375	0.14

Έτσι, βασιζόμενοι στις μετρήσεις του Πίνακα 5.4.2.1, καταστρώνεται η καμπύλη αναφοράς της HT, για απορροφήσεις που πραγματοποιούνται σε $\lambda_{max}=277$ nm.



Διάγραμμα 5.4.3, Καμπύλη αναφοράς της υδροξυτυροσόλης (HT)

Μετά την κατάστρωση της καμπύλης αναφοράς, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της μάζας (mg) της ουσίας που δεν εγκλωβίστηκε. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα υπερκείμενα S1, S2 και S3 των φυγοκεντρήσεων, για μήκος κύματος 277 nm. Όποτε βάσει των παραπάνω δεδομένων, υπολογίστηκε η ικανότητα εγκλεισμού της HT. Στο παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων UV-vis.

Πίνακας 5.4.2.2, Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis

HT NPs	Υπερκείμενο S1	Υπερκείμενο S2 & S3
Απορρόφηση (Abs)	0,48	1,4148
Συγκέντρωση (mg/ml)	0,012360747	0,05064712
Όγκος (ml)	17	2,7
Μάζα (mg)	0,21	0,14

Η συνολική μάζα της HT που χρησιμοποιήθηκε στον εγκλεισμό ήταν 4,68 mg , η μη εγκλεισμένη ουσία βρέθηκε ότι είναι 0,35 mg, όποτε η εγκλεισμένη ουσία υπολογίζεται 4,33 mg. Έτσι, καταλήγουμε σε ποσοστό εγκλεισμού ίσο με :

$$EE\% = \frac{4,33 \text{ mg}}{4,68 \text{ mg}} \cdot 100 = 92,5$$

Παρατηρείται ότι η απόδοση εγκλεισμού για το συγκεκριμένο πείραμα είναι αρκετά υψηλή. Έτσι, αποδεικνύεται ότι η προσπάθεια εγκλεισμού της HT σε νανοσωματίδια PLA , μοριακού βάρους 51.700 g/mol, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.

5.5 Χαρακτηρισμός επικαλυμμένων νανοσωματιδίων

5.5.1 Μέγεθος, δείκτης διασποράς, ζ-δυναμικό και πάχος των κενών και επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων

Σε αυτό το κομμάτι τις διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων μοριακού βάρους 138.000 g/mol και 51.700 g/mol , με σκοπό την επικάλυψη των κενών νανοσωματιδίων και την κατανόηση της επίδρασης που εμφανίζει η επικάλυψη του διασταυρωμένου πολυμερούς επιχλωρυδρίνης- β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) στα πολυμερικά νανοσωματίδια.

Συνθήκες παρασκευής κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων

Η παρασκευή των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων με μοριακό βάρος του PLA , 138.000 g/mol (Πείραμα ZS21) πραγματοποιήθηκε με 1:1 αναλογία της διασποράς PLA νανοσωματιδίων και του υδατικού διαλύματος EP-β-CD , αντίστοιχα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την παρασκευή των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων.

Πίνακας 5.5.1.1, Συνθήκες παρασκευής κενών και επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων μοριακού βάρους PLA 138.000 g/mol

Πείραμα	Mw PLA (g mol ⁻¹)	T(°C)	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Χρόνος ανάδευσης (h)	Ποσότητα PLA (mg)	Διασπορα PLA NPs (ml)	Ποσότητα EP-β-CD (mg)	Ποσότητα υδατικού διαλύματος EP-β-CD (ml)
ZS12	138.000	25	250	-	26	4	-	-
ZS21	138.000	25	250	17	26	4	40	4

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε η επικάλυψη κενών νανοσωματιδίων με μοριακό βάρος του PLA , 51.700 g/mol (Πείραμα ZS21_a και ZS22_Abs). Ειδικότερα, για το Πείραμα ZS21_a η αναλογία της διασποράς PLA νανοσωματιδίων και του υδατικού διαλύματος EP-β-CD ήταν 2 :1, αντίστοιχα. Από την άλλη, για το Πείραμα ZS22_Abs, η αναλογία της διασποράς PLA νανοσωματιδίων και του υδατικού διαλύματος EP-β-CD ήταν 1 :1, αντίστοιχα. Στους δυο παρακάτω πίνακες αναπαρίστανται οι συνθήκες παρασκευής για το κάθε πείραμα ξεχωριστά.

Πίνακας 5.5.1.2, Συνθήκες παρασκευής κενών και επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol , με αναλογία PLA:EP-β-CD=2:1

Πείραμα	Mw PLA (g mol ⁻¹)	T(°C)	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Χρόνος ανάδευσης (h)	Ποσότητα PLA (mg)	Διασπορα PLA NPs (ml)	Ποσότητα EP-β-CD (mg)	Ποσότητα υδατικού διαλύματος EP-β-CD (ml)
ZS13	51.700	25	250	-	26	4	-	-
ZS21_a	51.700	25	250	17	26	4	40	2

Πίνακας 5.5.1.3, Συνθήκες παρασκευής κενών και επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol ,με αναλογία PLA:EP-β-CD=1:1

Πείραμα	Mw PLA (g mol ⁻¹)	T(°C)	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Χρόνος ανάδευσης (h)	Ποσότητα PLA (mg)	Διασπορά PLA NPs (ml)	Ποσότητα EP-β-CD (mg)	Ποσότητα υδατικού διαλύματος EP-β-CD (ml)
ZS22	51.700	25	250	-	26	4	-	-
ZS22_Abs	51.700	25	250	17	26	2	30	2

Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και σχολιασμός

Τα κενά και επικαλυμμένα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το δείκτη διασποράς, το ζ-δυναμικό και το πάχος της επικάλυψης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και ελήφθη ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.5.1.4, Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τα Νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 138.000 g/mol

Δείγμα	Μέγεθος (nm)	Δείκτης διασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
ZS12 BLANK NPs	260,8	0,292	-20,5
	259,2	0,260	-21
	263,4	0,299	-20,8
	M.O	261,1± 2,1	0,284±0,021
ZS12_ZS21	375,1	0,443	-19,5
	385	0,448	-19,5
	373,5	0,425	-18,4
	M.O	377,9±6,2	0,439±0,012

Πίνακας 5.5.1.5, Αποτελέσματα μετρήσεων του πάχους επικάλυψης των Νανοσωματιδίων με μοριακό βάρος PLA 138.000 g/mol

Δείγμα ZS12_ZS21	Πάχος επικάλυψης (nm)
M.O	57,2
	62,9
	55,1
	58,4±4,1

Σχολιασμός αποτελεσμάτων (Πινάκες 5.5.1.4 και 5.5.1.5)

Όσον αφορά τα κενά νανοσωματίδια, παρατηρείται ότι οι τιμές του μεγέθους, του ζ-δυναμικού και του δείκτη διασποράς, είναι αρκετά ικανοποιητικές. Ειδικότερα, η μεγάλη κατά απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού υποδηλώνει ότι στη διασπορά οι νανοσωματιδιακές δομές είναι σταθερές. Επίσης, η μικρή τιμή του δείκτη διασποράς υποδηλώνει την καλή ομοιογένεια των νανοσωματιδίων στη διασπορά. Σχετικά με τα νανοσωματίδια του δείγματος ZS12_ZS21, η αύξηση της διαμέτρου των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων είναι ένδειξη ότι έχει σχηματιστεί στρώση του EP-β-CD στα νανοσωματίδια του PLA, δηλαδή έχει πραγματοποιηθεί η διεργασία επικάλυψης των νανοσωματιδίων PLA από το EP-β-CD. Ως προς τις τιμές της πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού, δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή μεταξύ των νανοσωματιδίων χωρίς και με επικάλυψη. Επομένως, στα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται από PLA μοριακού βάρους 138.000 g/mol, η χρήση του EP-β-CD ως επικαλυπτικό μέσο δεν επιδρά σημαντικά στα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των σωματιδίων. Επιπρόσθετα, το πάχος του στρώματος EP-β-CD υπολογίζεται αφαιρώντας την ακτίνα των νανοσωματιδίων, χωρίς επικάλυψη, με εκείνα των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων. Ειδικότερα, παρατηρούμε ότι το πάχος, κατά μέσο όρο, είναι 58,4 nm.

Πίνακας 5.5.1.6, Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τα Νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol, με αναλογία PLA:EP-β-CD=2:1

Δείγμα	Μέγεθος (nm)	Δείκτης διασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
ZS13 BLANK NPs	278,1	0,209	-22,2
	279,6	0,186	-22,9
	276,2	0,221	-22,4
	M.O 278,0±1,7	0,205±0,018	-22,5±0,4
ZS13_ZS21	167,6	0,228	-21,5
	179,2	0,233	-20,9
	185,1	0,262	-20,8
	M.O 177,3±8,9	0,241±0,018	-21,1±0,4

Σχολιασμός αποτελεσμάτων (Πίνακας 5.5.1.6)

Συμφώνα με το μέγεθος των νανοσωματιδίων που πρόεκυψε μετά την επικάλυψη, παρατηρείται ότι για την συγκεκριμένη αναλογία δεν πραγματοποιήθηκε αύξηση του μεγέθους. Συγκεκριμένα, από μέγεθος των κενών σωματιδίων, 278 nm, προκύπτουν μετά την επικάλυψη νανοσωματίδια μεγέθους 177,3 nm. Πράγματι, βάσει της επιστημονικής μελέτης που έχει πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί πως σε χαμηλές αναλογίες του EP-β-CD οι επιφάνειες των νανοσωματιδίων καλύπτονται εν μέρει από το προσροφημένο

πολυμερές.^[16] Επομένως, η αναλογία PLA:EP-β-CD=2:1 δεν επιτρέπει την επικάλυψη των συγκεκριμένων νανοσωματιδίων.

Πίνακας 5.5.1.7, Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τα Νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol, με αναλογία PLA:EP-β-CD=1:1

Δείγμα	Μέγεθος (nm)	Δείκτης διασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
ZS22 Blank NPs	353,6	0,175	-13,1
	364,4	0,196	-12,9
	357,7	0,161	-16,8
	M.O	358,6±5,5	0,177±0,018
ZS22_Abs	829,8	0,585	-27,3
	796,7	0,622	-27,9
	823,2	0,536	-30,8
	M.O	816,6±17,5	0,581±0,043

Πίνακας 5.5.1.8, Αποτελέσματα μετρήσεων του πάχους επικάλυψης των Νανοσωματιδίων με μοριακό βάρος PLA 51.700 g/mol, με αναλογία PLA:EP-β-CD=1:1

Δείγμα ZS22_Abs	Πάχος επικάλυψης (nm)
M.O	238,1
	216,2
	232,8
	229±11,4

Σχολιασμός αποτελεσμάτων (Πινάκες 5.5.1.7 και 5.5.1.8)

Βάσει των τιμών του δείκτη διασποράς και του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων του δείγματος ZS22 Blank NPs, συμπεραίνεται ότι η ομοιογένεια και η σταθερότητα των νανοσωματιδίων στη διασπορά είναι πολύ καλή. Η ένδειξη αύξησης του μεγέθους των κενών νανοσωματιδίων, υποδηλώνει ότι έχει σχηματιστεί στρώση του EP-β-CD στα νανοσωματίδια του PLA, οπότε για αναλογία PLA:EP-β-CD 1:1 έχει πραγματοποιηθεί η διεργασία επικάλυψης των νανοσωματιδίων PLA από το EP-β-CD. Ως προς τις τιμές του ζ-δυναμικού των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, παρατηρείται ότι η επικάλυψη συμβάλει θετικά στην σταθερότητα των νανοσωματιδίων στη διασπορά, αφού η τιμή του ζ-δυναμικού από -14,3 mV αυξάνεται κατά απόλυτη τιμή στα -28,7 mV. Όσον αφορά το πάχος της επικάλυψης, βάσει των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η στρώση του EP-β-CD είναι 229 nm.

¹⁶ Amani El Fagui, Florent Dalmas, Cédric Lorthioir, et al, " Well-defined core-shell nanoparticles containing cyclodextrin in the shell: A comprehensive study", Polymer, 52, 2011, 3752-3761.

5.5.2 Μελέτη σταθερότητας επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων

Η μελέτη της σταθερότητας πραγματοποιήθηκε για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 138.000 g/mol (ZS12_ZS21) και για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol (ZS22_Abs). Πιο συγκεκριμένα, η διασπορά των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης, στους 4°C, σε γυάλινο φιαλίδιο, σε περίπου 3 ml απιονισμένου νερού. Η μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε περίοδο 40 ημερών, πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν η επικάλυψη προσδίδει σταθερότητα στο μέγεθος των νανοσωματιδίων του πολυ(γαλακτικού) οξέος. Τα αποτελέσματα που πρόέκυψαν, σχετικά με το μέσο μέγεθος της κάθε παρτίδας επικαλυμμένων νανοσωματιδίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.5.2.1, Αποτελέσματα DLS για τα επικαλυμμένα Νανοσωματίδια

Δείγμα	ZS12_ZS21		ZS22_Abs	
	Μέγεθος(nm)	Pdl	Μέγεθος(nm)	Pdl
Αρχική μέτρηση	377,9±6,2	0,439±0,012	816,6± 17,5	0,581±0,043
Τελική μέτρηση (40 ημέρες)	358,3±0,3	0,425±0,060	790,9±172,2	0,554±0,090

Ως προς το δείκτη διασποράς των δυο δειγμάτων, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σημαντική μείωση μετά το διάστημα των 40 ημερών, δηλαδή η ομοιομορφία του δείγματος παραμένει σταθερή. Για το δείγμα ZS12_ZS21, παρατηρούμε ότι η μείωση του μεγέθους είναι πολύ μικρή, γεγονός που δείχνει ότι το δείγμα δε μεταβάλλεται σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, η επικάλυψη του EP-β-CD παραμένει ακόμα προσροφημένη στα νανοσωματίδια του PLA. Από την άλλη, για το δείγμα ZS22_Abs, παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους, σε σύγκριση με το δείγμα ZS12_ZS21. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το πολυμερές της β-κυκλοδεξτρίνης δεν μπορεί να αναπτύξει τόσο ισχυρούς δεσμούς με το πολυ(γαλακτικό οξύ), μοριακού βάρους 51.700 g/mol. Συμπερασματικά, είναι πιθανόν το πολυμερές της β-κυκλοδεξτρίνης να αναπτύσσει ισχυρότερους δεσμούς με PLA υψηλού μοριακού βάρους, στα οποία προσδίδει και καλύτερη σταθερότητα στο μέγεθος. Όμως και στις δυο περιπτώσεις η σταθερότητα της επικάλυψης, κατά το διάστημα των 40 ημερών, είναι αρκετά ικανοποιητική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συμπεράσματα

Μελλοντικές προτάσεις

Συμπεράσματα

Η διεργασία του εγκλεισμού βιοδραστικών ουσιών σε πολυμερικά νανοσωματίδια εφαρμόζεται με σκοπό την προστασία και βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην μελέτη τέτοιων νανοσωματιδιακών συστημάτων ιδιαίτερα στο τομέα των φαρμάκων και καλλυντικών. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε ο εγκλεισμός του φυσικού αντιοξειδωτικού υδροξυτυροσόλη και η ικανότητα επικάλυψης κενών νανοσωματιδίων πολυ(γαλακτικού οξέος) με διασταυρωμένο πολυμερές επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης(EP-β-CD).

Καταρχήν, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης σε δυο στάδια. Οι αντιδράσεις που επιλέχθηκαν οδήγησαν στο σχηματισμό της ένωσης με επιτυχία ,βάσει των φασμάτων NMR που λήφθηκαν. Έπειτα ακλούθησε ο εγκλεισμός της ουσίας σε νανοσωματίδια PLA μοριακού βάρους 51.700 g/mol. Συγκεκριμένα, για τον εγκλεισμό χρησιμοποιήθηκε η εμπορική HT , ώστε να ληφθούν πιο αξιόλογα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Η μέθοδος του εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε με τη γαλακτωματοποίηση με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Τα νανοσωματίδια που παρήχθησαν μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος , ζ-δυναμικό, πολυδιασπορά και την απόδοση εγκλεισμού της ουσίας.

Τα Blank NPs που σχηματιστήκαν εμφάνισαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα, είχαν μέγεθος της τάξης των 200 nm και η τιμή του ζ-δυναμικού ήταν αρκετά υψηλή , πράγμα που υποδηλώνει ότι η διασπορά των νανοσωματιδίων είναι σταθερή. Επίσης, εμφάνισαν μικρή τιμή του δείκτη διασποράς, μικρότερη της μονάδας, κάτι που αποδεικνύει την καλή ομοιογένεια των νανοσωματιδίων στη διασπορά. Αναφερόμενοι στα νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη υδροξυτυροσόλη , βρέθηκε ότι το μέγεθος τους ήταν της τάξης των 300 nm και η τιμή του ζ-δυναμικού και της πολυδιασποράς ήταν και εδώ αρκετά ικανοποιητική. Συμπερασματικά , ως προς τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά η ενσωμάτωση της HT στα πολυμερικά νανοσωματίδια δεν οδήγησε σε σημαντική αλλαγή αυτών των παραμέτρων.

Στη συνέχεια , τα loaded NPs μελετήθηκαν ως προς την απόδοση εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης. Βάσει της καμπύλης αναφοράς και των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το UV-vis, βρέθηκε ότι το σύστημα αυτό εμφανίζει ικανότητα εγκλεισμού , 92,5 %. Δηλαδή, ο εγκλεισμός της HT σε νανοσωματίδια PLA , μοριακού βάρους 51.700 g/mol, πραγματοποιείται με επιτυχία.

Με σκοπό την μελέτη της ικανότητας επικάλυψης κενών νανοσωματιδίων πολυ(γαλακτικού οξέος), έλαβε μέρος η σύνθεση του υδατοδιαλυτού διασταυρωμένου πολυμερούς επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης(EP-β-CD). Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πολυμερούς με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους , αλλάζοντας την ποσότητα της επιχλωρυδρίνης και τον χρόνο πολυμερισμού, με σκοπό την παραλαβή υδατοδιαλυτού προϊόντος με υψηλό μοριακό βάρος. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι για γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10 και 33 % NaOH , οι χρόνοι πολυμερισμού 16 ώρες και 6 ώρες, δεν καταλήγουν στην παραλαβή προϊόντος . Σε

αυτές τις περιπτώσεις, εμφανίστηκε το φαινόμενο του ζελαρίσματος του πολυμερούς κατά το οποίο οι αλυσίδες του πολυμερούς ξεκινάμε να διασταυρώνονται μεταξύ τους και να δημιουργείται πλέγμα, το οποίο είναι αδιάλυτο. Για χρόνο πολυμερισμού 3 ώρες και 50 λεπτά και 33 % w/w NaOH, η γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10, οδήγησε στην παραλαβή του καλύτερου προϊόντος αφού δεν πραγματοποιείται το ζελάρισμα του πολυμερούς. Τέλος, για χρόνο πολυμερισμού 3 ώρες και 50 λεπτά και 33 % w/w NaOH, η γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=12, οδήγησε και εδώ στην παραλαβή προϊόντος.

Για την πιστοποίηση της δομικής μονάδας του πολυμερούς που συντέθηκε, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του NMR μαζί με την ανάλυση του DSC και την ανάλυση FT-IR. Παράλληλα, για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και των θερμικών ιδιοτήτων έγινε χρήση της ιξωδομετρίας διαλύματος και η ανάλυση DSC σε συνδυασμό με την Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA), αντίστοιχα.

Για το πολυμερές που παρασκευάστηκε με γραμμομοριακή αναλογία EP/β-CD=10, τα αποτελέσματα από το NMR, DSC και FT-IR έδειξαν ότι ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά το προϊόν αποτελεί πολυμερές. Έπειτα, για τον υπολογισμό του οριακού αριθμού ιξώδους $[\eta]$, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ιξωδομετρίας διαλύματος με στόχο την εκτίμηση του μοριακού βάρους του πολυμερούς. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι, εμφανίζει $[\eta]=0,055$ dL/g και το μοριακό βάρος εκτιμήθηκε, $M_w=5 \cdot 10^4$ g/mol. Βάσει των γραφημάτων DSC και TGA διαπιστώνεται ότι πρόκειται για ένα άμορφο πολυμερές που δεν εμφανίζει κορυφή τήξης. Επίσης, προκύπτει ότι το πολυμερές αρχίζει να αποικοδομείται γύρω στους 260°C και εμφανίζει μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης στους 317,94 °C. Από το γράφημα του TGA, προσδιορίστηκε ότι το στερεό υπόλειμμα του πολυμερούς είναι 46,31%.

Από την άλλη, βάσει του φάσματος NMR που λήφθηκε για το προϊόν που παρασκευάστηκε με EP/β-CD=12, παρατηρήθηκε ότι το πολυμερές που σχηματίστηκε είχε πολλές ομοιότητες με το μονομερές του, πράγμα που υποδηλώνει ότι μπορεί να μην έχει σχηματιστεί πολυμερές και αν έχει σχηματιστεί πολυμερές, είναι πολύ μικρού μοριακού βάρους. Εν συνεχεία, για την εκτίμηση του μοριακού βάρους πραγματοποιήθηκε η ιξωδομετρία διαλύματος βάσει της οποίας διαπιστώθηκε ότι με την αύξηση της ποσότητας της επιχλωρυδρίνης δεν ευνοήθηκε η τιμή του οριακού αριθμού ιξώδους, $[\eta]=0,037$ dL/g. Το συγκεκριμένο πολυμερές δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω.

Ύστερα από τον χαρακτηρισμό του πολυμερούς, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων μοριακού βάρους 138.000 g/mol και 51.700 g/mol, με σκοπό την επικάλυψη των κενών νανοσωματιδίων και την κατανόηση της επίδρασης που εμφανίζει η επικάλυψη του διασταυρωμένου πολυμερούς επιχλωρυδρίνης-β-κυκλοδεξτρίνης (EP-β-CD) στα πολυμερικά νανοσωματίδια.

Όσον αφορά τα κενά νανοσωματίδια $M_w=138.000$ g/mol, οι τιμές του μεγέθους, του ζ-δυναμικού και του δείκτη διασποράς, είναι αρκετά ικανοποιητικές. Ειδικότερα, οι νανοσωματιδιακές δομές εμφάνιζαν σταθερότητα και πολύ καλή ομοιογένεια. Σχετικά με τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων πράγμα το οποίο υποδεικνύει ότι έχει πραγματοποιηθεί η διεργασία

επικάλυψης των νανοσωματιδίων PLA από το EP-β-CD. Ως προς τις τιμές της πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή μεταξύ των νανοσωματιδίων χωρίς και με επικάλυψη. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε το πάχος της επικάλυψης και βρέθηκε ότι είναι, κατά μέσο όρο, 58,4 nm.

Για τα νανοσωματίδια μοριακού βάρους 51.700 g/mol, παρατηρήθηκε ότι η αναλογία PLA:EP-β-CD 2:1, δεν οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους δηλαδή δεν πραγματοποιήθηκε η διεργασία επικάλυψης. Αντίθετα, για αναλογία PLA:EP-β-CD 1:1, παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων. Ως προς τις τιμές του ζ-δυναμικού των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, παρατηρείται ότι η επικάλυψη συμβάλει θετικά στην σταθερότητα των νανοσωματιδίων στη διασπορά, λόγω της αύξησης της τιμής του ζ-δυναμικού. Όσον αφορά το πάχος της επικάλυψης, βάσει των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η στρώση του EP-β-CD είναι 229 nm.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της σταθερότητας για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 138.000 g/mol και για τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια μοριακού βάρους PLA 51.700 g/mol. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε περίοδο 40 ημερών, με σκοπό να διαπιστωθεί αν η επικάλυψη προσδίδει σταθερότητα στο μέγεθος των νανοσωματιδίων του πολυ(γαλακτικού) οξέος. Τα αποτελέσματα που πρόεκυψαν έδειξαν ότι και στις δυο περιπτώσεις η σταθερότητα της επικάλυψης, κατά το διάστημα των 40 ημερών, δε μεταβάλλεται σημαντικά.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα τελευταία χρόνια, ο εγκλεισμός δραστικών ενώσεων σε κολλοειδή συστήματα νανοφορέων έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της φαρμακευτικής και κοσμητικής. Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού των ενώσεων, συμβάλλουν στην προσαρμογή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και στην βελτίωση της σταθερότητας τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, βάσει των πειραμάτων που διεξήχθησαν και των αποτελεσμάτων που πρόέκυψαν κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθούν κάποια σημεία της έρευνας περεταίρω. Έτσι οδηγούμαστε στις εξής προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

- ❖ *Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη υδροξυτυροσόλη*

Να πραγματοποιηθεί η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της εγκλεισμένης σε PLA νανοσωματίδια υδροξυτυροσόλης, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο ο εγκλεισμός επιδρά στη βιολογική δραστικότητα του μορίου.

- ❖ *Μελέτη της αποδέσμευσης της υδροξυτυροσόλης*

Η μελέτη της αποδέσμευσης της υδροξυτυροσόλης από τα νανοσωματίδια του PLA. Ειδικότερα, να πραγματοποιηθεί η μελέτη σε ρυθμιστικά διαλύματα που προσομοιάζουν το pH του ανθρώπινου δέρματος (pH=5,5). Επίσης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η μελέτη σε φυσιολογικό ορό με pH=7,0 και σε αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικό (Phosphate buffered saline-PBS), pH=7,4.

- ❖ *Μελέτη των παραμέτρων της διεργασίας εγκλεισμού*

Να μελετηθεί η επίδραση που θα φέρει η μεταβολή των παραμέτρων όπως το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το ποσοστό φόρτωσης της ουσίας, η αναλογία υδατικής προς οργανικής φάσης του γαλακτώματος, η θερμοκρασία και ο ρυθμός ανάδευσης κατά τον σχηματισμό γαλακτώματος.

- ❖ *Μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων που περιέχουν την υδροξυτυροσόλη*

Προτείνεται να πραγματοποιηθούν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για διαφορετικούς χρόνους και συνθήκες αποθήκευσης, ώστε να μελετηθεί η σταθερότητα του μεγέθους των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη. Επιπλέον, να πραγματοποιηθεί η λυοφιλοποίηση της διασποράς των νανοσωματιδίων και να μελετηθεί κατά πόσο η λυοφιλοποίηση επηρεάζει τα χαρακτηριστικά τους.

- ❖ *Χρήση εναλλακτικών πολυμερών για τον εγκλεισμό της ένωσης*

Να μελετηθεί η διεργασία εγκλεισμού σε αλλά πολυμερή, όπως το πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (PLGA), την πολυ(αιθυλενο γλυκόλη)(PEG) και την πολυ-ε-καπρολακτόνη (PCL).

❖ *Προσδιορισμός του πάχους επικάλυψης της EP-β-CD στα νανοσωματίδια του PLA*

Για τον προσδιορισμό του πάχους επικάλυψης, θα μπορούσε να πραγματοποιηθούν συμπληρωματικά με την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) οι εξής τεχνικές: την Φασματοφωτομετρία UV-VIS, η Φασματοσκοπία υπερύθρου IR και τον Μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία (Quartz crystal microbalance, QCM).

❖ *Προσδιορισμός του μοριακού βάρους του πολυμερούς EP-β-CD*

Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους της EP-β-CD, εκτός της χρήσης της ιξωδομετρίας διαλύματος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size exclusion chromatography - SEC).

Βιβλιογραφία Θεωρητικού μέρους

- [1] Denis Deffieux, Philippe Gossart, Stéphane Quideau, "Facile and sustainable synthesis of the natural antioxidant hydroxytyrosol", *Tetrahedron Letters*, **2014**, *55*, 2455–2458.
- [2] Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, Nucci R. "Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties", *J Agric Food Chem.* , **2002**, *50*, 4934–4940.
- [3] Manna C., Migliardi V., Golino P., Scognamiglio A., Galletti P., Chiariello M., Zappia V., "Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion", *J. Nutr. Bioche*, **2004**, *15*, 461–466.
- [4] Omar SH., "Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive", *Saudi Pharm J* , **2010**, *18*, 111–121.
- [5] Brenes M, Garcva A, Garcva P, Garrido A., "Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system", *J Agric Food Chem.* **2000**, *48*, 5178–5183.
- [6] Fernández-Bolapos J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillón R, Jiménez A., "Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of twophase olive oil processing or "Alperujo""", *J Agric Food Chem.* **2002**, *50*, 6804–6811.
- [7] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), anti-inflammatory properties (ID 1882), contributes to the upper respiratory tract health (ID 3468), can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract (3779), and contribute to body defences against external agents (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, *EFSA J.* **9** (4) (2011) 2033.
- [8] Stefania Bulotta, Marilena Celano, Saverio Massimo Lepore, Tiziana Montalcini, Arturo Pujia, Diego Russo, "Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases", *Journal of Translational Medicine*, **2014**, *12*, 1-9

- [9] S. Rietjens, A. Bast, J. de Vente, G. Haenen, "The olive oil antioxidant hydroxy-tyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NO• response of isolated rat aorta", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, 1931–1936.
- [10] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [11] Granados-Principal S, Quiles J.L., Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M.C., "Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials", *International Life Sciences Institute, Nutrition Reviews* ,**2010**, *68*, 191–206.
- [12] José G. Fernández-Bolaños, Óscar López, M. Ángeles López-García, Azucena Marset, "Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives", *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech
- [13] Piersanti G., Retini M., Espartero J.L., Madrona A., Zappia G., "An efficient, economical synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer–Villiger oxidation", *Tetrahedron Letters*, **2011**, *52*, 4938-4940.
- [14] Balsano C & Alisi A., "Antioxidant effects of natural bioactive compounds", *Curr Pharm Des*, **2009**, *15*, 3063-3073.
- [15] Torres de Pinedo A, Pepalver P, & Morales JC., "Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship", *Food Chem*, **2007**, *103*, 55-61.
- [16] Visioli F, Bellomo GF, & Galli C., "Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols", *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, *247*, 60–64.
- [17] Okezie I. Aruoma , Monica Deiana , Andrew Jenner ,Barry Halliwell ,Harparkash Kaur , Sebastiano Banni ,Francesco P. Corongiu ,M. Assunta Dessí ,Robert Aeschbach , "Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation", *J Agric Food Chem*, **1998**, *46*, 5181–5187.
- [18] Turner R, Etienne N, Alonso MG, de Pascual-Teresa S, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G., "Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics", *Int J Vitam Nutr Res.* **2005**, *75*, 61–70.
- [19] Gonzalez-Santiago M, Fonolla J, & Lopez-Huertas E., "Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins", *Pharmacol Res*, **2010**, *61*, 364–370.
- [20] Vázquez-Velasco M, Esperanza Díaz L, Lucas R, Gómez-Martínez S, Bastida S, Marcos A, Sánchez-Muniz FJ., "Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors", *Br J Nutr*, **2011**, *105*, 1448–1452.

- [21] Goya L, Mateos R, & Bravo L, "Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells protection against oxidative stress induced by tertbutylhydroperoxide", *Eur J Nutr*, **2007**, *46*, 70–78.
- [22] Bakowska, A., Kucharska, Z. A., & Oszmianski, J., "The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex", *Food Chemistry*, **2003**, *81*, 349–355.
- [23] Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A., "Chemical studies of anthocyanins: A review", *Food Chemistry*, **2009**, *113*, 859–871.
- [24] Augusto Gambacorta, Daniela Tofani, Roberta Bernini, Antonella Migliorini, "High-Yielding Preparation of a Stable Precursor of Hydroxytyrosol by Total Synthesis and from the Natural Glycoside Oleuropein", *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3386-3391.
- [25] Ilona Di Maio, Sonia Esposto, Agnese Taticchi, Roberto Selvaggini, Gianluca Veneziani, Stefania Urbani, Maurizio Servili, "HPLC–ESI–MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil", *Food Chemistry*, **2011**, *125*, 21-28.
- [26] Sawyer DJ., "Bioprocessing – no longer a field of dreams", *Macromol Symp*, **2003**, *201*, 271-81.
- [27] Gilding D.K., Reed A.M., "Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(actic acid) homo-and copolymers:1", *Business Press Polymer*, **1979**, *20*, 1459-1464.
- [28] Vink T., Rabago K., Glassner D., Gruber P., "Application of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production", *Polym Degrad Stab*, **2003**, *80*, 403-19.
- [29] Maharana T., Maohanty B., Negi Y.S., "Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability", *Progress in Polymer Science*, **2009**, *34*, 99-124.
- [30] Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang and Mario Gauthier, "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications", *Biomedical Science Engineering and Technology*, Chapter 11, 249-250.
- [31] Lim L.-T., Auras R., Rubino M., "Processing technologies for poly(lactic acid)", *Progress in Polymer Science*, **2008**, *33*, 820-852.
- [32] Αντώνιος Α. Σερέτης Χημική σύνθεση γραμμικών και διακλαδισμένων βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών και συμπολυμερών του πολυγαλακτικού οξέος, Διδακτορική Διατριβή Α.Π.Θ. 2011.

- [33] J. Lunt, "Large-scale production, properties and commercial applications of poly lactic acid polymers", *Polymer Degradation and Stability*, **1998**, *59*, 145–152.
- [34] Chae Hwan Hong, Si Hwan Kim, Ji-Yeon Seo, and Do Suck Han, "Development of Four Unit Processes for Biobased PLA Manufacturing", *International Scholarly Research Network ISRN Polymer Science*, **2012**, *2012*, 1-6.
- [35] Garlotta D. A, "literature review of poly(lactic acid)", *J Polym Environ*, **2001**, *9*, 63–84.
- [36] Kulkarni, R.K., Moore, E.G., Hegyeli, A.F., Leonard, F., "Biodegradable poly(lactic acid) polymers", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1971**, *5*, 169-181.
- [37] Costa Lima S, Rodrigues V, Garrido J, Borges F, Kong Thoo Lin P, Cordeiro da Silva A., "In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa", *Int J Antimicrob Agents*, **2012**, *39*, 424-30.
- [38] Avnesh Kumari, Sudesh Kumar Yadav, Subhash C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2010**, *75*, 1-18.
- [39] C.E. Mora-Huertasa, H. Fessia, A. Elaissaria, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, *385*, 113–142.
- [40] Fritz Ullmann, Matthias Bohet, "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", *Wiley - VCH*, **2005**, *23*, 157-172
- [41] Pinto Reis C., Neufeld RJ., Ribeiro AJ., Veiga F., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles", *Nanomedicine*, **2006**, *2*, 8-21.
- [42] O'Donnell P., McGinity J., "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique", *USA Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, *28*, 25–42.
- [43] Xiao RZ, Zeng ZW, Zhou GL, Wang JJ, Li FZ, Wang AM, "Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles", *International Journal of Nanomedicine*, **2010**, *5*, 1057–1065.
- [44] Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J., "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size", *Pharm Res*, **1996**, *13*, 1838–1845.
- [45] Hunter R.J., "Zeta Potential in Colloid Science: principles and applications", *Academic Press*, London, **1981**.
- [46] Dorian Hanaor, Marco Michelazzi, Cristina Leonelli, Charles C. Sorrell, "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂", *Journal of the European Ceramic Society*, **2012**, *32*, 235-244.
- [47] Greenwood R., Kendall K., *Journal of the European Ceramic Society* 1991, *19* (4): 479-488.

- [48] Abdelwahed W., Degobert G., Fessi H., "Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2006**, *63*, 87–94.
- [49] Chacon M., Molpeceres J., Berges L., Guzman M., Aberturas M.R., "Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1999**, *8*, 99–107.
- [50] Auvillain M., Cavé G., Fessi H., Devissaguet J.P., "Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques", *STP Pharma*, **1989**, *5*, 738–744.
- [51] K. Uekama, "Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation", *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, *52*, 900–915.
- [52] T. Loftsson, M.E. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization", *J. Pharm. Sci.*, **1996**, *85*, 1017–1025.
- [53] J. Szejtli, "Medicinal applications of cyclodextrins", *Med. Res. Rev.*, **1994**, *14*, 353–386.
- [54] T. Loftsson, H. Fridriksdottir, A.M. Sigurdardottir, "The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation", *Int. J. Pharm.*, **1994**, *110*, 169–177.
- [55] Nadiah Zafar, Hatem Fessi, Abdelhamid Elaissari, "Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications", *International Journal of Pharmaceutics*, **2014**, *461*, 351–366.
- [56] Frank van de Manakker, Tina Vermonden, Cornelus F. van Nostrum, Wim E. Hennink, "Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications", *American Chemical Society*, **2009**, *10*, 3157–3175.
- [57] E.M. Martin Del Valle, "Cyclodextrins and their uses: a review", *Process Biochemistry*, **2003**, *1*–14.
- [58] Szejtli J., "Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry", *Chem Rev*, **1998**, *98*, 1743–53.
- [59] P.J. Sicard, M.-H. Saniez, "Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products, in: D. Duchêne (Ed.), Cyclodextrins and their industrial uses", *Editions de Santé: Paris*, **1987**, 77–103.
- [60] Biber A., Antranikian G. and Heinzle E., "Enzymatic production of cyclodextrins", *Applied Microbiology & Biotechnology*, **2002**, *59*, 609–617.
- [61] Steed J.W and Atwood J.L, "Supramolecular Chemistry", *Wiley*, **2002**, 321–334.
- [62] Gidwani B., Vyas A., "Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2014**, *114*, 130–137.

- [63] N.M. Crini, G. Crini, "Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers", *Prog. Polym. Sci.*, **2013**, 38, 344-368.
- [64] G. Crini, H. Peindy, "Adsorption of C.I. Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups", *Dyes Pigment*, **2006**, 70, 204-211.
- [65] Κ.Δ.Παπασπυρίδης, "ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ", Αθήνα 2014, σελ.49-66.
- [66] ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ: http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_THERMAL.pdf
- [67] Παππά Α, Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης, Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρία μάζας, Εκδ. ΕΜΠ, Αθήνα 2004.
- [68] ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΥΠΕΡΥΟΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ:
http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_3_4.pdf
- [69] Μαρία Όξενκιουν-Πετροπούλου, "Φασματομετρικές Μέθοδοι", Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Γ' ΕΚΔΟΣΗ, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα 2012.
- [70] Μ Όξενκιουν-Πετροπούλου, Α.Παππά, "ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ", ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΠ, 3ή Έκδοση, Αθήνα 2009.
- [71] ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΜΕΡΙΣΤΟΥΔΗ, Ανάπτυξη Υβριδικών Φωτονικών Υλικών για Εφαρμογές σε Οπτικούς Αισθητήρες, Πανεπιστήμιο Πατρών, Αθήνα 2009.