



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

---

Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών

**Διευθυντής:** Κωνσταντίνος Δ. Παπασπυρίδης, *Καθηγητής ΕΜΠ*

Μελέτη διεργασιών εγκλεισμού δραστικών μορίων σε  
νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) με χρήση της τεχνικής  
διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ιατρού Βασιλεία**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:** Σταματίνα Βουγιούκα, *Επίκουρος Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.*

**ΑΘΗΝΑ 2015**



## Πρόλογος

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015. Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε ο εγκλεισμός δραστικών μορίων σε νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) PLA και η μελέτη του εγκλεισμού με χρήση της τεχνικής Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, κα. Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρο Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της, την υποστήριξη και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής και πιο συγκεκριμένα, τον κ. Κωνσταντίνο Παπασπυρίδη, Καθηγητή Ε.Μ.Π., για την συνεισφορά του στην εκπόνηση της εργασίας και την κα. Αναστασία Δέτση, Επίκουρο Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για την πολύτιμη βοήθειά της.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω επίσης στον Δρ. Δημήτριο Κορρέ, Ε.Δ.Ι.Π., για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, τις συμβουλές και την υποστήριξη του σε κάθε βήμα της διπλωματικής εργασίας, που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών και του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, καθώς και τις υποψήφιες Διδάκτορες Ιωάννα-Νεκταρία Γεωργουσοπούλου, Μαρία Σαπουνά καθώς και τον συμφοιτητή μου Καμτσικάκη Αριστοτέλη για την ομαδικότητα και το φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν, καθιστώντας την προσπάθεια αυτή ευκολότερη.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και τα φιλικά μου πρόσωπα για την υποστήριξη που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	1
Abstract.....	3
Κεφάλαιο 1: Βιοπολυμερή: Η περίπτωση του πολυ(γαλακτικού οξέος) .....	5
1.1    Εισαγωγή.....	5
1.2    Επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα πολυ(γαλακτικού οξέος).....	6
1.3    Φυσικές και χημικές ιδιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος) .....	8
1.3.1    Γαλακτικό οξύ και λακτίδιο.....	8
1.3.2    Θερμικές Ιδιότητες.....	9
1.3.3    Μηχανικές ιδιότητες.....	12
1.3.4    Οπτικές ιδιότητες.....	14
1.3.5    Ιδιότητες φράγματος .....	15
1.4    Διεργασίες πολυμερισμού πολυ(γαλακτικού οξέος) .....	16
1.4.1    Σύνθεση μονομερών πολυ(γαλακτικού οξέος).....	16
1.4.2    Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP).....	20
1.4.3    Πολυμερισμός Άμεσης Συμπύκνωσης.....	22
1.5    Διάσπαση Πολυ(γαλακτικού οξέος) στο περιβάλλον.....	23
1.6    Εφαρμογές Πολυ(γαλακτικού οξέος) .....	27
1.6.1    Ιατρική.....	27
1.6.2    Συσκευασία.....	32
1.6.3    Αγροτικά προϊόντα.....	34
1.6.4    Υφάσματα- Ίνες.....	35
1.6.5    Αυτοκινητοβιομηχανία .....	36
1.6.6    Ηλεκτρικός Εξοπλισμός.....	37
1.7    Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	38
Κεφάλαιο 2: Διεργασίες εγκλεισμού βιοδραστικών μορίων σε νανοσωματίδια πολυμερούς .....	41
2.1    Εισαγωγή.....	41
2.1.1    Πλεονεκτήματα πολυμερικών νανοσωματιδίων.....	42
2.2    Μέθοδοι σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων (NPs) .....	42
2.3    Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων .....	48

2.4	Μηχανισμοί απελευθέρωσης δραστικών ουσιών.....	49
2.5	Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	51
Κεφάλαιο 3: Αξιοποίηση ανάλυσης Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε μελέτες εγκλεισμού .....		53
3.1	Εισαγωγή.....	53
3.2	Προσδιορισμός διαλυτότητας δραστικής ουσίας σε πολυμερική μήτρα .....	54
3.3	Στόχος διπλωματικής εργασίας – Δραστικές ουσίες προς εγκλεισμό.....	58
3.4	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	63
Κεφάλαιο 4: Πειραματική διαδικασία μελέτης διεργασιών εγκλεισμού με χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης .....		67
4.1	Πρώτες ύλες.....	67
4.2	Πειραματική διαδικασία παρασκευής φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και πολυμερούς .....	68
4.3	Θερμική ανάλυση (DSC και TGA) φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και πολυμερούς .....	70
4.4	Πειραματική διαδικασία εγκλεισμού δραστικών μορίων σε νανοσωματίδια PLA.....	72
4.5	Μέθοδοι χαρακτηρισμού πρώτων υλών και νανοσωματιδίων .....	74
4.5.1	Ιξωδομετρία διαλύματος .....	74
4.5.2	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC).....	82
4.5.3	Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA).....	83
4.5.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	87
4.5.5	Φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis).....	88
4.6	Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	91
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και συζήτηση χαρακτηρισμού φυσικών μειγμάτων μέσω θερμικής ανάλυσης .....		93
5.1	Αποτελέσματα χαρακτηρισμού δειγμάτων πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA) .....	93
5.2	Επιλογή τεχνικής παρασκευής φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και PLA .....	94
5.3	Προσδιορισμός διαλυτότητας/αναμειξιμότητας δραστικών ουσιών και πολυ(γαλακτικού οξέος) .....	102
5.3.1	Φυσικά μείγματα p-κουμαρικού οξέος.....	103
5.3.2	Φυσικά μείγματα p-μεθοξικιναμικού οξέος.....	107
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα και συζήτηση παρασκευής νανοσωματιδίων PLA με δραστική ουσία .....		111
6.1	Χαρακτηρισμός τοπολογίας «κενών» νανοσωματιδίων PLA .....	111
6.2	Χαρακτηρισμός τοπολογίας νανοσωματιδίων PLA που περιέχουν δραστική ουσία.....	113
6.3	Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού των δραστικών ουσιών σε νανοσωματίδια PLA.....	119

6.3.1	Έμμεση και άμεση απόδοση εγκλεισμού p-κουμαρικού οξέος.....	119
6.3.2	Έμμεση και άμεση απόδοση εγκλεισμού p-μεθοξυκιναμικού οξέος.....	123
6.4	Συσχετισμός αποτελέσματος διεργασιών εγκλεισμού με αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης 127	
6.5	Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων .....	128
	Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	132
	Παράρτημα Α.....	137
	Παράρτημα Β.....	143





## Περίληψη

Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού βιοδραστικών μορίων έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών, καθώς βελτιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εγκλεισμένων ουσιών, βοηθούν στη στοχευμένη και ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων, καθώς και στην προστασία ασταθών/ευαίσθητων ενώσεων. Ο εγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα μεγάλο τομέα ερευνών τόσο στην Ιατρική, τη Φαρμακευτική όσο και στην Κοσμετολογία, όπου το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πολυμερές, καθώς είναι ένα βιοσυμβατό, βιοαποικοδομήσιμο (biodegradable) υλικό, και μπορεί να προέρχεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες (bio-based).

Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της δυνατότητας πρόβλεψης της απόδοσης εγκλεισμού (encapsulation efficiency) δραστικών ουσιών σε νανοσφαιρίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) με τη χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του υπολογισμού της διαλυτότητας/αναμειξιμότητας της ουσίας στο πολυμερές στη θερμοκρασία τήξης, εξετάζοντας φυσικά μείγματα δραστικής ουσίας: πολυμερούς σε αναλογίες από 0% έως 50% (wt).

Πιο αναλυτικά, δύο διαφορετικές ποιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος) διαφορετικών μοριακών βαρών (Δείγμα Α,  $\overline{M}_v = 41000$  g/mol, Δείγμα Β,  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή φυσικών μειγμάτων και νανοσωματιδίων. Οι δραστικές ουσίες που εγκλείστηκαν είναι το p-κουμαρικό οξύ και το p-μεθοξυκινναμικό οξύ, δύο παράγωγα του φαινολικού οξέος με αντιοξειδωτική δράση τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική πολικότητα λόγω της παρουσίας υδροξυλίου στο p-κουμαρικό οξύ και την αντικατάσταση αυτού από μία μεθυλομάδα στο p-μεθοξυκινναμικό οξύ. Οι εγκλεισμοί τόσο των «κενών» όσο και των φορτωμένων με ουσία νανοσφαιριδίων (20 % ποσοστό φόρτωσης, drug loading) έγιναν σύμφωνα με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Η θερμική ανάλυση μέσω DSC και TGA (θερμοβαρυμετρική ανάλυση) πραγματοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των πρώτων υλών, των νανοσωματιδίων και τον υπολογισμό της συμβατότητας και αναμειξιμότητας μεταξύ δραστικής ουσίας και πολυμερούς. Τα εγκλεισμένα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν

αναφορικά με το μέγεθός τους, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Τα DSC αποτελέσματα της υπολογισθείσας διαλυτότητας ουσίας: πολυμερούς συσχετίστηκαν με την απόδοση εγκλεισμού των νανοσωματιδίων. Διαπιστώθηκε συμφωνία μεταξύ των τιμών διαλυτότητας και του ποσοστού εγκλεισμού (άμεσος και έμμεσος υπολογισμός), υποδεικνύοντας ότι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης μπορεί να θεωρηθεί ένα γρήγορο και έγκυρο εργαλείο στα πρώτα στάδια σχεδιασμού μιας διεργασίας εγκλεισμού. Οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις ουσίας: πολυμερούς αποτυπώθηκαν κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων θερμικής ανάλυσης και επιβεβαιώθηκαν βάσει των πειραματικών τιμών απόδοσης εγκλεισμού. Αναλυτικότερα, η μεγαλύτερη διαλυτότητα/αναμειξιμότητα των δυο ουσιών παρατηρήθηκε στο πολυμερές μεγαλύτερου μοριακού βάρους  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol (για το p-κουμαρικό οξύ η μέγιστη αναμειξιμότητα 4.763 %, και για το p-μεθοξικιναμικό οξύ 10.966 %). Αντίστοιχο ήταν το αποτέλεσμα στα πειράματα εγκλεισμού με άμεση απόδοση εγκλεισμού για το p-κουμαρικό οξύ 13.71 % και έμμεση απόδοση εγκλεισμού 17.95 %. Για το p-μεθοξικιναμικό οξύ επιτεύχθηκε άμεση απόδοση εγκλεισμού 63.23 % και έμμεση 56.28 %.

## Abstract

Encapsulation of active ingredients in polymeric nanoparticles has tremendous potential, as it can enhance penetration for a better efficacy, help target specific cells thus resulting in better drug delivery, as well as protect unstable/sensitive compounds. Nanoencapsulation of active ingredients has been extensively studied in Medicine, Pharmaceutical and Cosmetics fields, where poly(lactic acid) (PLA) is a widely used polymer, as it is a biocompatible, biodegradable and bio-based material.

The aim of this thesis is to investigate the possibility to predict/assess the encapsulation efficiency of active compounds in PLA nanospheres using differential scanning calorimetry (DSC). This was attempted by determination of the solubility/max. miscibility of the substance at the polymer melting temperature, examining physical mixtures of the active substance with the polymer at contents from 0% to 50% (wt).

Specifically, two different grades of poly(lactic acid) with different molecular weight (Sample A,  $\overline{M}_v = 41000$  g/mol, Sample B,  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) were used for the preparation of physical mixtures and nanoparticles. The active substances, which were encapsulates, are p-coumaric acid and p-methoxycinnamic acid, two derivatives of phenolic acid with antioxidant activity. p-coumaric acid shows different polarity due to the presence of hydroxyl, instead of p-methoxycinnamic acid with a methyl group in its molecule.

The preparation of blank and loaded nanoparticles (20 % drug loading) were manufactured using the emulsification-solvent evaporation methodology. Thermal analysis by DSC and TGA (Thermogravimetric Analysis) was carried out for the characterization of the raw materials, of nanoparticles, and to assess the drug-polymer compatibility and miscibility. Size, polydispersity index and  $\zeta$ -potential determinations of encapsulated nanoparticles were performed by Dynamic Light Scattering (DLS).

The DSC results along with the nanoparticles properties were combined so as to correlate the calculated value of active compounds solubility in the different polymeric materials with the encapsulation efficiency of nanoparticles. There has been an agreement between the solubility

values and encapsulation efficiency (direct and indirect method), indicating that DSC can be considered a fast and valid tool in the early stages of the design of encapsulation processes. The physical and chemical interactions between drug and polymer reflected in the results from the thermal analysis and confirmed based on the experimental values of encapsulation efficiency. Specifically, the higher solubility/miscibility value of the two compounds was observed in the system of higher molecular weight  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol (for p-coumaric acid maximum miscibility 4.763 % and for p-methoxycinnamic acid maximum miscibility 10.966 %). The results from the encapsulation process followed the same order, with direct encapsulation efficiency for p-coumaric acid at 13.71 %, indirect encapsulation efficiency at 17.95 %, for p-methoxycinnamic acid much higher direct encapsulation efficiency 63.23 % and indirect encapsulation efficiency 56.28 % were achieved.

# Κεφάλαιο 1: Βιοπολυμερή: Η περίπτωση του πολυ(γαλακτικού οξέος)

## 1.1 Εισαγωγή

Η οικονομική και κοινωνική ανάπτυξη των τελευταίων δεκαετιών έχουν οδηγήσει σε σημαντική επιστημονική προσπάθεια για ανακάλυψη, ανάπτυξη και χρήση πολυμερών. Τα πετροχημικής προέλευσης πολυμερή που παραγόνται παγκοσμίως ανέρχονται σε εκατομμύρια τόνους, και ένα σημαντικό ποσοστό αυτών εισάγονται στο περιβάλλον ως απόβλητα, χωρίς την δυνατότητα μικροβιακής προσβολής άρα και αποικοδόμησης. Για τον λόγο αυτό ερευνώνται τρόποι αντικατάστασης των κοινών πλαστικών με νέα, βιοδιασπώμενα πλαστικά, είτε φυσικά, βιοπολυμερή ή συνθετικά πολυμερή, τα οποία αποτελούν μία αειφόρο λύση [1-3].

Οι αλειφατικοί πολυεστέρες και οι συμπολυεστέρες αυτών κατέχουν κυρίαρχη θέση ως βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά. Αυτό συμβαίνει λόγω της δυνατότητας υδρόλυσης του εστερικού δεσμού αυτών [3]. Οι βιοαποικοδομήσιμοι πολυεστέρες κατατάσσονται, με βάση τους δεσμούς που αναπτύσσονται στα μονομερή, σε δύο κατηγορίες: α) τα πολυ(υδροξυοξέα) με επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα μονομερούς της μορφής  $-O-R-CO-$ , χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πολυ(γαλακτικό οξύ) και β) τους πολυεστέρες οι οποίοι παράγονται μέσω της αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης διόλης ( $HO-R-OH$ ) και διοξέος ( $HOOC-R-COOH$ ), όπου χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS) [4].

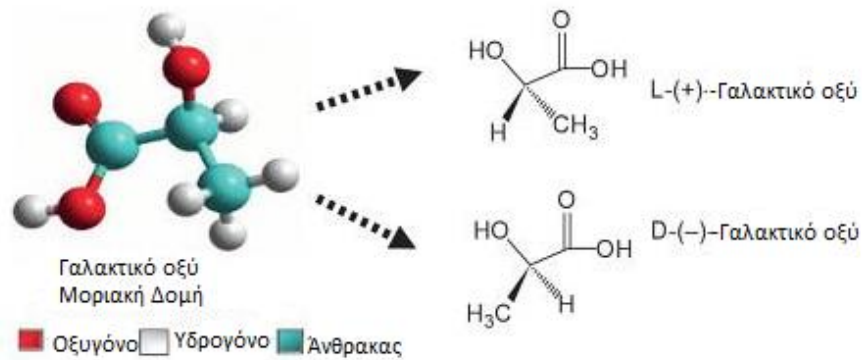
Το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) αποτελεί ένα από τα πρωτοπόρα πολυμερή της ανερχόμενης αγοράς βιοπλαστικών. Πρόκειται για έναν αλειφατικό, βιοδιασπώμενο πολυεστέρα με απλή διαδικασία παραγωγής, καθώς η πρώτη ύλη για την σύνθεσή του (γαλακτικό οξύ) είναι ευρέως διαθέσιμη, και μπορεί να προέρχεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Είναι ένα θερμοπλαστικό υλικό με ακαμψία και διαύγεια παρόμοια με του πολυστυρενίου (PS) και του πολυ(αιθυλεστέρα) (PET) και συμπεριφέρεται παρόμοια με το πολυπροπυλένιο (PP). Μπορεί να θεωρηθεί ως το πολυμερές με το μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών καθώς τα προϊόντα αποικοδόμησής του, κυρίως νερό και διοξείδιο του άνθρακα, δεν είναι ούτε τοξικά ούτε καρκινογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται από κοινά

μπουκάλια, είδη ένδυσης, έως υψηλής θερμικής αντοχής σκεύη, συσκευασίες και ιατρικά εμφυτεύματα [1,2,3,5].

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) αποτελεί το αντικείμενο ερευνών για πάνω από έναν αιώνα. Το 1845 ο Peliouze συμπύκνωσε γαλακτικό οξύ με απόσταξη νερού και κατάφερε να συνθέσει ολιγομερή PLA και κυκλικά διμερή γαλακτικού οξέος. Περίπου 50 χρόνια αργότερα, έγινε απόπειρα από τους Bischoff και Walden να παράξουν PLA από γαλακτικό οξύ χωρίς όμως επιτυχία. Ωστόσο, το 1932 μία ομάδα ερευνητών (Carothers et. al) παρήγαγε για πρώτη φορά χαμηλού μοριακού βάρους πολυ(γαλακτικό οξύ) από γαλακτικό οξύ. Η βιομηχανική παραγωγή και διαθεσή του στην αγορά δεν άργησαν να έρθουν. Το 1954 η DuPont de Nemours και η Ethicon Inc. άρχισαν να προωθούν το πολυ(γαλακτικό οξύ) σε ιατρικές εφαρμογές, όπως ράμματα, εμφυτεύματα και συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων. Η πρώτη μαζική παραγωγή πολυ(γαλακτικού οξέος) από άμυλο έγινε το 2002 από την Cargill Dow LLC στις Η.Π.Α., με δυναμικότητα παραγωγής 140000 τόνων ανά έτος [2,6]. Σήμερα η NatureWorks LLC είναι ο ηγέτης στην αναπτυσσόμενη αγορά του πολυ(γαλακτικού οξέος), κατέχοντας περίπου το 95% της παραγωγής, και δραστηριοποιείται στη σύνθεση δύο διαφορετικών τύπων PLA: ρητίνες για ευρείας χρήσεως πλαστικά ή συσκευασία και ίνες που χρησιμοποιούνται σε εξειδικευμένα κλωστοϋφαντουργικά και άλλα προϊόντα [7,8].

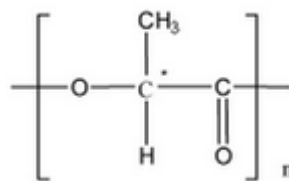
## 1.2 Επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα πολυ(γαλακτικού οξέος)

Το γαλακτικό οξύ ή αλλιώς 2-υδροξυπροπανικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{COOH}$ ), είναι το πιο διαδεδομένο υδροξυοξύ στην φύση, έχοντας κυρίαρχη θέση σε εφαρμογές τροφίμων, φαρμάκων, κλωστοϋφαντουργίας και χημικών βιομηχανιών. Πρόκειται για μία χειρόμορφη ένωση, βρίσκεται δηλαδή σε δύο οπτικά ισομερείς αντίποδες (εναντιομερή) που διακρίνονται με τα προθέματα L-/D- ή S-/R- ή +/-, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1. Το L-γαλακτικό οξύ είναι φυσικό και βιολογικό ισομερές, ενώ το D-γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω μικροοργανισμών ή μέσω ρακεμικοποίησης. Το γαλακτικό οξύ βρίσκεται κυρίως στα προϊόντα ζύμωσης του γάλατος, όπως το γιαούρτι και το κεφίρ. Το γαλακτικό οξύ παράγεται εμπορικά από βακτηριακή διαδικασία ζύμωσης με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων όπως καλαμπόκι, πατάτα, τεύτλα, ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο, γαλακτοκομικά και αγροτικά απόβλητα [3,9].

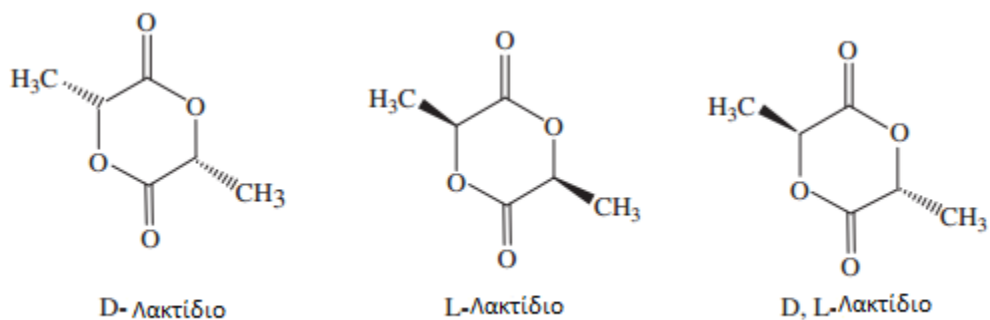


**Σχήμα 1:** Στερεοϊσομερή γαλακτικού οξέος [7]

Το πολυ(γαλακτικό οξύ), του οποίου η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα απεικονίζεται στο Σχήμα 2, παράγεται από το γαλακτικό οξύ ή το λακτίδιο. Το λακτίδιο αποτελεί ένα κυκλικό διμερές του γαλακτικού οξέος, το οποίο συναντάται σε τρεις στερεοϊσομερείς δομές, το L-, D- και μεσο- λακτίδιο, όπως απεικονίζονται στο Σχήμα 3.



**Σχήμα 2:** Επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα πολυ(γαλακτικού οξέος)



**Σχήμα 3:** Στερεοϊσομερείς μορφές λακτιδίου [9]

### 1.3 Φυσικές και χημικές ιδιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος)

#### 1.3.1 Γαλακτικό οξύ και λακτίδιο

Το γαλακτικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των α-υδροξυοξέων, καθώς το υδροξύλιο και το καρβοξύλιο είναι ενωμένα με τον ίδιο άνθρακα. Είναι ένα λευκό, άοσμο, μη πτητικό, κρυσταλλικό στερεό το οποίο διαλύεται στο νερό, την αλκοόλη, τη γλυκερόλη και την φουρφουρόλη. Αδιάλυτο παραμένει στο χλωροφόρμιο και τον πετρελαϊκό αιθέρα. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά υγροσκοπικό στερεό και δύναται να απορροφήσει υγρασία από το περιβάλλον. Μερικές κύριες ιδιότητες του γαλακτικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 [2,6].

Πίνακας 1. Φυσικές και χημικές ιδιότητες γαλακτικού οξέος

Ιδιότητα	Τιμή	Ισομερές
Μοριακό βάρος (g/mol)	90.08	L, D
Θερμοκρασία τήξης (°C)	53.2	L
	53	D
Θερμοκρασία βρασμού (°C)	>200	L, D
pK <sub>a</sub> (25 °C)	3.79	L
	3.83	D
Οπτική περιστροφή (°)	+2.5	L
	-2.5	D

Το λακτίδιο, το κυκλικό διμερές του γαλακτικού οξέος, είναι διαλυτό στο τολουόλιο, το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο, τη μεθανόλη, την ακετόνη, το τετραϋδροφουράνιο. Παρουσία νερού το λακτίδιο υδρολύεται προς γαλακτικό οξύ σε θερμοκρασία δωματίου. Ορισμένες ιδιότητές του παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [2].

Πίνακας 2. Φυσικές και χημικές ιδιότητες λακτιδίου [2]

Ιδιότητα	Τιμή	Ισομερές
Μοριακό βάρος (g/mol)	144.3	L, D, μεσο
Θερμοκρασία τήξης (°C)	97	L, D
	125-127	μεσο
Θερμοκρασία βρασμού (°C)	255	L
Οπτική περιστροφή (°)	-260	L
	+260	D



### 1.3.2 Θερμικές Ιδιότητες

Οι φυσικές ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος) εξαρτώνται από την δομή, τα μοριακά χαρακτηριστικά του, το μοριακό βάρος, τις συνθήκες πολυμερισμού και την θερμική ιστορία του.

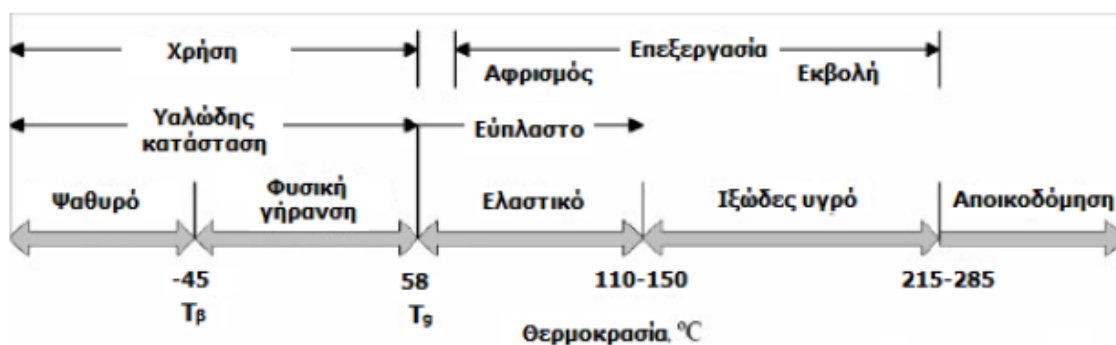
Μεταξύ των διαφόρων λακτιδίων (Σχήμα 3), τα οπτικά καθαρά πολυλακτίδια, το πολυ(L-λακτίδιο) (PLLA) και το πολυ(D-λακτίδιο) (PDLA) είναι κρυσταλλικά πολυμερή με σημείο τήξης γύρω στους 180°C. Το ατακτικό πολυμερές, το πολυ(DL-λακτίδιο) (PDLLA) είναι άμορφο με θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μεταξύ 50°C και 57°C. Λόγω της άμορφης φύσης του, το πολυμερές εμφανίζει ταχύτερο ρυθμό αποικοδόμησης από ότι οι στερεοκανονικοί ομόλογοί του, και προτιμάται για την ανάπτυξη συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων καθώς και για τη δημιουργία χαμηλής αντοχής ικριωμάτων για την αναγέννηση των ιστών. Αντίθετα, το κρυσταλλικό PLLA χρησιμοποιείται σε εφαρμογές όπου απαιτούνται μηχανικές και θερμομηχανικές αντοχές. Είναι γνωστό πως οι ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος) ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την αναλογία και την κατανομή των δύο ισομερών στο τελικό πολυμερές και το μοριακό βάρος του πολυμερούς [2,4,9]. Η επίδραση της στερεοχημικής καθαρότητας στις φυσικές ιδιότητες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Επίδραση ισομερούς στις θερμικές ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος) [9]

Ισομερές	$M_n \cdot 10^3$	$M_w/M_n$	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)
L	4.7	1.09	45.6	157.8	55	98.3	47.8
DL	4.3	1.9	44.7	-	-	-	-
L	7	1.09	67.9	159.9	58.8	108.3	48.3
DL	7.3	1.16	44.1	-	-	-	-
D	13.8	1.19	65.7	170.3	67	107.6	52.4
L	14	1.12	66.8	173.3	61	110.3	48.1
D	16.5	1.2	69.1	173.5	64.6	109	51.6
L	16.8	1.32	58.6	173.4	61.4	105	38.1

Στην περίπτωση του άμορφου PLA, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ) είναι μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους, καθώς σηματοδοτεί δραματικές αλλαγές στην κινητικότητα των αλύσων του πολυμερούς. Μία αντιπροσωπευτική περίπτωση υψηλού μοριακού βάρους

άμορφου PLA παρουσιάζεται στο Σχήμα 4. Κάτω από τη θερμοκρασία β-χαλάρωσης ( $T_{\beta}$ ) το PLA είναι ψαθυρό, ενώ σε θερμοκρασίες μεταξύ των  $T_{\beta}$  και  $T_g$  υφίσταται φυσική γήρανση και μπορεί να παρουσιάζει ψαθυρή θραύση. Μεταξύ 110-150°C το PLA από ελαστικό γίνεται ιξώδες και η μετάβαση αυτή εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος και τις αναπτυσσόμενες διατμητικές τάσεις. Τέλος, το άμορφο PLA αποσυντίθεται μεταξύ 215°C και 285°C. Πρέπει να τονιστεί ότι οι εμπορικές εφαρμογές του άμορφου PLA καθορίζονται από τις ιδιότητές του, οι οποίες εξαρτώνται εν μέρει από το πόσο χαμηλότερα της  $T_g$  χρησιμοποιείται ή αποθηκεύεται ένα αντικείμενο [2,10,11].



**Σχήμα 4:** Μετασταθείς καταστάσεις υψηλού μοριακού βάρους άμορφου PLA [10]

Στην περίπτωση του ημικρυσταλλικού PLA, τόσο η  $T_g$  και η  $T_m$  είναι σημαντικές φυσικές παράμετροι για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του. Η θερμοκρασία τήξης είναι συνάρτηση των συνθηκών επεξεργασίας και της στερεοχημείας του πολυμερούς, ενώ η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης καθορίζεται από την αναλογία των διαφορετικών λακτιδίων. Η θερμική συμπεριφορά ενός δείγματος υψηλού μοριακού βάρους ημικρυσταλλικού PLA φαίνεται στο Σχήμα 5. Η  $T_m$  εξαρτάται από την παρουσία του μεσο-λακτιδίου στη δομή, η οποία προκαλεί πτώση της  $T_m$ , όπως περιγράφεται από την ακόλουθη Εξίσωση:

$$T_m = 175^{\circ}\text{C} - 300W_m$$

όπου

$W_m$ : το κλάσμα του μεσο-λακτιδίου

175 °C: η θερμοκρασία τήξης του καθαρού PLLA

Γενικά, η  $T_m$  κυμαίνεται από 130°C έως 180°C. Οι 180°C αποτελούν το μέγιστο πρακτικά σημείο τήξεως στην περίπτωση καθαρού PLLA, ενώ μία μείωση της θερμοκρασίας τήξης μεταξύ 20°C και 50°C μπορεί να ληφθεί με την προσθήκη D-λακτιδίου στη δομή του πολυμερούς.

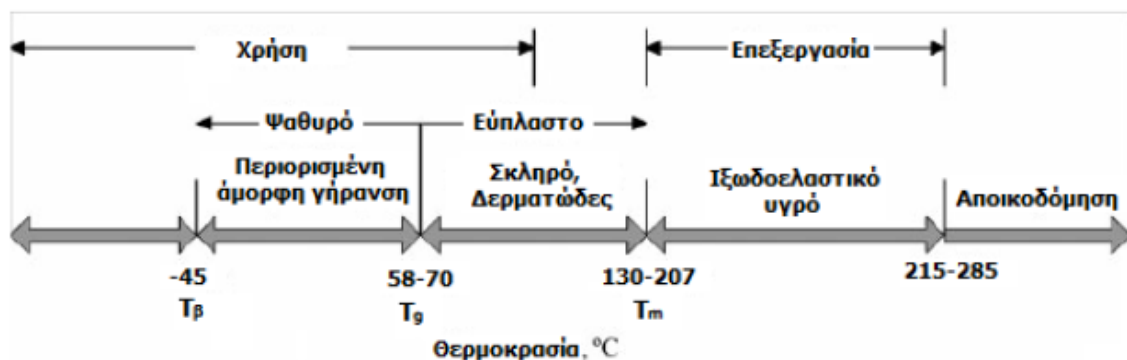
Για το ημικρυσταλλικό PLA η  $T_g$  δείχνει την μετάβαση από την ψαθυρή στην όγκιμη θραύση, καθορίζεται από την αναλογία των διαφορετικών λακτιδίων και κυμαίνεται μεταξύ 50°C και 80°C. Γενικά, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του PLA περιγράφεται από την ακόλουθη Εξίσωση των Flory-Fox:

$$T_g = T_g^\infty - K/\overline{M_w}$$

όπου

$T_g^\infty$ : η  $T_g$  για το άπειρο (η τιμή της έχει προσδιοριστεί πειραματικά για το PLLA στους 58°C και για το PDLLA στους 57°C)

$K$ : μία σταθερά που αντιπροσωπεύει την περίσσεια ελεύθερου όγκου των ακραίων ομάδων των αλυσίδων του πολυμερούς (η τιμή της έχει προσδιοριστεί πειραματικά για το PLLA στις 55,000 και για το PDLLA στις 73,000) [2].



**Σχήμα 5:** Μετασταθείς καταστάσεις υψηλού μοριακού βάρους ημικρυσταλλικού PLA [10]

### 1.3.3 Μηχανικές ιδιότητες

Οι μηχανικές ιδιότητες πολυμερών με παρόμοια μοριακά βάρη, τα οποία έχουν παρασκευαστεί με διαφορετικές μεθόδους πολυμερισμού, δε διαφέρουν πολύ. Αυτό έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του πολυ(γαλακτικού οξέος). Οι παράμετροι που επηρεάζουν έντονα τις μηχανικές ιδιότητες είναι το μοριακό βάρος και ο βαθμός κρυσταλλικότητας [12].

Ένα ημικρυσταλλικό πολυ(γαλακτικό οξύ) παρουσιάζει τις εξής ιδιότητες: αντοχή σε εφελκυσμό από 50 MPa έως 70 MPa, μέτρο ελαστικότητας από 3000 MPa έως 4000 MPa, επιμήκυνση κατά την θραύση 2-10% και αντοχή σε κάμψη έως 100 MPa. Στους Πίνακες 4 και 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετρήσεων μηχανικών ιδιοτήτων σε δείγματα πολυ(γαλακτικού οξέος) που λαμβάνονται από μία τυπική διεργασία έγχυσης. Τα δείγματα είναι σχεδόν άμορφα, λόγω της αργής κρυστάλλωσης που πραγματοποιείται.

**Πίνακας 4.** Μηχανικές ιδιότητες PLLA διαφορετικών μοριακών βαρών [2,11]

Υλικό	PLLA I		PLLA II		PLLA III	
Ανόπτηση στους 105°C	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
Μοριακό βάρος (Da)	23000	20000	58000	47000	670000	71000
T <sub>m</sub> (°C)	178	178	179	180	181	178
Κρυσταλλικότητα (%)	9	70	9	52	3	45
Χαρακτηριστικά εφελκυσμού						
Αντοχή σε εφελκυσμό στη Θραύση (MPa)	59	47	58	59	59	66
Παραμόρφωση στη Θραύση (%)	1.5	1.3	5.0	3.5	7.0	4.0
Μέτρο Ελαστικότητας (MPa)	3350	41000	3750	4050	3750	4150
Χαρακτηριστικά κάμψης						
Αντοχή σε κάμψη (MPa)	64	51	100	113	106	119
Μέγιστη παραμόρφωση (%)	2.0	1.6	4.1	4.8	4.7	4.6
Μέτρο Ελαστικότητας (MPa)	3600	4200	3600	4150	3650	4150
Αντοχή σε κρούση (kJ/m <sup>2</sup> )						
Izod, χαραγμένο δείγμα	1.9	3.2	2.5	7.0	2.6	6.6
Izod, μη χαραγμένο δείγμα	13.5	18.0	18.5	34.0	19.5	35.0
Σκληρότητα Rockwell (κλίμακα H)	85	84	83	84	88	88

Από την ανάλυση των μηχανικών ιδιοτήτων είναι προφανές ότι στην επιλεγμένη περιοχή μοριακών βαρών, οι εφελκυστικές και οι καμπτικές ιδιότητες ανάμεσα στο PLLA και το PDLLA είναι εντελώς διαφορετικές. Η αντοχή σε εφελκυσμό για τα δείγματα PLLA τυπικά κυμαίνεται από 50 MPa έως 70 MPa, ενώ για τα δείγματα PDLLA από 40 MPa έως 53 MPa. Αυτή η διαφοροποίηση στη συμπεριφορά οφείλεται κυρίως στην στερεοκανονικότητα των αλυσίδων του PLLA.

Η επίδραση του μοριακού βάρους στις καμπτικές και εφελκυστικές ιδιότητες είναι περισσότερο εμφανής στα δείγματα PLLA από ανόπτηση, με αύξηση της αντοχής σε εφελκυσμό από 47 MPa έως 66 MPa στο εύρος μοριακού βάρους 20000-70000 g/mol. Πάνω από την τιμή μοριακού βάρους  $M_v = 30000-40000$  g/mol, οι ιδιότητες του άμορφου PLLA αυξάνονται σταδιακά, ενώ για το PLLA από ανόπτηση η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται για μεγαλύτερη τιμή μοριακού βάρους, κοντά στην τιμή 50000-60000 g/mol. Στην περίπτωση του PDLLA αυτή η αύξηση των ιδιοτήτων σε σχέση με το μοριακό βάρος είναι λιγότερο έντονη, όταν το μοριακό βάρος είναι υψηλότερο από 45000-50000 g/mol [2,11,13].

Η εξάρτηση των μηχανικών ιδιοτήτων του πολυ(γαλακτικού οξέος) με το μοριακό βάρος έχει ερευνηθεί από πολλούς συγγραφείς. Σύμφωνα με τους Engelberg και Kohn, η αύξηση του μοριακού βάρους από 107000 g/mol έως 550000 g/mol έχει ως αποτέλεσμα 20% αύξηση στην αντοχή σε εφελκυσμό [13].

Η σκληρότητα κατά Rockwell του πολυ(γαλακτικού οξέος) κυμαίνεται μεταξύ 70 και 90 στην κλίμακα H, και επηρεάζεται πολύ λίγο από την κρυσταλλικότητα του πολυμερούς καθώς για άμορφο PLLA κυμαίνεται από 83 H έως 88 και για ημικρυσταλλικό PLLA από 82 H έως 88 H. Η εξάρτηση της σκληρότητας με το μοριακό βάρος φαίνεται να είναι αρκετά μικρή από τα στοιχεία των πινάκων 4 και 5. Ωστόσο, η επίδραση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης είναι πιο εμφανής, καθώς το PDLLA έχει μικρότερες τιμές τιμές σκληρότητας από αυτές του PLLA [2,11].

**Πίνακας 5.** Μηχανικές ιδιότητες PDLLA διαφορετικών μοριακών βαρών [2,11]

<b>Υλικό</b>	<b>PDLLA I</b>	<b>PDLLA II</b>	<b>PDLLA III</b>
Μοριακό βάρος (Da)	47500	75000	114000
Χαρακτηριστικά εφελκυσμού			
Αντοχή σε εφελκυσμό στη Θραύση (MPa)	40	44	44
Παραμόρφωση στη Θραύση (%)	7.5	4.8	5.4
Μέτρο Ελαστικότητας (MPa)	3650	4050	3900
Χαρακτηριστικά κάμψης			
Αντοχή σε κάμψη (MPa)	84	86	88
Μέγιστη παραμόρφωση (%)	4.8	4.1	4.2
Μέτρο Ελαστικότητας (MPa)	3500	3550	3600
Αντοχή σε κρούση (kJ/m <sup>2</sup> )			
Izod, χαραγμένο δείγμα	1.8	1.7	1.8
Izod, μη χαραγμένο δείγμα	13.5	14.0	15.0
Σκληρότητα Rockwell (κλίμακα H)	78	72	76

Η αντοχή σε εφελκυσμό, το μέτρο ελαστικότητας καθώς και άλλες μηχανικές ιδιότητες για φιλμ PLLA (98 %), PLLA (94 %), PS και PET παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Οι τιμές της αντοχής σε εφελκυσμό των συμπολυμερών PLA, όπως προκύπτει από τον εν λόγω Πίνακα, είναι εντός του εύρους τιμών που προκύπτουν βιβλιογραφικά για το πολυστυρένιο, PS, υπό τις ίδιες συνθήκες δοκιμής, αλλά σημαντικά χαμηλότερες από αυτές του PET [14].

**Πίνακας 6.** Μηχανικές ιδιότητες φιλμ PLLA (98 %), PLLA (94 %), PS και PET [14]

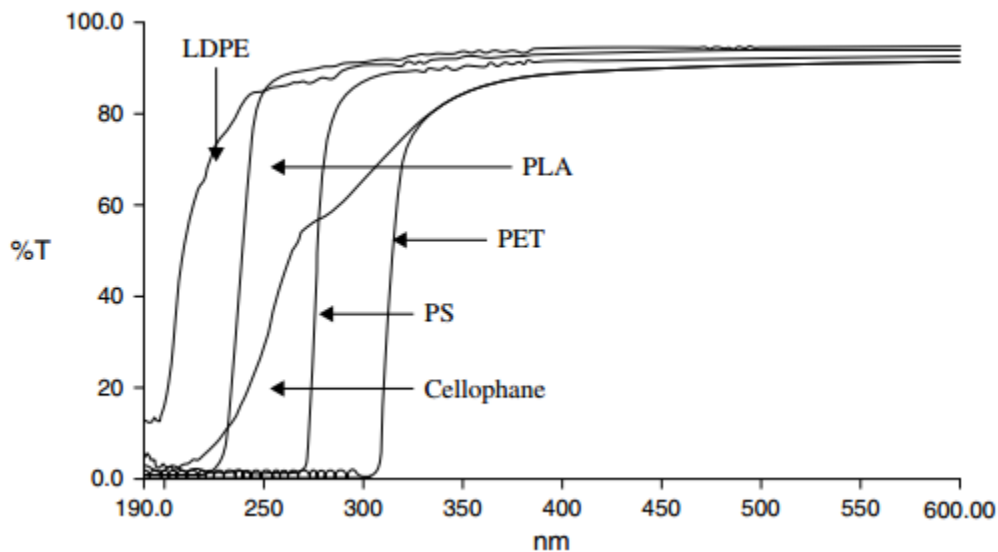
<b>Ιδιότητα</b>	<b>PLLA (98%)</b>	<b>PLLA (94%)</b>	<b>PS</b>	<b>PET</b>
Αντοχή σε εφελκυσμό στο όριο διαρροής (MPa)	65-72	74-84	55-82	275
Επιμήκυνση στο όριο διαρροής (%)	4-5	3-4	-	6
Επικήμυνση κατά τη θραύση (%)	5-11	78-97	3-40	60-165
Μέτρο Ελαστικότητας (GPa)	2.11-2.54	2.31-2.87	3.2	2.8-4.1

#### 1.3.4 Οπτικές ιδιότητες

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) όπως αναφέρεται σε επόμενο υποκεφάλαιο χρησιμοποιείται στην συσκευασία τροφίμων. Για να διατηρηθεί επαρκώς η ποιότητα των τροφίμων, τα υλικά συσκευασίας πρέπει να αποτελούν εμπόδιο για το φως, την υγρασία, τα ατμοσφαιρικά αέρια

και τις πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs). Η απορρόφηση και η μετάδοση του φωτός από τα πολυμερή είναι ιδιαίτερα σημαντικές παράμετροι για την βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων.

Οι οπτικές ιδιότητες φιλμ πολυ(γαλακτικού οξέος) σε σύγκριση με τα εμπορικά διαθέσιμα φιλμ πολυστυρενίου, πολυ(τερεφθαλικού αιθυλενίου), χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου LDPE, και σελοφάν στην περιοχή της ορατής και της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), 190-800 nm, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1. Είναι εμφανές ότι η ακτινοβολία UV-C δε διαπερνά το φιλμ PLA, κάτι που δεν ισχύει και για τις ακτινοβολίες UV-A και UV-B. Ως εκ τούτου, για τη χρήση PLA σε ορισμένες εφαρμογές, όπως είναι η συσκευασία γαλακτοκομικών προϊόντων, απαιτείται η χρήση προσθέτων αποκλεισμού της υπεριώδους ακτινοβολίας [2].



**Διάγραμμα 1:** Επί τοις εκατό διαπερατότητα προς το μήκος κύματος για τα φιλμ PLA (98% L-λακτίδιο), PS, LDPE, PET και σελοφάν [2]

### 1.3.5 Ιδιότητες φράγματος

Εξαιρετικά σημαντικές είναι και οι ιδιότητες φράγματος του PLA στους υδρατμούς και σε αέρια, όπως το οξυγόνο, το άζωτο, το διοξείδιο του άνθρακα και το μεθάνιο. Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί γίνεται σύγκριση των ιδιοτήτων φράγματος του PLA με άλλα ευρείας χρήσεως πολυμερή. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι ιδιότητες φράγματος του PLA είναι εξαιρετικά καλές και το καθιστούν κατάλληλο για εφαρμογές που σχετίζονται με τη συσκευασία τροφίμων [15].

**Πίνακας 7.** Ιδιότητες φραγμού PLA σε σχέση με άλλα ευρείας χρήσεως πλαστικά [15]

	Διαπερατότητα $\times 10^{-13}$ ( $\text{cm}^3(\text{STP})\cdot\text{cm}/\text{cm}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$ ) <sup>a</sup>				Διαπερατότητα σε υδρατμούς $\times 10^{-13}$ ( $\text{kg}\cdot\text{m}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$ ) <sup>b</sup>
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	
PLLA (96%)	2.48	7.65	0.97	0.75	80-360
PET	0.03	0.15	0.006	0.003	110
PS	1.95	7.88	2.65	1.73	670
LDPE	5.18	21	1.42	3	670

<sup>a</sup> Οι μετρήσεις έχουν γίνει στους 23°C

<sup>b</sup> Οι μετρήσεις έχουν γίνει στους 30°C

## 1.4 Διεργασίες πολυμερισμού πολυ(γαλακτικού οξέος)

### 1.4.1 Σύνθεση μονομερών πολυ(γαλακτικού οξέος)

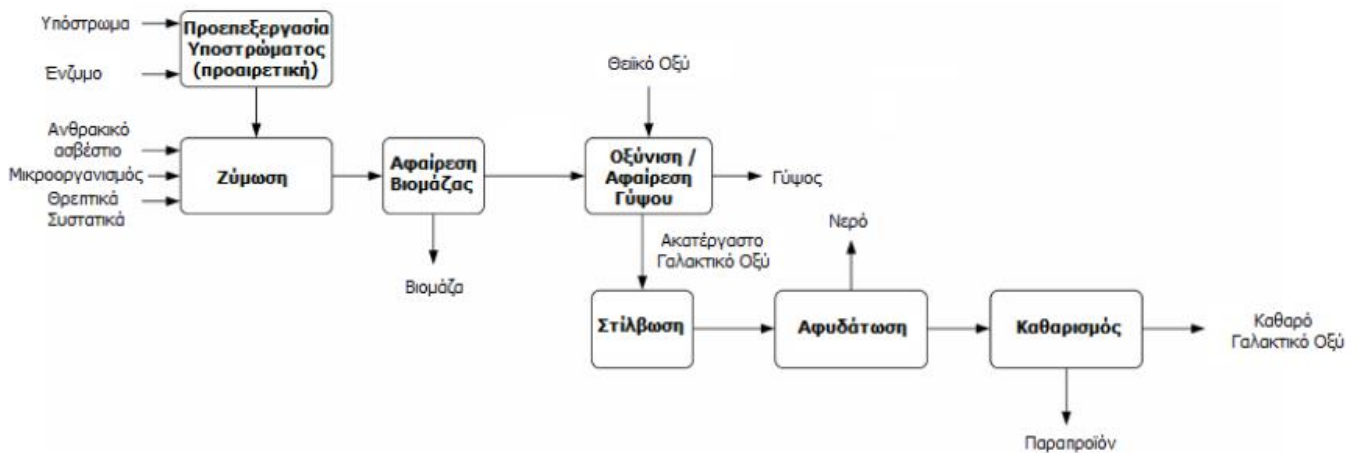
Το γαλακτικό οξύ προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές όπως η μελάσα, το άμυλο (από καλαμπόκι, σιτάρι, πατάτα) και το ζαχαροκάλαμο. Μπορεί επίσης να πρέχεται από τον άνθρακα (ασετιλίνη) ή το πετρέλαιο (αιθυλένιο). Το γαλακτικό οξύ δεν μπορεί να πολυμερισθεί απευθείας προς ένα χρήσιμο προϊόν, καθώς σε κάθε πολυμερική αντίδραση παράγεται ένα μόριο νερού, η παρουσία του οποίου διασπά τη σχηματιζόμενη πολυμερική αλυσίδα σε μικρότερα τμήματα χαμηλότερου μοριακού βάρους. Για το λόγο αυτό, έχουν σχεδιαστεί δύο τρόποι σύνθεσης πολυ(γαλακτικού οξέος), ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ring opening polymerization- ROP) και ο πολυμερισμός άμεσης συμπύκνωσης (direct polycondensation polymerization- DPP) [1,9].

#### A. Παραγωγή γαλακτικού οξέος με ζύμωση

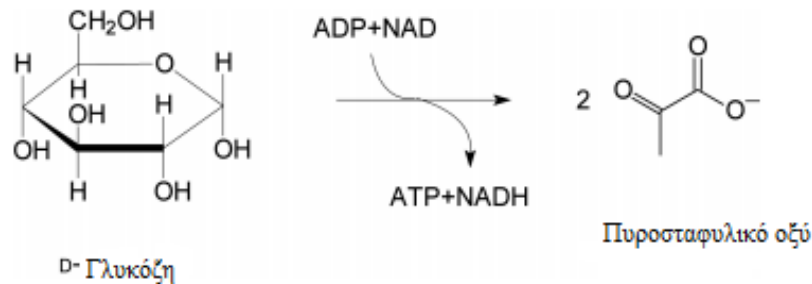
Το γαλακτικό οξύ, που είναι διαθέσιμο στην παγκόσμια αγορά σχεδόν στο σύνολό του, έχει παραχθεί από αντιδράσεις ζύμωσης. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης ένας υδρογονάνθρακας μετατρέπεται από μικροοργανισμούς σε γαλακτικό οξύ. Με την ανακάλυψη του γαλακτικού οξέος από τον Scheele, έγινε και ο σχεδιασμός της μεθόδου ανάκτησης και καθαρισμού του, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6. Αν και κάποιοι από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται, όπως η μούχλα *Rhizopus*, χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους, εντούτοις, η πραγματική μετατροπή των σακχάρων σε γαλακτικό οξύ γίνεται απουσία οξυγόνου. Καθώς η πλήρης οξείδωση ενός σακχάρου προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό είναι ενεργειακά ευνοϊκότερη,



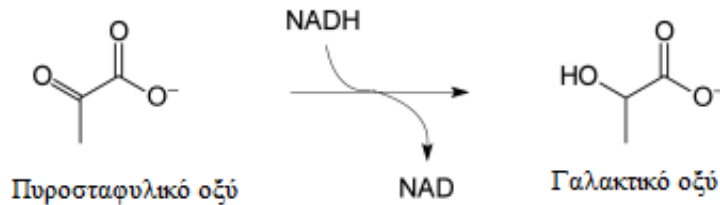
το γαλακτικό οξύ παράγεται σε αναερόβιες συνθήκες. Μόλις εισέλθει στο κύτταρο του μικροοργανισμού το σάκχαρο μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω διαφόρων σταδίων ενζυμικών αντιδράσεων. Αυτή η χημική μετατροπή προσφέρει ενέργεια περισσότερο σε μορφή ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και λιγότερο σε ισοδύναμα NADH (Σχήμα 7,8). Το γαλακτικό οξύ παράγεται κυρίως για να διατηρεί την αειφορία των κυτταρικών διεργασιών. Η χημική ενέργεια που συγκεντρώνεται (ATP) χρησιμοποιείται σε διάφορες διεργασίες μέσα στο κύτταρο, όπως για την ανάπτυξή του, τη συντήρησή του, την κινητικότητά του. Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα στα λεγόμενα homofermentative lactic acid bacteria (LAB). Τα βακτήρια αυτά δίνουν σχεδόν εξ' ολοκλήρου γαλακτικό οξύ σαν προϊόν ζύμωσης [2,16].



**Σχήμα 6:** Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα διεργασίας παραγωγής γαλακτικού οξέος μέσω ζύμωσης [2]



**Σχήμα 7:** Μετατροπή γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ με παραγωγή ATP [2]



**Σχήμα 8:** Παραγωγή γαλακτικού οξέος από πυροσταφυλικό οξύ [2]

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή γαλακτικού οξέος πρέπει να συνδυάζουν μία σειρά χαρακτηριστικών για να είναι βιομηχανικά ελκυστικοί:

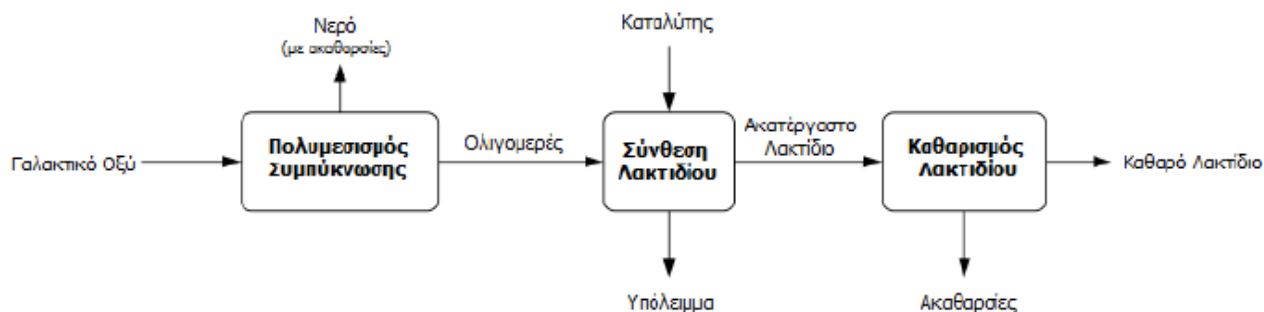
- Υψηλή παραγωγικότητα για να μειώνεται ο χρόνος ζύμωσης
- Υψηλή μετατροπή για να μειώνεται το κόστος του αρχικού υδρογονάνθρακα
- Δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν φθηνά θρεπτικά συστατικά για να μειωθεί το κόστος συντήρησης
- Χαμηλή ποσότητα παραπροϊόντων για να αυξηθεί το επίπεδο καθαρότητας
- Υψηλή συγκέντρωση στο τελικό προϊόν για να μειωθεί το κόστος από διεργασίες εξάτμισης
- Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι ανθεκτικοί όσο αφορά στις μολύνσεις και στις λοιμώξεις.

Κάθε μικροοργανισμός έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του, ωστόσο το βακτήριο *Lactobacillus* είναι το πιο διαδεδομένο [2,16].

#### B. Παραγωγή λακτιδίων

Η σύνθεση του λακτιδίου περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Pelouze το 1845. Αυτός ερεύνησε την εστεροποίηση του γαλακτικού οξέος με θέρμανση και απομάκρυνση νερού και έλαβε έτσι προπολυμερές που δεν ήταν πλέον πλήρως αναμείξιμο με το νερό. Στη συνέχεια, με συνεχή θέρμανση του προπολυμερούς παρατήρησε ότι σε ένα από τα κλάσματα της απόσταξης σχηματίζονταν κρύσταλλοι. Τότε συνήγαγε τον χημικό τύπο της ουσίας και της έδωσε το όνομα “lactic” (λακτίδιο). Μία βελτιωμένη τεχνική περιγράφηκε σε ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τους Gruter και Pohl το 1914. Το γαλακτικό οξύ εστεροποιήθηκε στους 120-135 °C ενώ αέρας

χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο για την απομάκρυνση του νερού. Κατόπιν, οξείδια του ψευδαργύρου προστέθηκαν ως καταλύτης και το λακτίδιο απομακρύνθηκε μέσω απόσταξης υπό κενό στους 200 °C. Πρακτικά η σύγχρονη βιομηχανία δεν μπορεί να καταργήσει τη θερμική κατάλυση αποπολυμερισμού που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή λακτιδίων. Ένα σημαντικό βήμα ωστόσο, σε σχέση με τη μέθοδο των Gruter και Rohl, είναι η χρήση καταλύτη με βάση τον κασσίτερο για το συντονισμό των αντιδράσεων πολυμερισμού. Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή λακτιδίων φαίνεται στο Σχήμα 9.



**Σχήμα 9:** Σύνθεση λακτιδίου από γαλακτικό οξύ [2]

Ένας αντιδραστήρας σύνθεσης λακτιδίου παράγει πάντα ένα ρεύμα που περιέχει ακατέργαστο λακτίδιο, γαλακτικό οξύ, ολιγομερή γαλακτικού οξέος, νερό, μεσο-λακτίδιο και περαιτέρω προσμίξεις. Οι προδιαγραφές του λακτιδίου είναι αυστηρές κυρίως όσον αφορά την ελεύθερη οξύτητα, το νερό και την οπτική καθαρότητα. Όσο υψηλότερη η οπτική καθαρότητα του λακτιδίου, τόσο υψηλότερη είναι και αυτή του PLA, γεγονός που επηρεάζει τις φυσικές και χημικές ιδιότητές του πολυ(γαλακτικού οξέος).

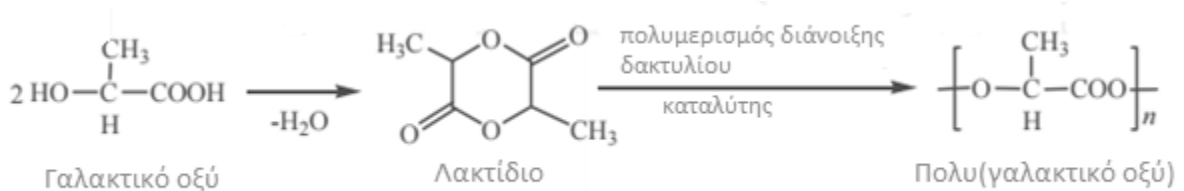
Δύο είναι οι κύριες μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του λακτιδίου επί του παρόντος: η απόσταξη και η κρυστάλλωση. Η επιλογή ανάμεσα στην απόσταξη, την κρυστάλλωση, ή κάποια νέα μέθοδο διαχωρισμού, όπως η απορρόφηση ή ο διαχωρισμός μέσω μεμβρανών, καθορίζεται από την επιθυμητή οπτική καθαρότητα του προϊόντος. Η κρυστάλλωση αποδίδει υψηλής καθαρότητας λακτίδιο, κατάλληλο για τη σύνθεση υψηλού σημείου τήξης ομοπολυμερούς PLLA με υψηλό μοριακό βάρος. Αντίθετα, ο οικονομικά προσιτός εξοπλισμός απόσταξης δεν απομακρύνει πλήρως όλα τα μεσο-λακτίδια και, κατά

συνέπεια, το μείγμα μονομερών λακτιδίου είναι κατάλληλο για τη σύνθεση συμπολυμερών PLA με διαφορετικές ιδιότητες [2].

#### 1.4.2 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP)

Στον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (Σχήμα 10), το γαλακτικό οξύ πολυμερίζεται παρουσία καταλύτη ενώ εφαρμόζεται πίεση. Η γενική εφαρμογή της διεργασίας του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου για τα πολυλακτίδια περιλαμβάνει τρία ξεχωριστά στάδια:

- Πολυσυμπύκνωση
- Επεξεργασία λακτιδίων
- Πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου.



**Σχήμα 10:** Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου προς παρασκευή πολυ(γαλακτικού οξέος) [1]

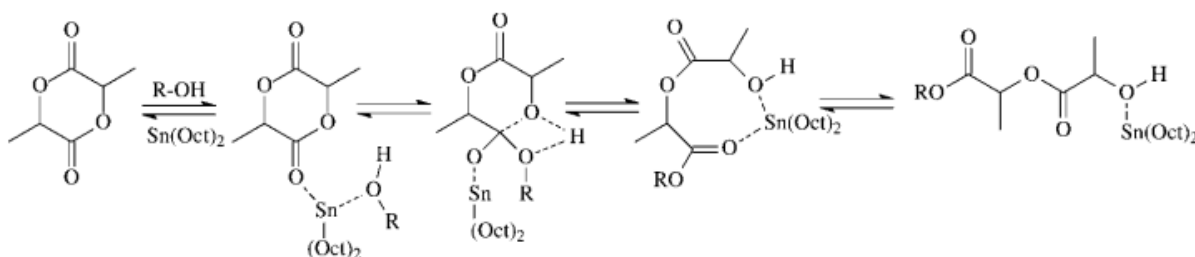
Οι τρεις διαφορετικές διεργασίες έρχονται αντιμέτωπες με πληθώρα κρίσιμων σταδίων. Κάποια προβλήματα παρουσιάζονται σε όλα τα βήματα της επεξεργασίας του γαλακτικού οξέος, καθώς προκύπτουν από μία ορισμένη φυσικοχημική ιδιότητά του, ενώ κάποια άλλα προέρχονται από τις συνθήκες των διεργασιών. Ακολουθώς συνοψίζονται οι παράμετροι "ζωτικής σημασίας" και τα επιζήμια φαινόμενα που μπορούν να λάβουν χώρα κατά το σχηματισμό πολυ(γαλακτικού οξέος):

*Ρακεμοποίηση:* Η μετατροπή σε ρακεμικό μείγμα μπορεί να οφείλεται στην οπτική καθαρότητα του γαλακτικού οξέος ή μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιοδήποτε από τα στάδια της διεργασίας. Μία αυξημένη ποσότητα της αντίθετης χειρόμορφης δομής της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας έχει αναπόφευκτα επιζήμιο αποτέλεσμα στην κρυσταλλικότητα, επηρεάζοντας παράλληλα και άλλες ιδιότητες των τελικών προϊόντων.

**Καθαρότητα λακτιδίων:** Τα λακτίδια είναι δυνατό να περιέχουν ακαθαρσίες, όπως οξέα ή ολιγομερή που δημιουργήθηκαν κατά τα στάδια του αποπολυμερισμού ή του καθαρισμού. Η παρουσία των ακαθαρσιών στα λακτίδια αλλά και η περιεκτικότητα του μείγματος σε αυτές επηρεάζουν το βαθμό πολυμερισμού, το μοριακό βάρος ή και τα δύο.

**Υπολειμματική ποσότητα μονομερούς:** Η παρουσία λακτιδίου στο PLA και η περιεκτικότητα σε αυτό θα έχει επιβλαβή αποτελέσματα στο πολυμερές και στην απόδοσή του κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και είναι πιθανό να προκαλέσει αλλαγές στις επιθυμητές ιδιότητες των τελικών προϊόντων [2].

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του λακτιδίου μπορεί να διεξαχθεί με πολυμερισμό μάζας ή διαλύματος με διάφορους μηχανισμούς (κατιοντικό, ανιοντικό και συντονισμού), ανάλογα με τον καταλύτη ή εκκινητή που χρησιμοποιείται. Ο πιο δραστήσιος καταλύτης για τον κατιοντικό πολυμερισμό του L-λακτιδίου είναι ο οκτοϊκός κασσίτερος ή 2-διδαιθυλ-εξανοϊκός κασσίτερος,  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  (Σχήμα 11). Ο οκτανοϊκός κασσίτερος μόνο σε υψηλή θερμοκρασία προκαλεί ένα χαμηλό βαθμό ρακεμοποίησης, έχει χαμηλή τοξικότητα και είναι εγκεκριμένος από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων, FDA (Food and Drug Administration) [2], [6]. Η χρήση βαρέων μετάλλων ως καταλύτες είναι πολύ πιθανόν να μολύνουν το προϊόν, καθιστώντας δυσκολότερο τον καθαρισμό του. Έτσι, περιορίζονται οι εφαρμογές του πολυ(γαλακτικού οξέος) κυρίως στους τομείς της ιατρικής και των τροφίμων [1].



**Σχήμα 11:** Γενικευμένος κατιοντικός μηχανισμός πολυμερισμού λακτιδίου, όπου γίνεται διάνοιξη δακτυλίου και συνεχής προσθήκη στο άκρο της αλυσίδας, παρουσία  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  ως καταλύτη [17]

### 1.4.3 Πολυμερισμός Άμεσης Συμπύκνωσης

Η σύνθεση του πολυ(γαλακτικού οξέος) από γαλακτικό οξύ μέσω της μεθόδου της άμεσης συμπύκνωσης μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρία βασικά στάδια:

(i) αφαίρεση του περιεχόμενου αδέσμευτου νερού,

(ii) πολυσυμπύκνωση ολιγομερών και

(iii) πολυσυμπύκνωση τήγματος, των περιοχών με μεγαλύτερα μοριακά βάρη πολυ(γαλακτικού οξέος)

(i) Στο πρώτο στάδιο στόχος είναι η απομάκρυνση του αδέσμευτου νερού που συνυπάρχει με το γαλακτικό οξύ στο ρεύμα τροφοδοσίας. Λόγω της χημικής ισορροπίας του γαλακτικού οξέος με το νερό, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί σε αυτή τη φάση ένα μικρό ποσοστό ολιγομερών του γαλακτικού οξέος (γραμμικά διμερή, τριμερή ή άλλα). Για τη μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πολυ(γαλακτικό οξύ) πρώτα θα πρέπει να αφαιρεθεί το αδέσμευτο νερό. Η εξάτμιση του αδέσμευτου νερού απαιτεί ένα σύστημα το οποίο θα παρέχει καλή μεταφορά θερμότητας και μπορεί να λάβει χώρα σε τυπικούς εξατμιστήρες, όπως οι εξατμιστήρες των θερμικά ευαίσθητων ουσιών. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξατμιστήρες τύπου Flash για την απομάκρυνση του ελεύθερου νερού στο ρεύμα τροφοδοσίας γαλακτικού οξέος.

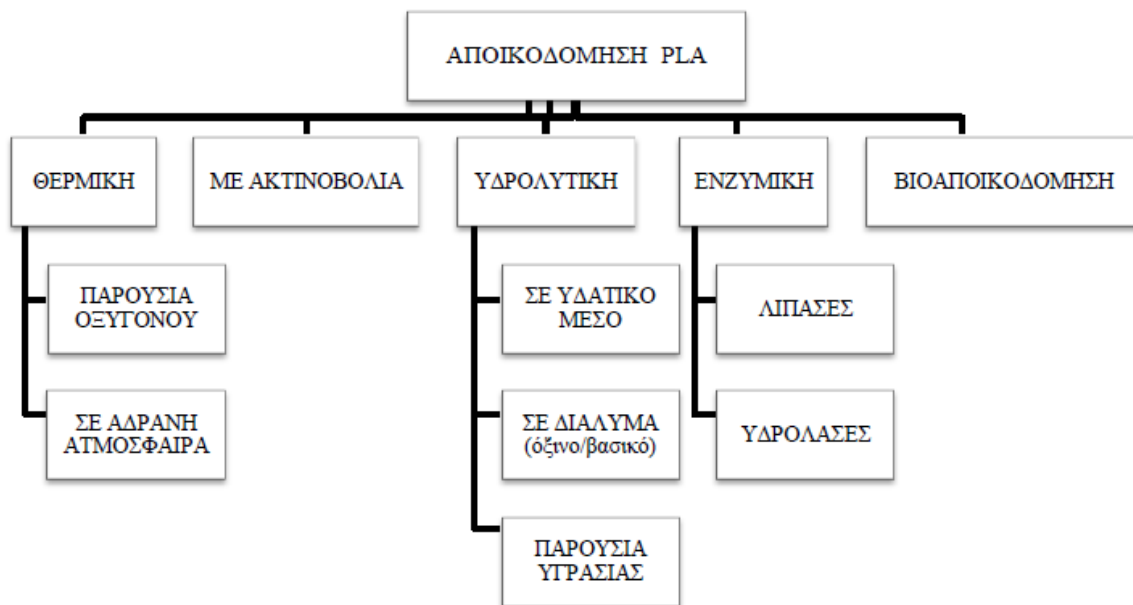
(ii) Στο δεύτερο στάδιο, το γαλακτικό οξύ μετατρέπεται σε χαμηλού μοριακού βάρους πολυ(γαλακτικό οξύ) (ολιγομερή). Σε αυτό το βήμα, η αφαίρεση του νερού δεν είναι μείζονος σημασίας λόγω του χαμηλού ιξώδους του προς αντίδραση μίγματος. Η παράμετρος που ελέγχει το βαθμό μετατροπής είναι η ίδια η αντίδραση, που επηρεάζεται άμεσα από τον χρησιμοποιούμενο καταλύτη. Παραδοσιακοί καταλύτες πολυσυμπύκνωσης είναι τα ισχυρά οξέα και τα οργανο-μεταλλικά σύμπλοκα. Η πολυσυμπύκνωση πολυ(γαλακτικού οξέος) μπορεί επίσης να γίνει σε κάποιον εξατμιστήρα ή εναλλακτικά σε κάποιον αντιδραστήρα συνεχούς έργου πλήρους ανάμειξης, όπου ο αναμεικτήρας θα παρέχει καλή ανάμειξη τόσο αξονικά όσο και ακτινικά. Η απώλεια γαλακτικού οξέος λόγω εγκλωβισμού του σε κάποιο νεκρό σημείο του αντιδραστήρα, δύναται να αντιμετωπιστεί με τη χρήση συμπυκνωτήρα αναρροής, συστήματος

απονέφωσης ή στήλης ανόρθωσης. Κατά προτίμηση αυτό το στάδιο θα πρέπει ολοκληρώνεται σε ένα καθορισμένο, σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε το προπολυμερές γαλακτικού οξέος που λαμβάνεται να έχει στενή κατανομή μοριακών βαρών.

(iii) Στο τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η πολυσυμπύκνωση τήγματος. Για να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης έναντι των αντιδράσεων της μετεστεροποίησης, το παραγόμενο νερό στο μείγμα της αντίδρασης θα πρέπει να αφαιρείται ικανοποιητικά. Επομένως σε αυτή τη φάση καθοριστική είναι η απομάκρυνση του νερού. Για να αυξηθεί η απόδοση της μεταφοράς μάζας και θερμότητας, η πολυσυμπύκνωση τήγματος θα πρέπει να γίνεται σε μία συσκευή όπου θα είναι επαρκής η ανανέωση των ορίων της διεπιφάνειας νερού-πολυ(γαλακτικού οξέος). Η συσκευή θα πρέπει να παρέχει έντονη ανάδευση με σκοπό την ομογενοποίηση του αντιδρώντος μείγματος. Η αφαίρεση του νερού από τη μάζα του πολυ(γαλακτικού οξέος) μπορεί να επιταχυνθεί αν η διεργασία τελεί κάτω από συνθήκες κενού σε αδρανή ατμόσφαιρα. Το αυξανόμενο μοριακό βάρος του πολυ(γαλακτικού οξέος) το καθιστά ιδιαίτερα ιξώδες και για αυτό είναι αναγκαία μία μέθοδος ανάμειξης που μπορεί να διαχειριστεί υψηλά, αλλά και κυμαινόμενα τανυστικά φορτία. Μία συσκευή που χρησιμοποιείται σε αυτή τη μέθοδο είναι ο αντιδραστήρας περιστρεφόμενων δίσκων, καθώς δημιουργεί μία επιφανειακή εναλλαγή που ενισχύει τη μεταφορά μάζας του σχηματιζόμενου νερού. Το υλικό κατασκευής του αντιδραστήρα θα πρέπει να διασφαλίζει ικανοποιητική μεταφορά θερμότητας, έτσι ώστε το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης να μπορεί να θεωρηθεί μακροσκοπικά ομοιόμορφο. Για τον ίδιο λόγο τακτικοί έλεγχοι θα πρέπει να γίνονται στη θερμότητα που παράγεται λόγω της μηχανικής καταπόνησης του ιξώδους πλέον πολυ(γαλακτικού οξέος). Στο στάδιο αυτό, η διατήρηση στρωτής ροής είναι ενδεδειγμένη, προκειμένου να επιτευχθεί μια στενή κατανομή μοριακών βαρών [2].

### 1.5 Διάσπαση Πολυ(γαλακτικού οξέος) στο περιβάλλον

Η αποικοδόμηση του πολυ(γαλακτικού οξέος) ανάλογα με το αντίστοιχο αίτιο και μηχανισμό διακρίνεται στην θερμική αποικοδόμηση, στην αποικοδόμηση λόγω έκθεσης σε ακτινοβολία, στην υδρολυτική και ενζυμική αποικοδόμηση, καθώς και στην βιοαποικοδόμηση (Σχήμα 12).



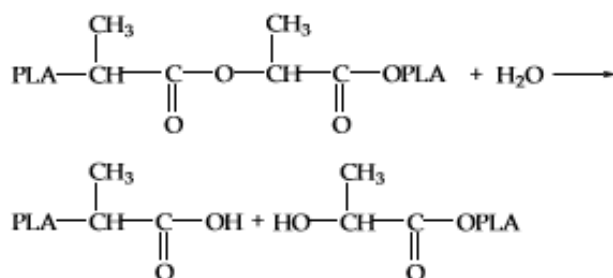
**Σχήμα 12:** Διάκριση φαινομένων αποικοδόμησης πολυ(γαλακτικού οξέος) [12]

Η αποικοδόμηση του PLA έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων, οι οποίοι έχουν σχέση είτε με το υλικό είτε με το μέσο αποικοδόμησης. Όσον αφορά το υλικό, παράγοντες όπως ο βαθμός διόγκωσης του πολυμερούς, το μοριακό βάρος, η στερεοχημεία και η διαμόρφωση, η κατανομή του μοριακού βάρους, οι ακαθαρσίες, τα πρόσθετα που δρουν καταλυτικά, η δομή και το πάχος του υλικού, η ακαμψία, η υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα του τυχόν δεύτερου συστατικού στην περίπτωση συμπολυμερών, η παρουσία ακραίων ομάδων καρβοξυλίου ή υδροξυλίου και η κρυσταλλικότητα επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση του PLA, με πιο σημαντικό παράγοντα την κρυσταλλικότητα, διότι η αποικοδόμηση ξεκινά από τις άμορφες περιοχές. Όσον αφορά το μέσο αποικοδόμησης παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και η συγκέντρωση μικροοργανισμών επιδρούν στο ρυθμό αποικοδόμησης του πολυ(γαλακτικού οξέος) [18].

Η βιοαποικοδόμηση του πολυ(γαλακτικού οξέος) είναι το χαρακτηριστικό εκείνο που το καθιστά τόσο δημοφιλές σε εφαρμογές ιατρικής και τροφίμων. Ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης του πολυ(γαλακτικού οξέος), η οποία λαμβάνει χώρα στο περιβάλλον, περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το οποίο ονομάζεται πρωταρχική αποικοδόμηση, γίνεται το σπάσιμο των αλυσίδων του πολυμερούς προς μικρότερου μοριακού βάρους τμήματα, κυρίως μέσω



υδρόλυσης (Σχήμα 13). Αν και το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι αδιάλυτο στο νερό, όταν υπόκειται σε αποικοδόμηση, το νερό διεισδύει στη μάζα του πολυμερούς και λαμβάνει χώρα η υδρόλυση των εστερικών ομάδων της άμορφης φάσης του πολυμερούς. Ακόμη κατά την υδρόλυση αυξάνεται ο αριθμός των αλυσίδων με καρβοξυλικές ομάδες στο άκρο τους, οι οποίες καταλύουν την εστερική υδρόλυση. Αυτό το πρώτο στάδιο είναι πολύ σημαντικό επειδή τα μακρομόρια δεν μπορούν αλλιώς να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κυττάρων των μικροβίων ή των βακτηρίων διαπερνώντας την εξωτερική τους μεμβράνη [19].

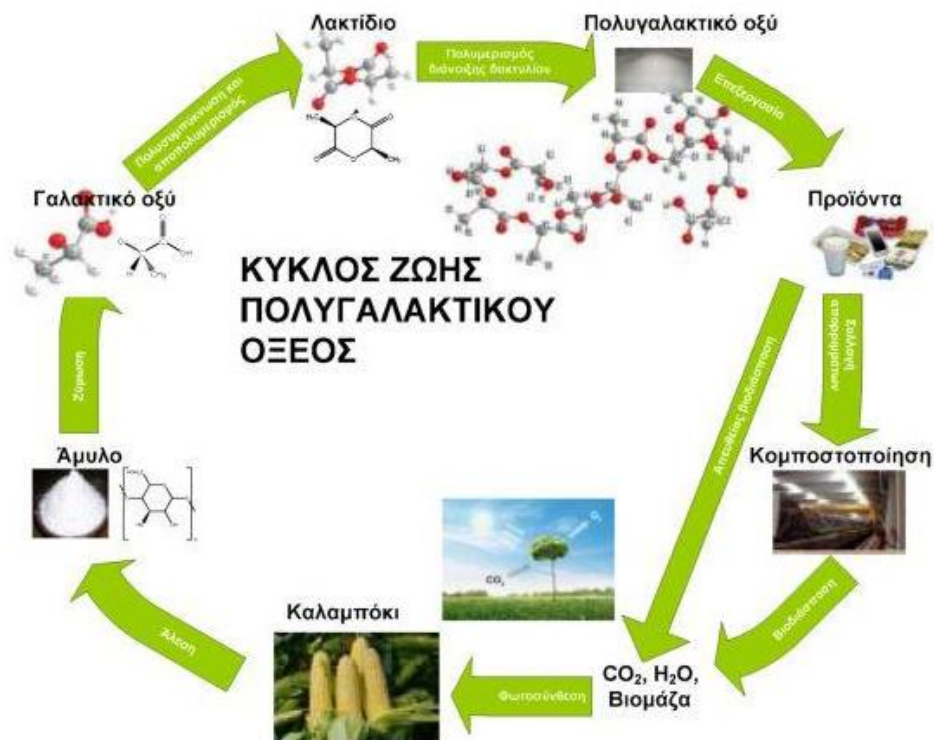


**Σχήμα 13:** Υδρολυτική διάσπαση του πολυ(γαλακτικού οξέος) [5]

Στο δεύτερο στάδιο το οποίο είναι αργό και ονομάζεται ολική βιοαποικοδόμηση, τα μικρού πλέον μοριακού βάρους τμήματα του πολυμερούς, τα οποία έχουν εισχωρήσει στο εσωτερικό των κυττάρων των μικροβίων, μπορούν πλέον με βιολογικές διαδικασίες να μετατραπούν σε βιομάζα, ανόργανη ύλη, νερό και διοξείδιο του άνθρακα ή μεθάνιο. Το κυριότερο ένζυμο που αποικοδομεί το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι η πρωτεάση K. Με λίγα λόγια το πολυμερές χρησιμοποιείται ως πηγή τροφής για τους μικροοργανισμούς και κάτω από αναερόβιες συνθήκες μετατρέπεται σε βιομάζα, νερό, διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο [20].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ο κύκλος ζωής του πολυ(γαλακτικού οξέος) που περιγράφεται σχηματικά στο Σχήμα 14 και αναδεικνύει την περιβαλλοντική αειφορία που προσφέρουν τα βιοδιασπώμενα πολυμερή με φυτική προέλευση. Από το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό και μέσω της φωτοσύνθεσης αναπτύσσονται τα φυτά, όπως το καλαμπόκι από το οποίο προέρχεται το άμυλο με άλεση. Από το άμυλο με ενζυμική υδρόλυση προκύπτει η δεξτρόζη (γλυκόζη) η οποία υφίσταται ζύμωση με την βοήθεια μικροοργανισμών για να προκύψει το γαλακτικό οξύ. Από το γαλακτικό οξύ με πολυμερισμό συμπύκνωσης σχηματίζονται oligομερή και κατόπιν τα

ολιγομερή με καταλυτική θέρμανση αποπολυμερίζονται προς λακτίδιο. Το λακτίδιο αφού καθαριστεί πολυμερίζεται καταλυτικά σύμφωνα με τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου προς πολυ(γαλακτικό οξύ) υψηλού μοριακού βάρους. Το σχηματιζόμενο πολυμερές υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία προς τη δημιουργία κατάλληλων προϊόντων. Τα προϊόντα, μετά το τέλος της χρήσης τους απορρίπτονται και συγκεντρώνονται σε χώρους κομποστοποίησης, όπου και βιοδιασπώνται σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και βιομάζα. Τα συστατικά αυτά στη συνέχεια, με τη βοήθεια της φωτοσύνθεσης, συντελούν στη δημιουργία και ανάπτυξη νέων φυτών τα οποία γίνονται πρώτη ύλη για την παραγωγή νέων προϊόντων και ο κύκλος ζωής του πολυ(γαλακτικού οξέος) συνεχίζεται. Το πλεονέκτημα μιας τέτοιας διαδικασίας είναι το γεγονός ότι υπάρχει ισορροπία στην ποσότητα CO<sub>2</sub> που δεσμεύεται και που αποβάλλεται κατά την παραγωγή και διάσπαση του πολυ(γαλακτικού οξέος) αντίστοιχα. Έτσι το περιβάλλον δεν επιβαρύνεται σημαντικά με διοξείδιο του άνθρακα [2].



Σχήμα 14: Κύκλος ζωής πολυ(γαλακτικού οξέος)

## 1.6 Εφαρμογές Πολυ(γαλακτικού οξέος)

Όταν έκαναν την πρώτη τους εμφάνιση τα βιοπολυμερή, εξαιτίας της υψηλής τους τιμής, οι εφαρμογές τους παρέμεναν περιορισμένες στον τομέα της ιατρικής λόγω της υψηλής προστιθέμενης αξίας των προϊόντων σε αυτό τον τομέα. Πλέον η τιμή τους είναι ανταγωνιστική αυτής των κοινών πλαστικών και οι εφαρμογές τους έχουν επεκταθεί σε αρκετούς τομείς.

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βιοπλαστικό με καλές μηχανικές ιδιότητες και δυνατότητα βιοδιάσπασης κατά την έκθεση του σε κατάλληλο περιβάλλον, όπως έχει ήδη αναλυθεί. Επιπρόσθετα πρόκειται για ένα βιοσυμβατό υλικό, δεν είναι δηλαδή τοξικό για τον άνθρωπο, καθώς κατά την αποδόμηση του παράγονται γαλακτικό οξύ, λακτίδιο, γραμμικό διμερές και κάποια ολιγομερή του γαλακτικού οξέος. Σε κάθε περίπτωση τόσο τα διμερή, όσο και τα ολιγομερή υδρολύονται προς γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι ένα κοινό συστατικό των τροφίμων που έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλές για τον ανθρώπινο οργανισμό, σε επίπεδα που υπερβαίνουν κατά πολύ οποιοδήποτε μικρό ποσό μπορεί να προκύψει από τις χρήσεις του PLA [21].

Οι κύριοι τομείς στους οποίους βρίσκει εφαρμογή το PLA είναι οι εξής:

- Ιατρική
- Συσκευασία
- Αγροτικά προϊόντα
- Υφάσματα-ΐνες
- Αυτοκινητοβιομηχανία
- Ηλεκτρικός εξοπλισμός

Ακολουθεί πιο αναλυτική προσέγγιση των προαναφερθέντων πεδίων εφαρμογής του πολυ(γαλακτικού οξέος).

### 1.6.1 Ιατρική

Στην Ιατρική, οι εφαρμογές αποκατάστασης ιστού που έχει υποστεί βλάβη είναι είτε μακροχρόνιες είτε προσωρινές. Στις μακροχρόνιες εφαρμογές απαιτούνται σταθερά και ανθεκτικά υλικά, ενώ τα βιοαποικοδομήσιμα υλικά βρίσκουν εφαρμογή σε περιπτώσεις

προσωρινών εφαρμογών. Δύο είναι τα κύρια πλεονεκτήματα της εφαρμογής βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών στην ιατρική. Πρώτον, το υλικό με το χρόνο χάνει την λειτουργικότητά του, ως αποτέλεσμα της βιοδιάσπασης, ενώ ταυτόχρονα εξελίσσεται σταδιακά η αποκατάσταση των λειτουργιών του σώματος που είχαν υποστεί βλάβη. Δεύτερον, δεν απαιτείται επιπλέον επέμβαση αφαίρεσης του εμφυτεύματος, αφού αυτό βιοδιασπάται σταδιακά στον οργανισμό [3,22].

#### 1.6.1.1 Ράμματα

Τα πρώτα ράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οργανικά, ζωικής ή φυτικής προέλευσης, συνθετικά και μεταλλικά. Διακρίνονται σε απορροφήσιμα και μη-απορροφήσιμα. Το «catgut» θεωρείται το πρώτο φυσικό απορροφήσιμο υλικό που χρησιμοποιήθηκε ως ράμμα στη χειρουργική. Κατασκευάζεται από έντερα ζώων και έχει ως χαρακτηριστικό την υψηλή αντοχή και σκληρότητα.

Η αρχική εφαρμογή των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών στον τομέα της ιατρικής πριν περίπου 50 χρόνια που εμφανίστηκαν στην αγορά, ήταν ως βιοαφομοιώσιμα ράμματα. Στη συγκεκριμένη αγορά των βιοαποικοδομήσιμων υλικών, τα βιοδιασπώμενα ράμματα κατέχουν τη μερίδα του λέοντος από το 1995. Πρόκειται επομένως για μια ήδη «ώριμη» αγορά. Το πλεονέκτημά τους είναι ότι μετά την εφαρμογή τους, αφομοιώνονται από τον οργανισμό χωρίς να απαιτείται επιπλέον διαδικασία για την αφαίρεσή τους, ενώ είναι απόλυτα συμβατά με τον οργανισμό. Διακρίνουμε δύο κατηγορίες ραμμάτων:

- ✓ Πεπλεγμένα (Braided)
- ✓ Μονοϊνικά (Monofilament)

Τα πεπλεγμένα ράμματα είναι περισσότερο εύκαμπτα ενώ τα μονοϊνικά είναι περισσότερο σκληρά (Albertsson 2003). Η επιλογή του κατάλληλου τύπου ράμματος βασίζεται σε κριτήρια όπως η αντοχή στον εφελκυσμό, η πιθανότητα μόλυνσης, η ευκολία στη χρήση και η αντοχή. Τα πρώτα και πιο γνωστά εμπορικά βιοαπορροφήσιμα ράμματα είναι τα Dexon από PGA, που κυκλοφόρησαν στην αγορά το 1962 ενώ αργότερα χρησιμοποιήθηκαν ράμματα και από PLA (Εικόνα 1).

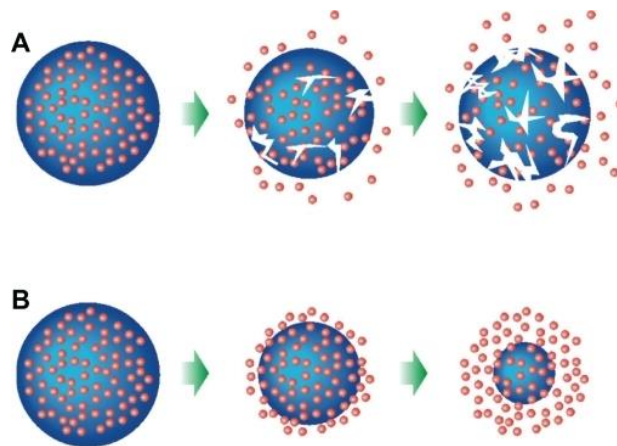


**Εικόνα 1:** Εμπορικά βιοαπορροφήσιμα ράμματα

#### 1.6.1.2 Ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκου (drug delivery)

Η ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκου είναι η μέθοδος ή η διαδικασία για τη μεταφορά μίας φαρμακευτικής ένωσης σε έναν οργανισμό, με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί με ασφάλεια το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή τηρούν τις αυστηρές απαιτήσεις που επιβάλλονται στα συστήματα διανομής φαρμάκων, όπως η ικανότητα μεταφοράς στον οργανισμό με τη μορφή αερολύματος και η σταθερότητα έναντι των δυνάμεων που δημιουργούνται σε αυτή την περίπτωση, η βιοσυμβατότητα, η στοχευμένη δράση (σε καθορισμένα όργανα ή σε συγκεκριμένους πληθυσμούς κυττάρων), η απελευθέρωση του φαρμάκου με ένα προκαθορισμένο τρόπο και, τελικά, η διάσπασή τους μέσα σε ένα αποδεκτό χρονικό διάστημα [25].

Οι τρόποι μεταφοράς φαρμάκου ποικίλουν ανάλογα με την περίπτωση. Η απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας μπορεί να είναι συνεχής, για ένα χρονικό διάστημα ή να είναι κυκλική με συγκεκριμένη περίοδο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία, είτε πολυμερικών συστημάτων «πλαϊσίου» και εναπόθεσης του φαρμάκου σε εξωτερικές στρώσεις, είτε πολυμερικών συστημάτων «αποθήκευσης» με εσώκληση του φαρμάκου σε βιοδιασπώμενη μεμβράνη. Στη πρώτη περίπτωση, έχουμε επιφανειακή βιοδιάσπαση (surface erosion) και μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης φαρμάκου με τη πάροδο του χρόνου, ενώ στη δεύτερη έχουμε ομοιόμορφη βιοδιάσπαση (bulk erosion), με σταθερό ρυθμό διάχυσης του φαρμάκου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 15 [26].

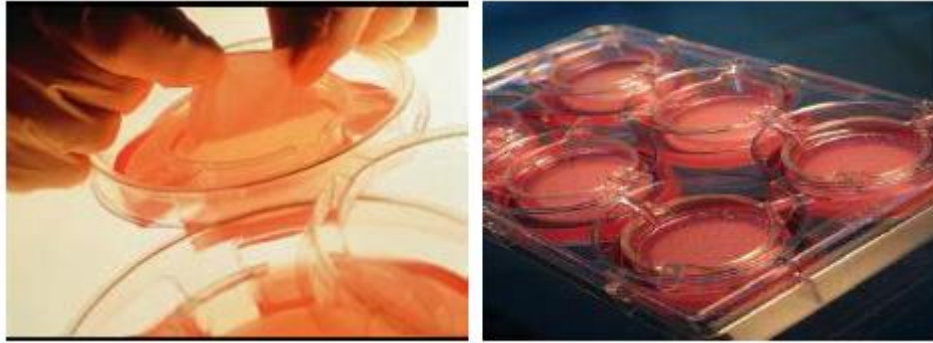


**Σχήμα 15:** Μεταφορά φαρμάκου από σύστημα ομοιόμορφης διάβρωσης (A) και επιφανειακής διάβρωσης (B)

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών και η εφαρμογή τους στη μεταφορά φαρμάκου είναι πλέον γεγονός, με κύριους εκπροσώπους το πολυ(γαλακτικό οξύ), το πολυ(γλυκολικό οξύ) και τα συμπολυμερή τους, τα οποία βιοαποικοδομούνται ομοιόμορφα στον οργανισμό. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή με μορφή νανοσφαιριδίων, η σύνθεση των οποίων θα περιγραφεί παρακάτω.

#### 1.6.1.3 Μηχανική αποκατάστασης ιστών

Η μηχανική αποκατάστασης ιστών ορίζεται ως η χρήση φυσικών ή συνθετικών υλικών παράλληλα με τα κύτταρα του οργανισμού έτσι ώστε να δημιουργηθεί βιολογικό υπόστρωμα που θα λειτουργήσει ως υποκατάστατο του χαμένου ιστού. Το ιστικό ικρίωμα σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να υποστηρίζει τον αποκατεστημένο ιστό είτε προστατεύοντας τα κύτταρα είτε βοηθώντας τα να απορροφηθούν από τον οργανισμό. Η μηχανική αποκατάστασης ιστών εφαρμόζεται για παράδειγμα στην αποκατάσταση δέρματος σε περίπτωση εγκαύματος (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Αποκατάσταση δέρματος από βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την αποκατάσταση ιστών στον οργανισμό θα πρέπει:

- να είναι βιοσυμβατά
- να έχουν παρόμοια μηχανική συμπεριφορά με τον ιστό που θα αντικαταστήσουν
- να είναι αρκετά πορώδη
- να μπορούν να στηρίξουν την ανάπτυξη των κυττάρων
- να προσφέρουν ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ υποστρώματος και ιστού
- να μπορούν να διασπαστούν χωρίς να αφήνουν τοξικά υπολείμματα στον οργανισμό.

Τα πρώτα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό ήταν οι πρωτεΐνες (π.χ. το κολλαγόνο), ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν αποικοδομήσιμα συνθετικά πολυμερή όπως το πολυ(γαλακτικό οξύ) και συμπολυμερή τους [27,28].

#### 1.6.1.4 Ορθοπεδική- Εμφυτεύματα

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα, τα βιοσυμβατά υλικά, όπως τα μέταλλα, τα κεραμικά και τα πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε χειρουργικές εμφυτεύσεις. Τα μεταλλικά και τα κεραμικά υλικά συνέβαλαν στην πρόοδο της ορθοπεδικής αντικατάστασης ιστού, ωστόσο, δεν είναι βιοδιασπώμενα και η δυνατότητα επεξεργασίας τους είναι πολύ περιορισμένη. Αντίθετα τα πολυμερή χαρακτηρίζονται από ελεγχόμενη βιοαποικοδομησιμότητα και ευκολία στην επεξεργασία τους [29].

Σε περιπτώσεις αποκατάστασης καταγμάτων, οι μεταλλικές συσκευές χρησιμοποιούνται για την ευθυγράμμιση και τον έλεγχο της σχετικής κίνησης των θραυσμάτων των οστών, μέχρι να



αποκατασταθούν. Ωστόσο, η πλήρης επούλωση του οστού εξαρτάται από τα φορτία που δέχεται, τα οποία είναι μειωμένα όσο η συσκευή φέρει μέρος αυτών. Επιπλέον, η ξαφνική απομάκρυνση της συσκευής αφήνει το οστό προσωρινά αδύναμο, αυξάνοντας τις πιθανότητες να υποστεί νέο κάταγμα. Ωστόσο, στην περίπτωση των συσκευών που κατασκευάζονται από PLA, η αποικοδόμηση μειώνει σταδιακά την αντοχή σε τάση καθώς και το μέτρο ελαστικότητας του εμφυτεύματος και το φορτίο μεταφέρεται βαθμιαία στο οστό που επουλώνεται. Επίσης, μετά την αποικοδόμηση η συσκευή απορροφάται πλήρως, οπότε μία δεύτερη χειρουργική επέμβαση δεν είναι απαραίτητη. Επειδή οι συσκευές αποκατάστασης οστών με βάση το PLA παρουσιάζουν κατώτερες μηχανικές ιδιότητες από τις αντίστοιχες μεταλλικές συσκευές, κατά την κατασκευή τους πρέπει να γίνεται ενίσχυση μέσω ινών [30].



**Εικόνα 3:** Βιοδιασπώμενα εμφυτεύματα από πολυ(γαλακτικό οξύ)

### 1.6.2 Συσκευασία

Από τα δισεκατομμύρια τόνων συνθετικών πλαστικών που παράγονται ετησίως, το 33% της κατανάλωσης είναι για υλικά συσκευασίας, τα περισσότερα εκ των οποίων καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής, ή απορρίπτονται τυχαία στο περιβάλλον, ακόμα και στους ωκεανούς. Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την παραγωγή υλικών συσκευασίας είναι το PET, το PVC, το PE, το PP, το PS και το PA. Αυτά τα υλικά παρότι είναι ευρέως διαθέσιμα σε σχετικά χαμηλό κόστος και έχουν επιθυμητές φυσικές και χημικές ιδιότητες, δεν είναι πλήρως ανακυκλώσιμα ή/και βιοαποικοδομήσιμα. Έτσι τα τελευταία χρόνια έχουν κερδίσει μεγαλύτερη προσοχή τα πολυμερή υλικά που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και είναι βιοδιασπώμενα ή λιπασματοποιήσιμα.



Οι εφαρμογές των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών σε συσκευασίες τροφίμων περιλαμβάνουν μαχαιροπήρουνα μίας χρήσης, ποτήρια, σκεύη για σαλάτα, πιάτα, καλαμάκια, ζελατίνες περιτυλίγματος και γενικά δοχεία που χρησιμοποιούνται στη διανομή τροφίμων σε εταιρείες «γρήγορου» φαγητού (Εικόνα 4, 5). Κατά τη διάρκεια ζωής τους, τα υλικά αυτά θα έρθουν σε επαφή με υδατικά περιβάλλοντα, θα περιέχουν όξινα και λιπαρά τρόφιμα, θα διατηρηθούν σε θερμοκρασία μικρότερη αυτής του δωματίου, ή θα ζεσταθούν και μετά θα αφεθούν να παγώσουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Για τους ανωτέρω λόγους, όταν θα γίνεται στο στάδιο της παρασκευής τους η προσαρμογή των ιδιοτήτων των βιοπλαστικών, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην προστασία και τη διατήρηση του περιεχομένου φαγητού. Ενδιαφέρει, λοιπόν, η διατήρηση των ιδιοτήτων -μηχανικών ιδιοτήτων και ιδιοτήτων φράγματος- καθ' όλη τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης της συσκευασίας με το φαγητό, όπως επίσης και η συμβατότητα του υλικού συσκευασίας με το περιεχόμενό του, καθώς αποτελεί μια πιθανή αιτία υποβάθμισης της ποιότητας του φαγητού [21,31].



**Εικόνα 4:** Εφαρμογές PLA για προϊόντα καθημερινής χρήσης



**Εικόνα 5:** Φιάλες PLA για συσκευασία νερού και χυμού

### 1.6.3 Αγροτικά προϊόντα

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή βρίσκουν εφαρμογή και στον αγροτικό τομέα, σε εφαρμογές που σχετίζονται με τη γεωργία, την καλλιέργεια και τη διαχείριση των φυσικών απορριμμάτων. Η προστασία των φυτών από τα καιρικά φαινόμενα, η ελεγχόμενη απελευθέρωση παρασιτοκτόνων, η συγκράτηση της υγρασίας στο έδαφος, η μεταφορά νερού και η συσκευασία είναι κάποιες από τις εφαρμογές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν βιοδιασπώμενα υλικά.

Τα υλικά θα πρέπει να συνδυάζουν ιδιότητες όπως η μηχανική αντοχή, η αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, η διαπερατότητα σε οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Οι μεμβράνες από βιοδιασπώμενα πλαστικά χρησιμοποιούνται στον τομέα της γεωργίας με τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιούνται οι μεμβράνες από LDPE μέχρι σήμερα, για παράδειγμα στα θερμοκήπια. Τοποθετούνται με τη βοήθεια γεωργικών μηχανημάτων πριν ή κατά τη διάρκεια της σποράς, ενώ μετά τη συγκομιδή θάβονται στο χώμα και διασπώνται. Ο κύριος στόχος των μεμβρανών αυτών είναι να εμποδίσουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων φυτών στην καλλιεργημένη γη, να βοηθήσουν στην ανάπτυξη του φυτού και συγχρόνως να συγκρατούν το έδαφος. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η χρήση λιπασμάτων ή άλλων τοξικών φυτοφαρμάκων, ενώ συγχρόνως δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον με επιπλέον απόβλητα, αντίθετα ωφελούν κάνοντας το έδαφος περισσότερο εύφορο μετά τη διάσπασή τους.

Κατάλληλα υλικά που βρίσκουν εφαρμογή αποτελούν θερμοπλαστικά από άμυλο, όπως το Ecoflex, το πολυ(γαλακτικό οξύ), το PCL, και η PVOH [32]. Το Ecoflex είναι ένας αλειφατικός, αρωματικός συμπολυεστέρας που έχει ως βάση τα μονομερή: 1,4 βουτανοδιόλη, αδιπικό οξύ και τереφθαλικό οξύ. Είναι ένας βιοαποικοδομήσιμος πολυεστέρας που προέρχεται από παράγωγα της πετρελαϊκής βιομηχανίας και αναμειγνύεται με πολυ(γαλακτικό οξύ) προς παρασκευή του Ecovio.



Εικόνα 6: Χρήση πολυ(γαλακτικού οξέος) σε αγροτικά προϊόντα

#### 1.6.4 Υφάσματα-Ίνες

Ίνες και υφάσματα που κατασκευάζονται από συνθετικά πολυμερή, όπως το νάιλον και οι πολυεστέρες, χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια για βιομηχανικές εφαρμογές, καθώς και σε είδη ένδυσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εξαιρετική ανθεκτικότητα των συνθετικών πολυμερών έχει αποδειχθεί σημαντικό πλεονέκτημα, ενώ σε άλλες έχει οδηγήσει σε δυσμενείς συνέπειες. Οι ίνες PLA δεν είναι μόνο βιοαποδομήσιμες, αλλά και εξαιρετικά λειτουργικές λόγω των εγγενών ιδιοτήτων τους, όπως η βακτηριοστατική δράση, η επιβράδυνση της ανάφλεξης και η αντοχή στις καιρικές συνθήκες, σε σύγκριση με τις συμβατικές ίνες PET [2]. Επιπρόσθετα, διαθέτουν φυσική και μαλακή αίσθηση, εύκολη επεξεργασία, αντοχή κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και καλή αντίσταση στο χρωματισμό από χώμα, καλλυντικά, αναψυκτικά και άλλα εδώδιμα είδη [33].

Μερικές από τις σημερινές χρήσεις των ινών PLA περιλαμβάνουν τα γεωυφάσματα, που έχουν ήδη παρουσιαστεί, τα βιομηχανικά υφάσματα, τις πετσέτες και τα μαντηλάκια καθαρισμού, τον οικιακό εξοπλισμό, τα είδη ένδυσης και προσωπικής υγιεινής. Στη βιομηχανία

χρησιμοποιούνται πολλοί διαφορετικοί τύποι υφασμάτων σε εφαρμογές όπως τα στέγαστρα και οι τέντες, τα καλύμματα εδάφους, τα υφάσματα καθισμάτων αυτοκινήτου και οι μουσαμάδες. Πετσέτες και μαντήλια από 100% PLA ή μίγματα PLA με βαμβάκι έχουν πιο φυσική αίσθηση, καλύτερη απορροφητικότητα και στεγνώνουν ταχύτερα σε σύγκριση με 100% βαμβακερά προϊόντα. Χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα όπως οι παιδικές πάνες και τα μαντήλια καθαρισμού σώματος, δαπέδου και επίπλων. Τυπικές εφαρμογές του PLA στην επίπλωση εσωτερικών χώρων αποτελούν τα πλακάκια και τα χαλιά, οι ταπετσαρίες, οι κουρτίνες και οι περσίδες. Επίσης, χρησιμοποιείται σαν πληρωτικό υλικό σε μαξιλάρια, παπλώματα και κουβέρτες. Στον τομέα της ένδυσης οι ίνες PLA χρησιμοποιούνται σε μπλουζάκια, εσώρουχα, αθλητικά είδη, τζιν και μπουφάν [2].

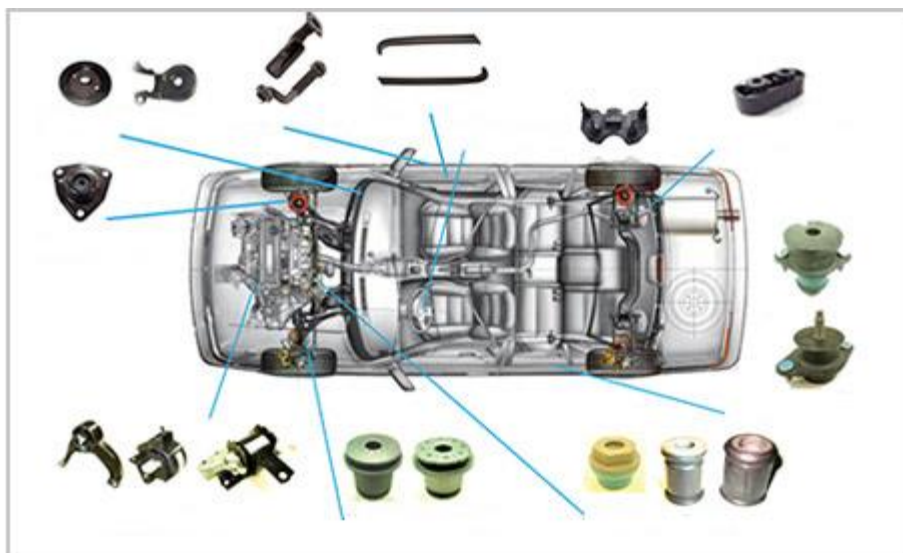


**Εικόνα 7:** Ίνες από πολυ(γαλακτικό οξύ)

#### 1.6.5 Αυτοκινητοβιομηχανία

Στην αυτοκινητοβιομηχανία, προωθούνται οι τεχνικές εξελίξεις για την μείωση της κατανάλωσης καυσίμου με στόχο την μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Η υποκατάσταση των μεταλλικών με πλαστικά εξαρτήματα είναι επιθυμητή, επειδή τα αυτοκίνητα γίνονται ελαφρύτερα και συνεπώς η κατανάλωση καυσίμου μειώνεται. Όταν δε τα πλαστικά εξαρτήματα είναι βιοδιασπώμενα είναι σημαντικό η διάρκεια ζωής τους να υπερβαίνει τα 10 έτη, ενώ απαιτούνται καλές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες για την κάλυψη των διαφόρων απαιτήσεων της αυτοκινητοβιομηχανίας. Η υποδεέστερη θερμική αντίσταση, αντοχή σε κρούση και αντοχή σε τάση του PLA, σε σχέση με το πολυπροπυλένιο, PP, που χρησιμοποιείται ευρέως στην αυτοκινητοβιομηχανία, προϋποθέτει κατάλληλη προεπεξεργασία ή ενσωμάτωση προσθέτων σε αυτό. Για παράδειγμα, βελτίωση της θερμικής αντοχής επιτυγχάνεται με μερική τροποποίηση των ακραίων ομάδων του PLA, ενώ βελτίωση της αντοχής σε καιρικές συνθήκες εξασφαλίζεται με την ενσωμάτωση προσθέτων για την απορρόφηση της ακτινοβολίας UV. Το

πολυ(γαλακτικό οξύ) έχει ήδη βρει εφαρμογή σε εξαρτήματα οχημάτων (πατάκια, υφάσματα και μαξιλάρια καθισμάτων, υφάσματα οροφής, επένδυση θυρών) (Εικόνα 8) [1].



**Εικόνα 8:** Εξαρτήματα αυτοκινήτου από πολυ(γαλακτικό οξύ)

#### 1.6.6 Ηλεκτρικός Εξοπλισμός

Ζούμε σε έναν κόσμο όπου η διάρκεια ζωής των ηλεκτρονικών ειδών γίνεται όλο και μικρότερη, πλησιάζοντας πλέον ένα μέσο όρο μερικών μηνών. Αυτό δημιουργεί ένα αυξανόμενο οικολογικό πρόβλημα, αφού τα πλαστικά ηλεκτρονικά αντιπροσωπεύουν έναν αναδυόμενο τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας. Παρά το γεγονός ότι σε σύγκριση με την παγκόσμια παραγωγή και κατανάλωση πλαστικών, η αγορά των ηλεκτρονικών παράγει μόνο μία μικρή ποσότητα αποβλήτων, ο αριθμός αυτός δεν πρέπει να αγνοηθεί [34].

Έτσι, το πολυ(γαλακτικό οξύ) χρησιμοποιείται για αναλώσιμα είδη ηλεκτρονικών υπολογιστών, κινητών τηλεφώνων, βάσεις πληκτρολογίων και ψηφιακών οπτικών δίσκων (Εικόνα 9)



Εξωτερική όψη φορητού υπολογιστή από PLA (NEC Corp)



Εξωτερική όψη DVD player από PLA (Sony Corp)



Βιοδιασπώμενος δίσκος (Sanyo Mavic Media)

**Εικόνα 9:** Ηλεκτρικές & ηλεκτρονικές εφαρμογές πολυ(γαλακτικού οξέος)

## 1.7 Βιβλιογραφικές Αναφορές

- [1] Lian Xiao, Bo Wang, Guang Yang, Mario Gauthier, 'Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications', Intech, 2012, 248-282
- [2] R. Auras, L.T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji, 'Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processes and Application', Eds. John Wiley & Sons, New Jersey. 2010
- [3] K. M. Nampoothiri, N. R. Nair, R. P. John, 'An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, Biores. Techn. 2010; 101: 8493-8501
- [4] P. Pan, Y. Inoue, 'Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters', Progr. Pol. Sci. 2009; 34: 605-640
- [5] D. E. Henton, P. Gruber, J. Lunt, J. Randall, 'Polylactic Acid Technology', Natural Fibers, Biopolymers and Biocomposites. 2005; 16: 529-578
- [6] P. Gruber, M. O'Brien, 'Polylactides "NatureWorks® PLA"', Biopolymer Online. 2005, 235-250
- [7] J. Lunt, A. Shafer, 'Polylactic Acid Polymers from Corn: Applications in the textiles industry', J. Ind. 2000, 191-205
- [8] M. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, 'Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes', Biotech. Adv. 2013; 31: 877-902
- [9] J. Ahmed, S. Varshney, 'Polylactides-Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review', International Journal of Food Properties, 2010, 14:1, 37-58
- [10] Witzke, D.R., Introduction to Properties, Engineering, and Prospects of Polylactide Polymers, PhD Thesis, 1997. Department of Chemical Engineering, Michigan State University, East Lansing, Michigan, p. 32-72
- [11] G. Perego, G. D. Cella, C. Bastioli, 'Effect of molecular weight and crystallinity on Poly(lactic acid) Mechanical Properties', J. Appl. Polym. Sci., 1996, 59: 37-43
- [12] T. Maharana, B. Mohanty, Y.S. Negia, 'Melt–solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability', Progr. Polym. Sci., 2009, 34: 99-124
- [13] I. Engelberg, J. Kohn, 'Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study', Biomaterials, 1991, 12: 292-304
- [14] R. Auras, B. Harte, S. Selke, 'An Overview of Polylactides as Packaging Materials', Macromol. Biosci., 2004; 4: 835-864



- [15] M. Jamshidian, E.A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, S. Desobry, 'Poly-lactic acid: Production, applications, nanocomposites and release studies', *Compr. Rev. Foo. Sci. Foo. Saf.*, 2010; 9: 552-571
- [16] F. A. Castillo Martinez, E. M. Balciunas, J. M. Salgado, J. M. Dominguez, 'Lactic acid, properties, application and production: A review', *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 30: 70-83
- [17] R. E. Drumright, P. R. Gruber, D. E. Henton, 'Polylactic Acid Technology', *Advanced Materials*, 2000, 12: 1841-1846
- [18] H. Tsuji, 'Degradation of Poly(lactide)-Based Biodegradable Materials', Nova Science Publishers, 2007
- [19] R. Smith, 'Biodegradable polymers for industrial applications', 2005
- [20] C. Bastioli, 'Handbook of Biodegradable Polymers', 2005
- [21] V. Siracusaa, P. Rocculi, S. Romani, M. D. Rosa, 'Biodegradable polymers for food packaging: a review', *Tre. Foo. Sci. Techn.*, 2008; 19: 634-643
- [22] O. Cabaret, B. Vaca, D. Bourissou, 'Controlled Ring-opening Polymerization of Lactide and Glycolide', *Chem. Rev.*, 2004
- [23] J. C. Middleton, A. J. Tipton, 'Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices', *Biomaterials*, 2000; 21: 2335-2346
- [24] J. Ren, 'Biodegradable Poly(Lactic Acid), Synthesis, Modification, Processing and Applications', 2010
- [25] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S. Bannaerjee, ' Drug delivery systems: An updated review', *Int. J. Pharm. Investig.*, 2012; 2: 2-11
- [26] V. B. Kotwal, M. Saifee, N. Inamdar, K. Bhise, 'Biodegradable Polymers: Which, When and why?', *Indian Journal of Pharm. Sc.*, 2007; 616
- [27] P. Gunatillake, R. Adhikari, 'Biodegradable synthetic polymers for Tissue Engineering', *European Cells and Materials*, 2003; 5: 1-16
- [28] S. N. Lakshimi, T. L. Cato, 'Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery', *Adv. Biochem Engin/Biotechnol*, 2006; 102: 47-90
- [29] M.S. Lopes, A.L. Jardini, R.M. Filho, 'Poly(lactic acid) production for tissue engineering applications', *Proc. Eng.*, 2012; 42: 1402-1413

- [30] A.P. Gupta, V. Kumar, 'New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique', *Europ. Polym.*, 2007; 43: 4053–4074
- [31] R. E. Conn, J. J. Kolstad, J. F. Borzelleca, Jr. L. J. Filer, B. N. LaDu, M. W. Pariza, 'Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer', *Food and Chemical Toxicology*, 1995; 33: 273-283
- [32] M. Kolybaba, L. G. Tabil, S. Panigrahi, W. J. Crerar, T. Powell, B. Wang, 'Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future', 2003
- [33] A. K. Mohanty, M. Misra, L.T. Drzal, 'Natural fibers, biopolymers and biocomposites', Eds. Taylor & Francis Group, 2005
- [34] M. Irimia-Vladua, E. D. Głowacki, G. Voss, S. Bauer, N. S. Sariciftci, 'Green and biodegradable electronics', *Mater. Tod.*, 2012; 15: 340-346



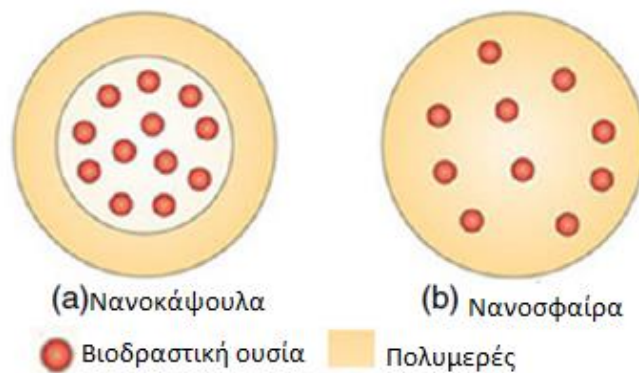
## **Κεφάλαιο 2: Διεργασίες εγκλεισμού βιοδραστικών μορίων σε νανοσωματίδια πολυμερούς**

### **2.1 Εισαγωγή**

Η φύση έχει δημιουργήσει τα δομικά στοιχεία της ζωής σε νανοκλίμακα, όπως το DNA, τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και τις ορμόνες [1]. Εμπνευσμένος, λοιπόν, ο άνθρωπος από την δημιουργία της φύσης, δημιούργησε τα νανοϋλικά για την πρόοδο και ευημερία της ανθρωπότητας. Το 1959, ο Richard Feynman πρότεινε την έννοια της νανοδομής και το 1974 ο Nario Taniguchi επινόησε τον όρο νανοτεχνολογία για τον χαρακτηρισμό σωματιδίων σε νανοκλίμακα [2]. Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων σε νανοκλίμακα αυξάνει την αναλογία επιφάνεια προς όγκο, η οποία αυξάνει διαδοχικά την αλληλεπίδρασή τους με στόχο την αλλαγή μηχανικών, οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων. Αυτές οι ιδιότητες προσφέρουν μοναδικές και καινοτόμες εφαρμογές σε πολλούς τομείς [3].

Ένας τομέας που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της χρήσης νανοσωματιδίων, είναι ο τομέας της ιατρικής. Βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή χρησιμοποιούνται για την δημιουργία νανοσωματιδίων ως φορείς για την χορήγηση φαρμάκων. Στα πολυμερικά νανοσωματίδια το φάρμακο διαλύεται, παγιδεύεται, εγκλείεται ή συνδέεται με μία μήτρα νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια από πολυμερή υλικά (NPs) ορίζονται ως σωματίδια διασποράς ή στερεά σωματίδια με μέγεθος στην περιοχή εύρους από 10 έως 1000 nm και ανάλογα με την μέθοδο παρασκευής μπορεί να παραχθούν σε νανοσφαίρες ή νανοκάψουλες [4] (Εικόνα 10).

Οι νανοκάψουλες είναι συστήματα στα οποία το φάρμακο περιορίζεται σε μία κοιλότητα που περιβάλλεται από μία μοναδική μεμβράνη πολυμερούς, ενώ οι νανοσφαίρες είναι συστήματα στα οποία το φάρμακο διασπείρεται φυσικά και με ομοιόμορφο τρόπο (το πολυμερές αποτελεί ουσιαστικά μία μήτρα) [5].



**Εικόνα 10:** Δομή νανοκάψουλας (α), νανοσφαίρας (β) [6]

### 2.1.1 Πλεονεκτήματα πολυμερικών νανοσωματιδίων

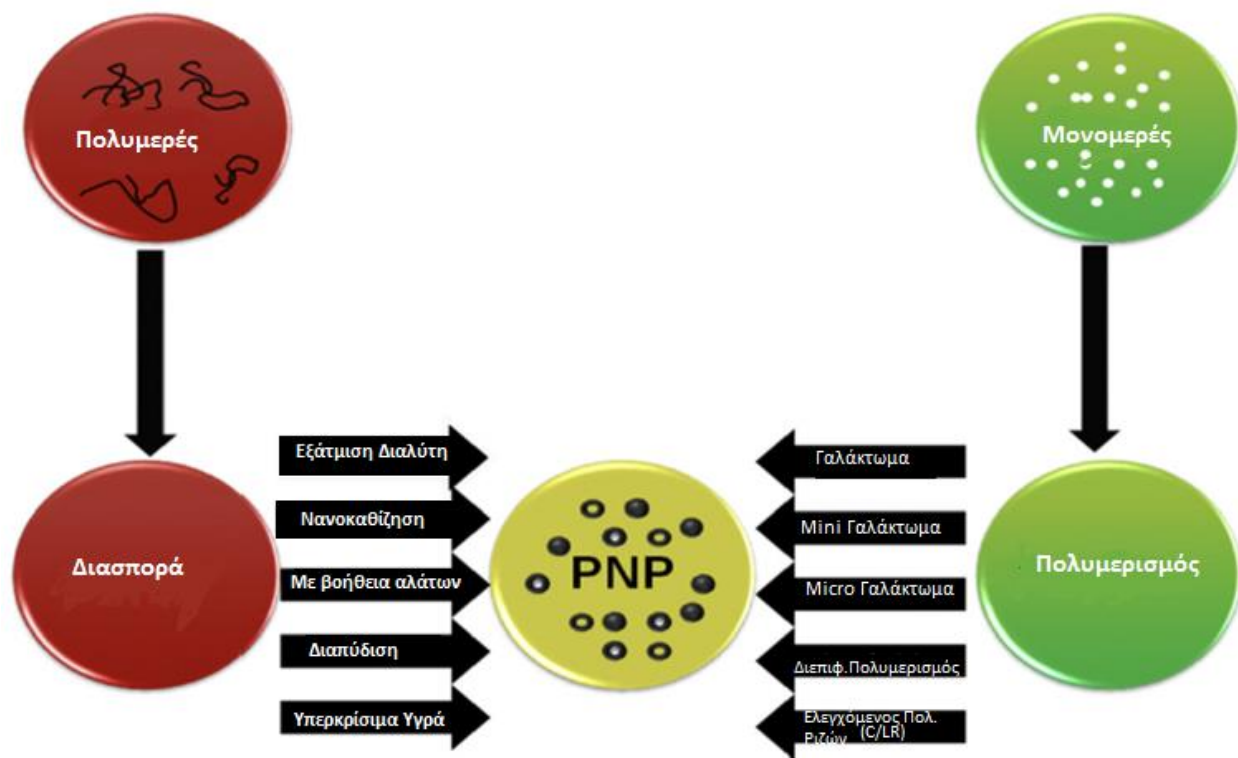
Τα πλεονεκτήματα των πολυμερικών νανοσωματιδίων στην χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών είναι πολλά. Ενδεικτικά αναφέρονται τα παρακάτω:

- Αύξηση της σταθερότητας τυχόν πτητικών φαρμακευτικών ουσιών, εύκολη και οικονομική παρασκευή σε μεγάλες ποσότητες
- Σημαντική βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της αποδοτικότητας σε σχέση με παραδοσιακές μεθόδους χορήγησης, όπως κατάποση, ενδοφλέβια χορήγηση
- Παροχή υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμάκου σε μία επιθυμητή θέση
- Επιλογή του είδους πολυμερούς και της ελεγχόμενης αποδέσμευσης του φαρμάκου από αυτό με αποτέλεσμα να αποτελούν ιδανικούς υποψηφίους στη θεραπεία του καρκίνου, τα ελεγχόμενα συστήματα αποδέσμευσης εμβολίων, αντισυλληπτικών και στοχοθετημένων αντιβιοτικών
- Εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνολογίας και σε άλλους τομείς, όπως η μηχανική ιστών [7,8]

## 2.2 Μέθοδοι σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων (NPs)

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν είτε από ήδη σχηματισμένο πολυμερές είτε με άμεσο πολυμερισμό μονομερών χρησιμοποιώντας τις κλασικές τεχνικές πολυμερισμού. Μέθοδοι όπως εξάτμιση διαλύτη, διαχωρισμός με την βοήθεια αλατών, νανοκαθίζηση, με υπερκρίσιμα υγρά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων από σχηματισμένα πολυμερή. Από την άλλη μεριά,

πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν να συντεθούν απευθείας από τον πολυμερισμό μονομερών με τις τεχνικές αιωρήματος, γαλακτώματος και με διεπιφανειακό πολυμερισμό. Μία απεικόνιση των τεχνικών παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων φαίνεται στο Σχήμα 16. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου παρασκευής γίνεται με βάση τους εξής παράγοντες: τύπος πολυμερικού συστήματος, πεδίο εφαρμογής, απαίτηση στο μέγεθος κλπ. [9]



Σχήμα 16: Τεχνικές παρασκευής πολυμερικών νανοσωματιδίων [9]

Έμφαση θα δοθεί στις μέθοδοι σύνθεσης από σχηματισμένα πολυμερή, εκ των οποίων η γαλακτωματοποίηση/εξάτμιση διαλύτη μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

➤ **Γαλακτωματοποίηση/Εξάτμιση διαλύτη (Emulsification/Solvent evaporation)**

Η τεχνική γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη αποτελεί την πρώτη μέθοδο που αναπτύχθηκε για την παραγωγή νανοσωματιδίων (NPs). Σε αυτήν την μέθοδο, τα διαλύματα πολυμερούς παρασκευάζονται σε πτητικούς διαλύτες και δημιουργείται ένα γαλάκτωμα.

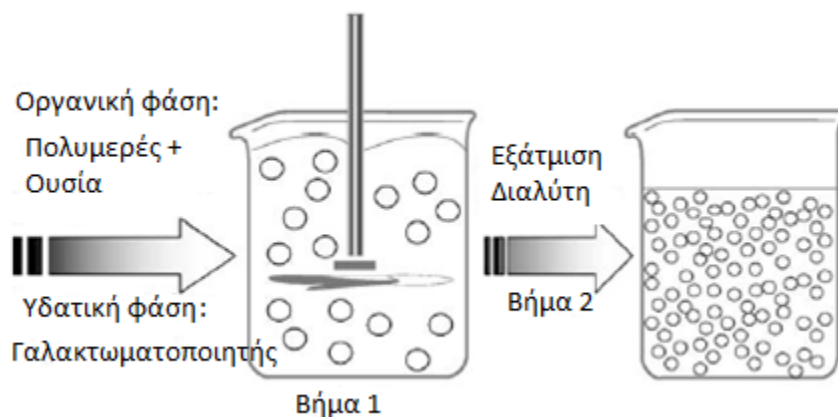
Παλαιότερα, το διχλωρομεθάνιο και το χλωροφόρμιο χρησιμοποιούνταν ως διαλύτες πολυμερών, όμως έχουν αντικατασταθεί από τον οξικό αιθυλεστέρα, ο οποίος πλεονεκτεί ως προς την τοξικολογική του συμπεριφορά.

Το γαλάκτωμα που δημιουργείται, μετατρέπεται σε ένα εναιώρημα νανοσωματιδίων κατά την εξάτμιση του διαλύτη και το πολυμερές αφήνεται να διαχυθεί μέσα από τη συνεχή φάση του γαλακτώματος (Σχήμα 17) [9].

Στις συμβατικές μεθόδους, δύο είναι οι κύριες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των γαλακτωμάτων:

Η μέθοδος απλού γαλακτώματος, όπως έλαιο σε νερό (oil-in-water)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η οποία είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό υδρόφοβων ενώσεων, το πολυμερές διαλύεται σε έναν πτητικό οργανικό διαλύτη και η ένωση που θα εγκλειστεί διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, ενώ το διάλυμα που προκύπτει αναμιγνύεται με το διάλυμα του πολυμερούς. Το τελικό μείγμα γαλακτωματοποιείται εντός υδατικής φάσης που περιέχει γαλακτωματοποιητή και δεν διαλύει το πολυμερές. Ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται υπό ήπιες συνθήκες και τα σωματίδια συλλέγονται με διήθηση (φιλτράρισμα) ή φυγοκέντρηση, και επαναδιασπείρονται σε απεσταγμένο νερό. Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται συνήθως η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA) ή η πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη) (PEG).



**Σχήμα 17:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης/εξάτμισης του διαλύτη

### Η μέθοδος διπλών γαλακτωμάτων, όπως (νερό σε έλαιο) - σε νερό (water-in-oil)-in-water

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό υδατοδιαλυτών ενώσεων. Η προς εγκλεισμό ουσία διαλύεται σε μια υδατική φάση, η οποία γαλακτωματοποιείται μέσα σε μια πτητική οργανική φάση, στην οποία είναι διαλυμένο το πολυμερές. Το γαλάκτωμα που προκύπτει διασπείρεται σε μεγαλύτερο όγκο μιας δεύτερης υδατικής φάσης, με σκοπό να σχηματιστεί ένα διπλό γαλάκτωμα. Στη συνέχεια, γίνεται εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και ανάκτηση των σωματιδίων που σχηματίζονται.

Με την τεχνική γαλακτωματοποίησης/εξάτμισης του διαλύτη παράγονται νανοσωματίδια, οι ιδιότητες των οποίων εξαρτώνται από τις εξής μεταβλητές:

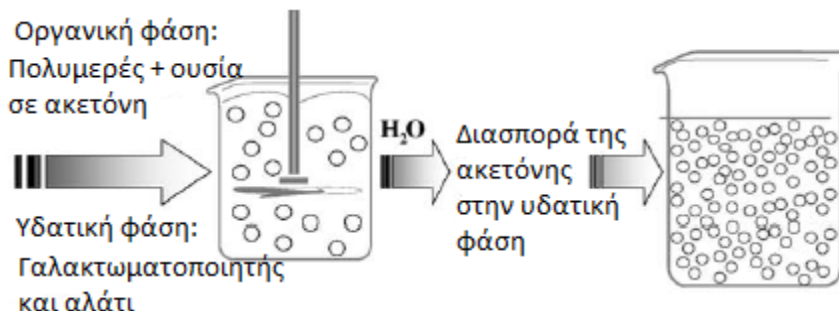
- ❖ Τα υλικά που χρησιμοποιούνται
- ❖ Τις συνθήκες της διεργασίας, όπως: η θερμοκρασία, η πίεση, ο ρυθμός ανάμειξης
- ❖ Τον ρυθμό εξάτμισης του διαλύτη (όσο γρηγορότερα πραγματοποιείται η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, τόσο μεγαλύτερα σωματίδια σχηματίζονται)

Ακόμη, το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων επηρεάζεται από το είδος και την ποσότητα του μέσου διασποράς, το ιξώδες της οργανικής και της υδατικής φάσης, την ταχύτητα ομογενοποίησης και τη θερμοκρασία.

#### ➤ **Διαχωρισμός με τη βοήθεια αλάτων (*Salting out*)**

Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό ενός αναμείξιμου με το νερό διαλύτη από ένα υδατικό διάλυμα, με τη βοήθεια αλάτων. Το πολυμερές και η ένωση που πρόκειται να εγκλειστεί στα νανοσωματίδια αρχικά διαλύεται σε έναν διαλύτη όπως η ακετόνη, και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό γαλακτωματοποιείται εντός ενός υδατικού πηκτώματος που περιέχει τον παράγοντα εξαλάτωσης (ηλεκτρολύτες, όπως χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο ασβέστιο και οξικό μαγνήσιο, ή μη ηλεκτρολύτες όπως σακχαρόζη) και έναν σε κολλοειδή μορφή σταθεροποιητή, όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη ή η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη. Αυτό το γαλάκτωμα ελαίου-νερού αραιώνεται με επαρκή ποσότητα νερού, ώστε να ενισχυθεί η διάχυση της ακετόνης στην υδατική φάση, προκαλώντας έτσι τον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Ο διαλύτης και ο

παράγοντας εξαλάτωσης στη συνέχεια απομακρύνονται με διήθηση διασταυρούμενης ροής (Σχήμα 18). Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό ενώσεων ευαίσθητων στις υψηλές θερμοκρασίες, για τον εγκλεισμό πρωτεϊνών και γενικά λιπόφιλων ουσιών.



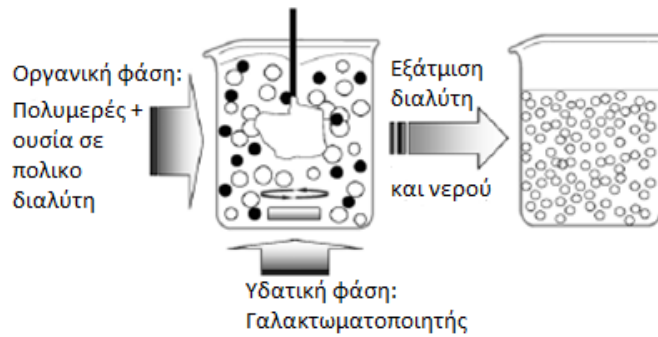
**Σχήμα 18:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής διαχωρισμού με βοήθεια αλατών

➤ **Αντικατάσταση διαλύτη ή αλλιώς νανοκαθίζηση (*solvent displacement or Nanoprecipitation*)**

Περιλαμβάνει την καθίζηση του πολυμερούς από ένα οργανικό διάλυμα και τη διάχυση του οργανικού διαλύτη στο υδατικό μέσο υπό την παρουσία ή την απουσία ενός σταθεροποιητή.

Το πολυμερές διαλύεται σε έναν διαλύτη αναμείξιμο με το νερό και ενδιάμεσης πολικότητας, οδηγώντας σε καθίζηση νανοσωματιδίων (Σχήμα 19). Αυτή η φάση εγχύεται σε αναδευόμενο υδατικό διάλυμα που περιέχει ένα σταθεροποιητή. Η εναπόθεση του πολυμερούς στη διεπιφάνεια υδατικού και οργανικού διαλύτη που προκαλείται από την ταχεία διάχυση του διαλύτη, οδηγεί στο στιγμιαίο σχηματισμό ενός κολλοειδούς διαλύματος.

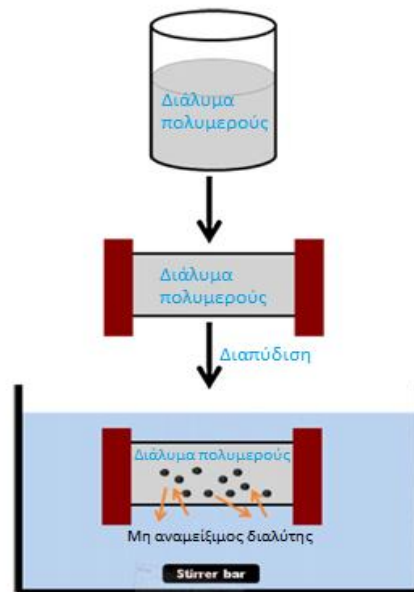
Για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός κολλοειδών πολυμερικών σωματιδίων, ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιείται με την εισαγωγή πλήρως αναμειξιμού διαλύτη που όμως δεν διαλύει το πολυμερές. Η τεχνική αντικατάστασης διαλύτη εφαρμόζεται κυρίως για λιπόφιλα φάρμακα, λόγω της αναμειξιμότητας του διαλύτη με την υδατική φάση, και δεν είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών ενώσεων.



**Σχήμα 19:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής αντικατάστασης διαλύτη/νανοκαθίζηση

➤ **Διαπίδυση (Dialysis)**

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία απλή και αποτελεσματική μέθοδο για την σύθεση μικρών και στενών νανοσωματιδίων. Το πολυμερές διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη και τοποθετείται σε ένα σωλήνα διαπίδυσης. Η διαπίδυση γίνεται σε ένα μη αναμείξιμο διαλύτη με τον προηγούμενο του πολυμερούς. Η μετατόπιση του διαλύτη μέσα από την μεμβράνη ακολουθείται από μία προοδευτική συσσωμάτωση πολυμερούς λόγω απώλειας της διαλυτότητας και του σχηματισμού ομογενούς αιωρήματος νανοσωματιδίων (Σχήμα 20). Ο μηχανισμός σχηματισμού νανοσωματιδίων με την τεχνική αυτή δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός.



**Σχήμα 20:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής διαπίδυσης

### ➤ Τεχνολογία υπερκρίσιμων υγρών (*Supercritical Fluid technology SCF*)

Η μέθοδος των υπερκρίσιμων υγρών αποτελεί έναν φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο παραγωγής νανοσωματιδίων υψηλής καθαρότητας και χωρίς ίχνος οργανικού διαλύτη. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η ουσία διαλύεται σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό για να σχηματίσει ένα διάλυμα, που ακολουθείται από την ταχεία διαστολή του διαλύματος κατά μήκος ενός στομίου ή τριχοειδούς ακροφυσίου στον αέρα του περιβάλλοντος. Ο υψηλός βαθμός υπερκορεσμού που συνοδεύεται από την ταχεία μείωση της πίεσης, οδηγεί σε ομοιογενή πυρήνες και ως εκ τούτου, στον σχηματισμό καλά διεσπαρμένων σωματιδίων.

### 2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων

Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι το μέγεθος και το φορτίο της επιφάνειας ή αλλιώς ζ-δυναμικό.

Πιο συγκεκριμένα, το επιθυμητό μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από την εκάστοτε εφαρμογή, τη δομή του πολυμερούς, τη μέθοδο και τις συνθήκες σύνθεσής τους. Συνήθως κυμαίνεται από 50 έως 300 nm, ενώ από 100 έως 200 nm σχηματίζονται νανοσφαίρες και από 100 έως 300 nm σχηματίζονται νανοκάψουλες [11].

Η ανάλυση του ζ-δυναμικού αποτελεί μία τεχνική προσδιορισμού του επιφανειακού φορτίου των νανοσωματιδίων σε ένα διάλυμα. Εκφράζει το ηλεκτρικό δυναμικό των σωματιδίων και εξαρτάται από την σύνθεση του σωματιδίου και το μέσο διασποράς τους. Η ύπαρξη των φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων ή/και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Το ζ-δυναμικό μετράται με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφορητικές μετρήσεις). Τυπικά το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων κυμαίνεται γύρω από -100 ως 100 mV. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι η εξής:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \times U$$

Όπου ζ: το ζ-δυναμικό

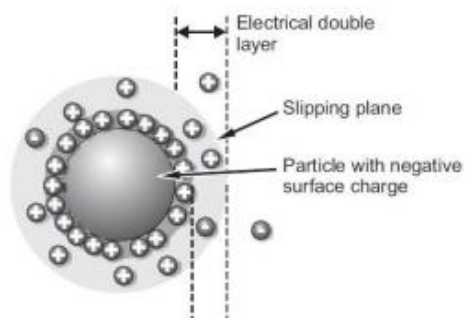
η: το ιξώδες του δείγματος



$\epsilon$ : Διηλεκτρική σταθερά

$U$ : ηλεκτροφορητική κινητικότητα που εξάγεται από την ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων, την διαφορά δυναμικού των ηλεκτροδίων και από την απόσταση των ηλεκτροδίων.

Το ζ-δυναμικό αποτελεί βασικό δείκτη της σταθερότητας του κολλοειδούς συστήματος (διάλυμα και νανοσωματίδια). Τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από +20 mW και αντίστοιχα μικρότερες από -20 mW υποδεικνύουν σταθερά νανοσωματίδια [12,13].



Σχήμα 21: Ανάλυση ζ-δυναμικού [12]

#### 2.4 Μηχανισμοί απελευθέρωσης δραστικών ουσιών

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων σχετίζεται με την ανάπτυξη συνθετικών νανοσυστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση περίπλοκων θεραπευτικών φαρμάκων και βιομορίων. Τα συστήματα ελεγχόμενης ή/και στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκων έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε στην εξωτερική μεμβράνη των προς στόχευση κυττάρων ή στο εσωτερικό τους. Οι πολυμερικοί «φορείς» μεταφέρουν τις διάφορες δραστικές ενώσεις στοχευμένα στους ιστούς και τις απελευθερώνουν με έναν από τους γενικούς φυσικοχημικούς μηχανισμούς:

1. Με διόγκωση των πολυμερικών νανοσωματιδίων μέσω ενυδάτωσης και απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας μέσω διάχυσης
2. Με ενζυματική αντίδραση που οδηγεί σε ρήξη ή διάσπαση ή αποικοδόμηση του πολυμερούς στη θέση που πρέπει να πραγματοποιηθεί η απελευθέρωση του φαρμάκου από τον παγιδευμένο εσωτερικό πυρήνα

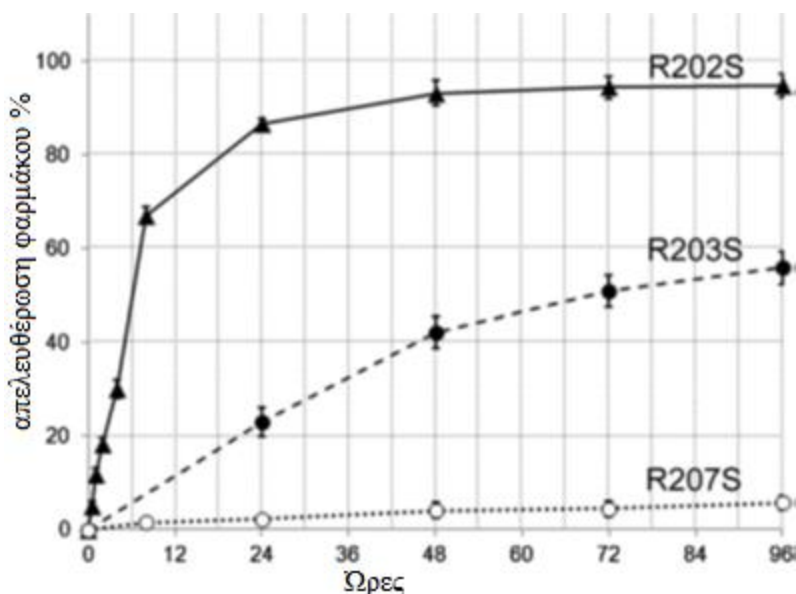
3. Με διάσταση της εγκλεισμένης ένωσης από το πολυμερές και απορρόφηση ή απελευθέρωση αυτής από τα διογκωμένα νανοσωματίδια [14].

Για την ανάπτυξη ενός νανοσωματιδιακού συστήματος, τόσο ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου όσο και η βιοαποικοδομησιμότητα του πολυμερούς πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Γενικά, ο ρυθμός αποδέσμευσης φαρμάκων εξαρτάται από:

- Τη διαλυτότητα του φαρμάκου στο μέσο διάλυσης
- Τον ρυθμό αποδέσμευσης των προσροφημένων ή χημικά συνδεδεμένων μορίων του φαρμάκου από την επιφάνεια του νανοσωματιδίου
- Τον ρυθμό διάχυσης του φαρμάκου από την πολυμερική μήτρα του νανοσωματιδίου
- Τον ρυθμό διάβρωσης ή αποικοδόμησης της νανοσωματιδιακής μήτρας [15]

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα της κινητικής αποδέσμευσης μιας ουσίας συναρτήσει του χρόνου. Η αποδέσμευση της ουσίας μελετήθηκε για τρία διαφορεικά πολυμερή. Από το γράφημα αυτό οι πληροφορίες που εξάγονται είναι η ποσότητα του φαρμάκου που απελευθερώθηκε στη διάρκεια του χρόνου.



**Σχήμα 22:** Κινητική αποδέσμευσης ουσίας συναρτήσει του χρόνου [16]

## 2.5 Βιβλιογραφικές Αναφορές

- [1] J. Weiss, P. Takhistov, D. J. McClements, 'Functional materials in food nanotechnology', *Journal of Food Science*, 2006; 71: 107–116
- [2] M. X. Quintanilla-Carvajal, B. H. Camacho-Díaz, L. S. Meraz-Torres, J. J. Chanona-Pérez, L. Alamilla-Beltrán, A. Jiménez-Aparicio, G. F. Gutiérrez-López, 'Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing', *Food Engineering Review*, 2010; 2: 39–50
- [3] S. Neethirajan, D. S. Jayas, 'Nanotechnology for the food and bioprocessing industries', *Food and Bioprocess Technology*, 2010; 4: 39–47
- [4] Y. N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, 'Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles', *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 233: 239–252
- [5] P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux, 'Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1995; 41: 2–13
- [6] G. Orive, E. Anitua, J. L. Pedraz, D. F. Emerich, 'Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration', *Nature Reviews Neuroscience*, 2009; 10: 682–692
- [7] M. Abhilash, 'Potential applications of Nanoparticles', *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 2010
- [8] O. Kayser, A. Lemke, N. Hernández-Trejo, 'The Impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2005; 6
- [9] J. Prasad Rao, K. E. Geckeler, 'Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters', *Prog. In Pol. Sci.*, 2011; 36: 887-913
- [10] C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, 'Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2006; 2: 8-21
- [11] R. Z. Xiao, Z. W. Zeng, G. L. Zhou, J. J. Wang, F. Z. Li, A. M. Wang, 'Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles', *Int. J. of Nanomedicine*, 2010; 5: 1057-1065
- [12] NanoComposix Laboratory, 'Zeta potential Analysis of nanoparticles', 2012
- [13] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, C. Vauthier, 'Nanocapsule technology: A review', *Critical reviews in therapeutic Drug Carriers Systems*, 2002; 19: 99-134
- [14] P. K. Ghosh, 'Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers', *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2002; 37: 273-282

[15] Γ. Ματθαιολαμπάκης, 'Μελέτη της ανοσοαπόκρισης μετά την διαδερμική χορήγηση αντιγόνου εγκλεισμένου σε νανοσφαίρες πολυ(γαλακτικού οξέος)', Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα 2009

[16] M. Bragagni, C. Beneitez, C. Martin, D. H. P. de la Ossa, P. A. Mura, M. E. Gil-Alegre, 'Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: Usefulness of Thermal Analysis', International Journal of Pharmaceutics, 2013; 441: 468-475

## **Κεφάλαιο 3: Αξιοποίηση ανάλυσης Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε μελέτες εγκλεισμού**

### **3.1 Εισαγωγή**

Οι μελέτες προσχεδιασμού (preformulation studies) αποτελούν το στάδιο της ανάπτυξης ενός φαρμάκου κατά το οποίο μελετώνται και χαρακτηρίζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες της φαρμακευτικής ουσίας μόνη της αλλά και σε συνδυασμό με την μήτρα. Τέτοιες μελέτες άρχισαν να πραγματοποιούνται τη δεκαετία του 1950 και σύντομα έθεσαν τις επιστημονικές αρχές και τη λογική για την ανάπτυξη νέων προϊόντων με ελαχιστοποίηση της δοκιμής και σφάλματος. Οι μήτρες είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας, παρόλο που οι περισσότερες μήτρες δεν έχουν καμία άμεση φαρμακολογική δράση. Οι φυσικές και χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δραστικής ουσίας και μήτρας μπορούν να επηρεάσουν τη χημική φύση, τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμακευτικών προϊόντων και κατά συνέπεια την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Η μορφή, η δοσολογία και η μήτρα του φαρμάκου αποτελούν τους κύριους στόχους της μελέτης προσχεδιασμού [1-3].

Σημαντικό στάδιο αποτελεί επίσης ο χαρακτηρισμός των μορίων της φαρμακευτικής ουσίας. Οι βασικές μελέτες προσχεδιασμού είναι:

- Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας
- Οι κρυσταλλικές ιδιότητες και ο πολυμορφισμός
- Το μέγεθος, το σχήμα και η επιφάνεια
- Ο προσδιορισμός της σταθεράς διάσπασης  $pK_a$
- Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής
- Η χημική σταθερότητα [1]

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την φυσικοχημική αλληλεπίδραση μεταξύ δραστικής ουσίας και μήτρας είναι η θερμική ανάλυση (DSC, DTA, DTG, ITC), φασματοσκοπικές μέθοδοι (FT-IR, Περίθλαση ακτίνων X, NMR, UV) και οι χρωματογραφικές μέθοδοι (HPLC, LC-MS/MS, TLC). Η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων είναι η θερμική ανάλυση. Ωστόσο, επειδή πολλές φορές είναι δύσκολο να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα θα

πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή και ίσως να συνδυαστούν με αποτελέσματα άλλων τεχνικών, για να προκύπτει το σωστό συμπέρασμα [3].

### 3.2 Προσδιορισμός διαλυτότητας δραστικής ουσίας σε πολυμερική μήτρα

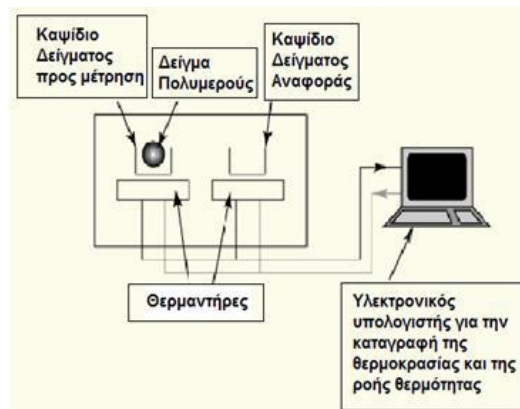
Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη βιομηχανία φαρμάκων. Αποτελεί μία μέθοδο γρήγορη, ευέλικτη και χρησιμοποιεί μόνο χλιογραμμάρια του δείγματος. Επιτρέπει την άμεση αξιολόγηση συμβατότητας μεταξύ πολυμερούς και δραστικής ουσίας από την εμφάνιση, μετατόπιση ή εξαφάνιση των κορυφών ή/και διαφοροποιήσεις στις τιμές ενθαλπίας τήξης  $\Delta H_m$  [4,5].

#### Αρχή Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θερμικών μεταπτώσεων και του ποσοστού κρυσταλλικότητας των πολυμερών. Η διάταξη DSC "σαρώνει" μία καθορισμένη θερμοκρασιακή περιοχή και μελετά τη συμπεριφορά του δείγματος του πολυμερούς καθώς η θερμοκρασία μεταβάλλεται [6].

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς στη ροή θερμότητας μεταξύ ενός δείγματος πολυμερούς και ενός δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία, όταν τα δύο δείγματα υπόκεινται σε ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή/και ψύξης. Οι μετρήσεις DSC γενικά πραγματοποιούνται με δείγματα μάζας 5-10 mg και λόγω του μικρού αυτού μεγέθους πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό της κύριας μάζας του πολυμερούς.

Πιο αναλυτικά, σε δύο θερμαινόμενους υποδοχείς τοποθετούνται δύο σφραγισμένα καψίδια αλουμινίου (pans): το ένα περιέχει το δείγμα του πολυμερούς και το άλλο, το καψίδιο αναφοράς, είναι συνήθως κενό, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 23. Στο περιβάλλον των υποδοχέων δημιουργείται αδρανής ατμόσφαιρα με τη ροή αζώτου και ο θερμικός ελεγκτής αρχίζει να θερμαίνει τους υποδοχείς με προκαθορισμένο σταθερό ρυθμό θέρμανσης. Η θερμοκρασία στους δύο υποδοχείς προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια μέσω θερμοστοιχείων [6].



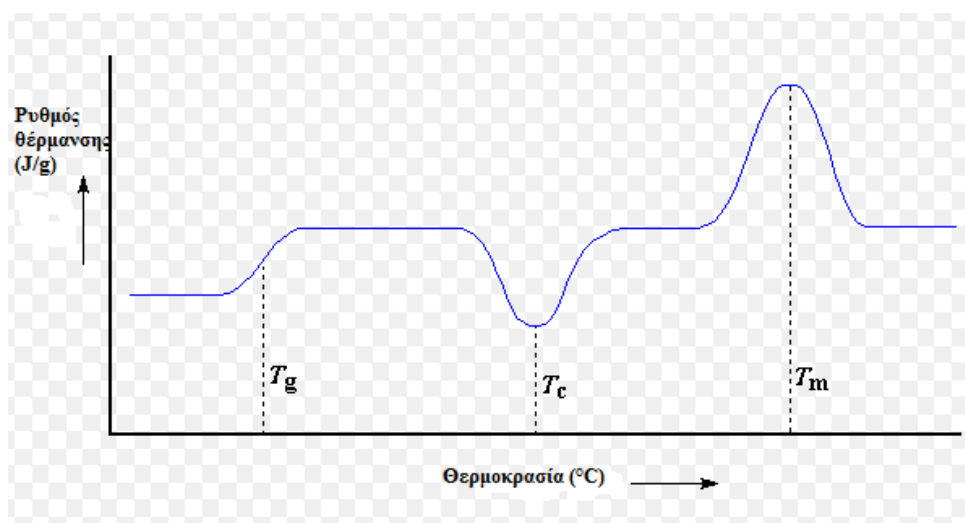
**Σχήμα 23:** Απλοποιημένη διάταξη DSC

Όταν το υπό μελέτη δείγμα υπόκειται σε μετατροπή φάσης, προσφέρεται περισσότερη (ή λιγότερη) θερμότητα σε αυτό προκειμένου η θερμοκρασία του να διατηρηθεί ίση με αυτή του δείγματος αναφοράς [3]. Με την τεχνική αυτή μπορεί να μετρηθεί σημαντικός αριθμός φυσικών ή χημικών αλλαγών σε ένα πολυμερές. Ενδόθερμες και εξώθερμες διεργασίες καταγράφονται ως κορυφές στα αντίστοιχα γραφήματα DSC και τα αντίστοιχα εμβαδά εκφράζουν την απορροφούμενη ή εκλυόμενη θερμότητα αντίστοιχα, η οποία ανάγεται στη μάζα του δείγματος που έχει χρησιμοποιηθεί. Σε αυτές τις αλλαγές περιλαμβάνονται η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ), η θερμοκρασία ( $T_c$ ) και ενθαλπία ( $\Delta H_c$ ) κρυσταλλώσεως, η θερμοκρασία ( $T_m$ ) και η ενθαλπία τήξης κρυσταλλικών πολυμερών ( $\Delta H_m$ ) [7].

Για παράδειγμα, η τήξη είναι μετάπτωση πρώτης τάξης, είναι ενδόθερμη διεργασία και επομένως ο υποδοχέας του πολυμερούς απορροφάει περισσότερη θερμότητα από ότι ο υποδοχέας αναφοράς. Η διαφορά αυτή ανιχνεύεται από τον αισθητήρα, ο οποίος ανιχνεύει μεγαλύτερη ροή ρεύματος μέσω του θερμοστοιχείου. Η αλλαγή αυτή στο ηλεκτρικό ρεύμα εντοπίζεται και οδηγεί σε δημιουργία κορυφής στο αντίστοιχο γράφημα (Εικόνα 13), όπου παριστάνεται η ροή θερμότητας ως προς τη θερμοκρασία.

Όλες οι παραπάνω πληροφορίες είναι απαραίτητες για την μελέτη προσχεδιασμού ενός φαρμακευτικού σκευάσματος [1]. Ένα χαρακτηριστικό γράφημα πολυμερούς DSC παρουσιάζεται παρακάτω. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης  $T_g$ , η θερμοκρασία κρυστάλλωσης του πολυμερούς  $T_c$  καθώς και η θερμοκρασία

τήξης του  $T_m$ . Το εμβαδόν πάνω από τις θερμοκρασίες κρυστάλλωσης και τήξης, αντιστοιχεί στην ενθαλπία κρυστάλλωσης  $\Delta H_c$  και ενθαλπία τήξης  $\Delta H_m$  του πολυμερούς, αντίστοιχα.



**Εικόνα 11:** Χαρακτηριστικό γράφημα DSC πολυμερούς

Μία ακόμα σημαντική πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης είναι η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας σε διαφορετικές πολυμερικές μήτρες. Η μελέτη διαλυτότητας έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της απόδοσης εγκλεισμού δραστικής ουσίας σε πολυμερικά νανοσωματίδια [8-10].

Αρχικά, έρευνες που έγιναν από τους Mura et al, 1998, χρησιμοποίησαν την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης για να εξετάσουν τη συμβατότητα μεταξύ της πικοταμίδης (αντιθρομβικό φάρμακο) και διαφόρων μητρών. Για να εξετάσουν τη συμβατότητα αυτών των υλικών παρασκεύασαν φυσικό μείγμα του φαρμάκου και της εκάστοτε μήτρας σε αναλογία 1:1 w/w και εξέτασαν τα δείγματα στο DSC. Χρησιμοποιώντας αυτή την αναλογία θέλησαν να μεγιστοποιήσουν την πιθανότητα να παρατηρήσουν οποιαδήποτε αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκου-μήτρας. Οι τροποποιήσεις της θερμικής συμπεριφοράς του φαρμάκου είναι αποτέλεσμα του βαθμού διαλυτότητας του φαρμάκου στο τήγμα της μήτρας. Το συμπέρασμα που εξάχθηκε από την έρευνα είναι ότι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στα πρώτα στάδια των μελετών προσχεδιασμού φαρμακευτικών



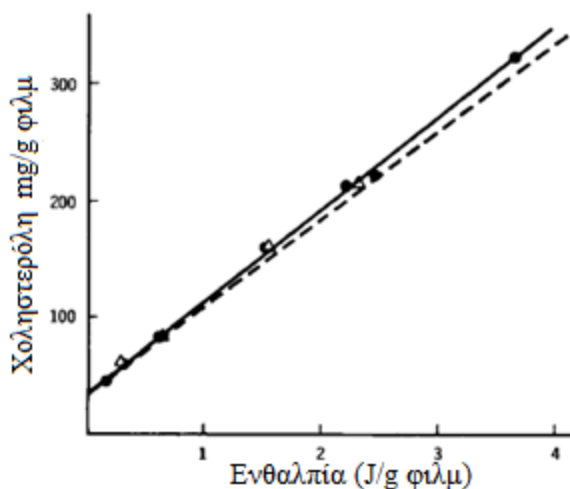
σκευασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί έναν εύκολο τρόπο υπολογισμού των πιθανών αλληλεπιδράσεων [8].

Μία ακόμα έρευνα πάνω στην διαλυτότητα φαρμάκου σε πολυμερική μήτρα, αποτελεί αυτή των Layre et al, 2005, όπου μελέτησαν την διαλυτότητα ενός υδρόφοβου κρυσταλλικού φαρμάκου σε διάφορα πολυμερή, όπως πολυ(γαλακτικό οξύ, πολυ(σεβακικό οξύ). Προσπάθησαν να εδραιώσουν μία σχέση μεταξύ της απόδοσης εγκλεισμού του φαρμάκου σε πολυμερικά νανοσωματίδια και της διαλυτότητας του φαρμάκου στα πολυμερή. Η τεχνική που ακολουθήθηκε παρασκευής των νανοσωματίδιων είναι η γαλακτωματοποίηση/εξάτμιση διαλύτη. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας προσδιορίστηκε σε φιλμ πολυμερούς σε ποσοστό φαρμάκου 10%-60% στο σύνολο του δείγματος. Το αποτέλεσμα που εξάχθηκε από τη συγκεκριμένη έρευνα είναι ότι δεν μπορεί να συσχετιστεί η διαλυτότητα του φαρμάκου με την απόδοση εγκλεισμού του στο πολυμερές. Αυτά τα μη αναμενόμενα ευρήματα μπορεί να συσχετίζονται με τις διαφορετικές μεθόδους ενσωμάτωσης του φαρμάκου. Στην περίπτωση των φιλμ πολυμερούς το φάρμακο ενσωματώθηκε σε άνυδρο μέσο, ενώ στα νανοσωματίδια η ενσωμάτωσή τους έγινε σε υγρό μέσο [9].

Ωστόσο, η μελέτη των Bragagni et al, 2013, είχε διαφορετικό αποτέλεσμα. Μετά από τον εγκλεισμό του φαρμάκου περιλοκαΐνη σε διαφορετικού μοριακού βάρους πολυμερή πολυ(γαλακτικού οξέος) και την μελέτη διαλυτότητας μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης κατέληξαν ότι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόβλεψη για την απόδοση εγκλεισμού σε νανοσωματίδια. Σκοπός της μελέτης ήταν να χρησιμοποιηθεί το DSC ως γρήγορο και έγκυρο εργαλείο για την επιλογή κατάλληλης πολυμερικής μήτρας για τον εγκλεισμό της περιλοκαΐνης. Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν με την μέθοδο διπλού γαλακτώματος και η μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού επιτεύχθηκε στο πολυ(γαλακτικό οξύ) μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας του φαρμάκου στα διαφορετικά πολυμερή έδειξε την μέγιστη αναμειξιμότητα επίσης στο πολυ(γαλακτικό οξύ) μεγαλύτερου μοριακού βάρους [10].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η έρευνα του Theeuwes, 1974 όπου σύμφωνα με αυτήν μπορεί να εφαρμοστεί ένα μαθηματικό μοντέλο για την συσχέτιση της ενθαλπίας τήξης ενός φαρμάκου

διεσπαρμένο σε μία μήτρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να αξιολογηθεί η αναμειξιμότητα των δύο συστατικών. Όταν οι τιμές συσχετίζονται γραμμικά, χρησιμοποιείται η αποτέμνουσα της ευθείας για να προβλεφθεί και να συγκριθεί η αναμειξιμότητα μεταξύ δραστικής ουσίας και μήτρας. Στα πειράματα που πραγματοποίησε, εξέτασε την αναμειξιμότητα της χοληστερόλης σε φιλμ πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS).



**Διάγραμμα 1:** Συγκέντρωση χοληστερόλης σε δείγματα φιλμ PDMS σε συνάρτηση με την ενθαλπία τήξης [11]

Η αποτέμνουσα του Διαγράμματος 1 αντιστοιχεί σε 35mg χοληστερόλης/g φιλμ. Αποτελεί την διαλυτότητα του φαρμάκου στην θερμοκρασία τήξης του. Επομένως, οι συγκεντρώσεις κάτω από τα 35mg χοληστερόλης/g φιλμ δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) [11].

### 3.3 Στόχος διπλωματικής εργασίας – Δραστικές ουσίες προς εγκλεισμό

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να εγκλειστούν τα μόρια p-κουμαρικό οξύ και p-μεθοξυκινναμικό οξύ σε νανοσωματίδια, όπου στην βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί ο εγκλεισμός τους.

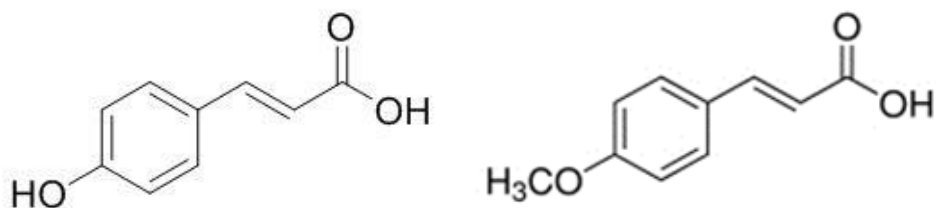
Λόγω της ευρείας χρήσης της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης στις μελέτες προσχεδιασμού φαρμακευτικών σκευασμάτων θεωρήθηκε απαραίτητη η μελέτη διαλυτότητας των δραστικών ουσιών διαφορετικής υδροφιλικότητας (p-κουμαρικό οξύ και p-μεθοξυκινναμικό οξύ) σε δύο ποιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος) διαφορετικών μοριακών

βαρών, και ο συσχετισμός τους με την απόδοση εγκλεισμού των ουσιών στις νανοσφαίρες πολυμερούς PLA.

Η όλο και αυξανόμενη χρήση νανοσωματιδίων για την στοχευμένη αποδέσμευση φαρμάκων στην ιατρική, κοσμετολογία και στον τομέα των τροφίμων έχει θέσει κάποιους στόχους για την αποτελεσματική δράση των νανοσωματιδίων. Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης μπορεί να προβλέψει το σύστημα μήτρας-φαρμάκου με την αποτελεσματικότερη δράση στον εκάστοτε τομέα εφαρμογής. Αποτελεί γρήγορο και έγκυρο εργαλείο για τον σχεδιασμό και δημιουργία του καταλληλότερου συστήματος.

Σκοπός λοιπόν της διπλωματικής εργασίας είναι η χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) για την εκτίμηση της απόδοσης εγκλεισμού ουσιών διαφορετικής υδροφιλικότητας σε διαφορετικές μήτρες πολυμερών με στόχο τον σχεδιασμό του δραστικότερου συστήματος αποδέσμευσης βιοδραστικών ουσιών.

Το *p*-κουμαρικό οξύ [3-(4-υδροφυφαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ] είναι ένα φυσικό υδροξυκιναμικό φαινολικό οξύ, δηλαδή μία οργανική ένωση που είναι υδρόξυ παράγωγο του κινναμικού οξέος. Το μοριακό του βάρος είναι 164.1580 g/mol. Είναι επίσης γνωστό με τις ονομασίες 2-Propenoic Acid, 3-(4-hydrophenyl)-Cinnamic acid, *p*-Hydroxy-β-(4-Hydroxyphenyl)-acrylic acid, *p*-Hydroxycinnamic acid, *p*-Hydroxyphenylacrylic acid, 4-Coumaric acid, 4-Hydroxycinnamic acid, *para*-Coumaric acid και 4'-Hydroxycinnamic acid. Υπάρχουν τρία ισομερή του κουμαρικού οξέος, το *o*-, το *m*-, και το *p*-κουμαρικό οξύ, τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση της υδρόξυ υποκατάστασης του φαινυλίου. Το *p*-κουμαρικό οξύ είναι το πιο άφθονο ισομερές από τα τρία. Υπάρχουν επίσης, δύο ισομερή του *p*-κουμαρικού οξέος το *cis* και το *trans*, με το τελευταίο να είναι το επικρατέστερο. Αποτελεί ένα κρυσταλλικό στερεό χρώματος κίτρινου (Εικόνα 13), που είναι ελαφρώς διαλυτό σε υδατικό διαλύτη, αλλά επαρκώς διαλυτό σε αιθανόλη, ακετόνη και διαιθυλαιθέρα. Το *p*-κουμαρικό οξύ παρουσιάζει μέτρια διαλυτότητα στο νερό (1.02 mg/ml) [12].



**Εικόνα 12:** Δομή p-κουμαρικού οξέος και p-μεθοξικινναμικού οξέος

Το p-μεθοξικινναμικό οξύ [(E)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-ενοϊκό οξύ] είναι ένα φυσικό μεθοξικινναμικό φαινολικό οξύ, δηλαδή μία οργανική ένωση που είναι μεθόξυ παράγωγο του κινναμικού οξέος. Το μοριακό του βάρος είναι 178.1846 g/mol. Είναι επίσης γνωστό με τις ονομασίες 3-(4-methoxyphenyl)-2-Propenoic acid, 4-Methoxycinnamic acid, 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid, και para-Methoxycinnamic acid. Υπάρχουν τρία ισομερή του μεθοξικινναμικού οξέος, το o-, το m-, και το p-μεθοξικινναμικό οξύ, τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση της μεθόξυ υποκατάστασης του φαινυλίου. Το p-μεθοξικινναμικό οξύ είναι το πιο άφθονο ισομερές από τα τρία. Υπάρχουν επίσης δύο ισομερή του p-μεθοξικινναμικού οξέος, το cis και το trans, με το τελευταίο να είναι το επικρατέστερο. Αποτελεί ένα κρυσταλλικό στερεό χρώματος άσπρου (Εικόνα 13) που είναι διαλυτό σε αιθανόλη, μεθανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο και αιθυλεστέρα. Το p-μεθοξικινναμικό οξύ παρουσιάζει μέτρια διαλυτότητα στο νερό (0.712 mg/ml) [12]



**Εικόνα 13:** Κρυσταλλικό p-κουμαρικό οξύ και p-μεθοξικινναμικό οξύ

### Φυσικές πηγές εύρεσης

Και οι δύο ουσίες βρίσκονται σε αφθονία σε φυτά, φρούτα, λαχανικά, μπαχαρικά όπως ο κουρκουμάς, αρωματικά βότανα, δημητριακά, κόκκους καφέ, ελιές, πρόπολη, ηλιανθους, κρασί και στο σιρόπι σφαινδάμου [13-16]. Το p-κουμαρικό οξύ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της λιγνίνης και ένα μεγάλο ποσοστό του είναι γνωστό πως εστεροποιείται με αυτήν. Στο χυμό των σταφυλιών το p-κουμαρικό οξύ μπορεί να φτάσει σε συγκέντρωση 60 mg/L [17]. Το p-κουμαρικό οξύ αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και ιδιαίτερα των μονοκοτυλήδων [18]. Το p-μεθοξικινναμικό οξύ βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο φυτό του φυσικιού και στο πίτουρο ρυζιού [19].

### Ιδιότητες- Εφαρμογές

Τα παράγωγα του φαινολικού οξέος αποτελούν μία ομάδα φυσικών ενώσεων που κυριαρχούν στην ανθρώπινη διατροφή, τα οποία είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν τόσο αντιοξειδωτικές όσο και οξειδωτικές ιδιότητες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Εμπλέκονται σε πολυάριθμες μεταβολικές αντιδράσεις. Εκτός από την χρήση τους ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα στα τρόφιμα, ορισμένα από τα παράγωγα του φαινολικού οξέος πρόσφατα βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται ως αναστολείς επιβλαβών οξειδωτικών διαδικασιών, όπως για παράδειγμα στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, φλεγμονών ή ακόμα και του καρκίνου. Τέλος, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος χρησιμοποιούνται ως συστατικά αρωμάτων σε καλλυντικά, αφρόλουτρα, σαπούνια, καθώς και σε οικιακά καθαριστικά και απορρυπαντικά [20].

Πιο συγκεκριμένα, το p-κουμαρικό οξύ γνωστό κυρίως για την αντιοξειδωτική του δράση, χρησιμοποιείται στον τομέα των καλλυντικών και της ιατρικής. Η προσθήκη του σε συμπληρώματα διατροφής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του εστέρα της χοληστερίνης, παρέχοντας ένα μηχανισμό προστασίας έναντι στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Το p-κουμαρικό οξύ δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες από τον ανθρώπινο οργανισμό, αποτρέπει την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης. Επίσης στην καταπολέμηση του καρκίνου λειτουργεί ως ενισχυτική θεραπεία παραγόντας δοξορουβικίνη- μία ανθροκινόνη που περιέχει αντικαρκινικό αντιβιοτικό [16,21]. Έχει επίσης αποδειχθεί πως ήταν αποτελεσματικό στη βελτίωση της ανθεκτικότητας της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας στην

οξείδωση [22]. Μία ακόμα έρευνα του 2007 δείχνει ότι το ρ-κουμαρικό οξύ παρέχει προστατευτικές ιδιότητες στο ήπαρ [23]. Τέλος, έχει χαρακτηριστεί σαν αντιμεταλλαξιογόνα, αντιμικροβιακή, αντιαλλεργική, αντιβακτηριακή και αντική ουσία [16,24].

Το ενδιαφέρον για τις βιολογικές δράσεις του ρ-μεθοξυκινναμικού οξέος έχει παρουσιαστεί τα τελευταία χρόνια. Το ρ-μεθοξυκινναμικό οξύ είναι γνωστό για τις ευεργετικές επιδράσεις σε ηπατοκύτταρα [25], αποτελεί προστατευτικό παράγοντα σε νευροεκφυλισμούς [26], έχει νηματοδοκτόνο δράση [27] και αγγειοχαλαρωτικές ιδιότητες [28]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση ενάντια του καρκίνου του παχέος εντέρου [29]. Άλλες μελέτες έδειξαν την ανασταλτική δράση του ρ-μεθοξυκινναμικού οξέος σε ένζυμα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της παιδικής ασθένειας ή της νόσου Alzheimer [30]. Τέλος, το ρ-μεθοξυκινναμικό οξύ και τα παράγωγά του χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία καλλυντικών για την προστασία του δέρματος από τις ακτινοβολίες UVA και UVB [31-33].

### 3.4 Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] G. N. Kirtansinh, P. M. Piyishbhai, P. M. Natubhai, 'Application of Analytical Techniques in Preformulation study: A review, Int. J. Pharm. & Biological Archives, 2011; 2: 1319-1326
- [2] M. Achim, L. Vlase, I. Tomuta, D. Muntean, C. Iyga, R. Georgescu, S. Leucuta, 'Preformulation study for a parenteral solution of memantine, Farmacia, 2011; 59: 636-646
- [3] E. Dinte, E. Bodoki, S. Leucuta, C. A. Iuga, 'Compatibility studies between drugs and excipients in the Preformulation phase of Buccal Mucoadhesive Systems', Farmacia, 2013; 61: 703-712
- [4] M. L. Vueba, F. veiga, J. J. Sousa, M. E. Pina, 'Compatibility Studies between Ibuprofen or Ketoprofen with Cellulose ether Polymer mixtures', Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005; 31: 943-949
- [5] R. M. Mainardes, M. P. Daflon Gremiao, R. C Evangelista, 'Thermoanalytical study of Praziquantel-loaded PLGA Nanoparticles', Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 2006; 42: 523-530
- [6] Σ. Βουγιούκα, 'Αριστοποίηση Ιδιοτήτων Πολυαμιδικών ρητινών με Τεχνολογία Πολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης', Διδακτορική Διατριβή, Ε.Μ.Π., Αθήνα 2004
- [7] Εργαστηριακός Οδηγός μαθήματος «Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών Ι», Αθήνα 2009
- [8] P. Mura, M. T. Faucci, A. Manderioli, S. Furlanetto, S. Pinzauti, 'Thermal Analysis as a screening technique in Preformulation studies of Picotamide Solid dosage forms', Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998; 24: 747-756
- [9] A. Layre, R. Gref, J. Richard, D. Requier, H. Chacun, M. Appel, A. J. Domb, P. Couvreur, 'Nanoencapsulation of a crystalline drug', International Journal of Pharmaceutics, 2005; 298: 323-327
- [10] M. Bragagni, C. Beneitez, C. Martin, D. H. P. de la Ossa, P. A. Mura, M. E. Gil-Alegre, 'Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: Usefulness of Thermal Analysis', International Journal of Pharmaceutics, 2013; 441: 468-475
- [11] F. Theeuwes, A. Hussains, T. Higuchis, 'Quantitative analytical method for determination of drugs dispersed in polymers using Differential Scanning Calorimetry', Journal of pharmaceutical Sciences, 1974; 63: 427-42
- [12] U. S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information

- [13] E. I. Alevizou, E.C. Voutsas, 'Solubilities of p-coumaric and caffeic acid in ionic liquids and organic solvents', *J. Chem Thermodynamics*, 2013; 62: 69-78
- [14] G. Sivagami, V. Karthikkumar, T. Balasubramanian, N. Nalini, 'The modulatory influence of p-methoxycinnamic acid, an active rice bran phenolic acid, against 1,2-dimethylhydrazine-included lipid peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis', *Chemico-Biological Interactions*, 2012; 196: 11-22
- [15] A. Gani, SM. Wani, FA. Masoodi, G. Hameed, 'Whole-Grain Cereal bioactive compounds and their health benefits: a review', *J. Food Process & Technol*, 2012; 3
- [16] S. Y. Ou, J. W. Teng, Y. Y. Zhao, J. Zhao, 'p-Coumaric acid production from Lignocelluloses', 2012
- [17] D. Salameh, C. Brandman, W. Medawar, R. Lteif, P. Strehaiano, 'Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations', *Food Chemistry*, 2007; 107: 1661-1667
- [18] R. D. Hartley, P. J. Harris, 'Phenolic Constituents of the cell walls of dicotyledons', *Biochemical Systematics and Ecology*, 1981; 9: 189-203
- [19] V. S. Sobolev, B. W. Horn, T. L. Potter, S. T. Deyrup, J. B. Gloer, 'Production of Stilbenoids and Phenolic acids by the Peanut plant at early stages of growth', *J. Agric. Food Chem*, 2006; 54: 3505-3511
- [20] V. Arjunan, R. Anitha, M. K. Marchewka, S. Mohan, H. Yang, 'Conformational, Structural, Vibrational, Electronic and Quantum Chemical investigations of cis-2-methoxycinnamic acid', *Journal of Molecular Structure*, 2014
- [21] J. Z. Davalos, R. Herrero, A. Chana, A. Guerrero, P. Jimenez, J. M. Santiuste, 'Energetics and Structural Properties, in the Gas phase, of trans-Hydroxycinnamic Acids', *J Phys. Chem.*, 2012; 116: 2261-2267
- [22] L. Y. Zang, G. Cosma, H. Gardner, X. Shi, V. Castranova, V. Vallyathan, 'Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation', *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 2000; 279: 954-960
- [23] E. Fernandez-Martinez, R. A. Bobadilla, M. S. Morales-Rios, P. Muriel, V. M. Perez-Alvarez, 'Trans-3-Phenyl-2-Propenoic Acid (Cinnamic Acid) Derivatives: Structure- Activity relationship as Hepatoprotective Agents', *Medicinal Chemistry*, 2007; 3: 475-479



- [24] L. R. Ferguson, S. Zhu, P. J. Harris, 'antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells', *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005; 49: 585-693
- [25] S. R. Lee, K. J. Kim, Y. C. Kim, 'Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity: action mechanism and structure–activity relationship', *Planta Med.*, 2002; 68: 407–441
- [26] S. R. Kim, S. H. Sung, Y. P. Jang, G. J. Markelonis, T. H. Oh, Y. C. Kim, 'E-pmethoxycinnamic acid protects cultured neuronal cells against neurotoxicity induced by glutamate', *Brit. J. Pharmacol.*, 2002; 135: 1281–1291
- [27] R. Mahajan, D. J. Kaur, K. L. Bajaj, 'Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*', *Nematol. Medit.*, 1992; 20 :217–219
- [28] R. Othman, H. Ibrahim, M. A. Mohd, M. R. Mustafa, K. Awang, 'Bioassay guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kaempferia galangal* L', *Phytomed.*, 2006; 13: 61–66
- [29] E. A. Hudson, P. A. Dinh, T. Kokubun, S. J. Monique, M. S. Simmonds, A. Gescher, 'Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells', *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 1163–1170
- [30] S. Gobec, M. Sova, K. Kristan, T. Rizner, 'Cinnamic acid esters as potent inhibitors of fungal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a model enzyme of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily', *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004; 14 :3933–3936
- [31] L. Molinero, M. Ladero, J. J. Tamayo, F. Garcia-Ochoa, 'Homogeneous catalytic esterification of glycerol with cinnamic and methoxycinnamic acids to cinnamate glycerides in solventless medium: Kinetic modeling', *Chemical Engineering Journal*, 2014; 247: 174-182
- [32] M. Promkatkaew, S. Suramitr, T. Karpkid, S. Wanichwecharungruang, M. Ehara, S. Hannongbua, 'Photophysical properties and photochemistry of substituted cinnamates and cinnamic acids for UVB blocking: effect of hydroxyl, nitro and fluoro substitutions at ortho, meta and para positions, *Photochem, Photobiol. Sci.*, 2014; 13: 583-594
- [33] W. Ferenc, B. Cristovao, J. Sarzynski, P. Sadowski, 'Complexes of the selected transition metal ions with 4-methoxycinnamic acid', *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2012; 110: 739-748



## Κεφάλαιο 4: Πειραματική διαδικασία μελέτης διεργασιών εγκλεισμού με χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης

### 4.1 Πρώτες ύλες

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τρεις ποιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος): υδρολυμένο πολυ(γαλακτικό οξύ) με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 41000$  g/mol (Δείγμα Α), πολυ(γαλακτικό οξύ) με εμπορική ονομασία PLI005 της εταιρίας Natureplast με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol (Δείγμα Β) και το πολυ(γαλακτικό οξύ) με εμπορική ονομασία PLA4042D της εταιρίας NatureWorks με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 210000$  g/mol (Δείγμα Γ). Επίσης, οι δραστικές ουσίες προμηθεύτηκαν από την εταιρία Alfa Aesar και είναι το p-κουμαρικό οξύ (98%,  $C_8H_8O_3$ ) και το p-μεθοξικιναμικό οξύ (98%,  $C_{10}H_{10}O_3$ ).

Λόγω του πολύ υψηλού μοριακού βάρους του Δείγματος Γ με εμπορική ονομασία PLA4042D της εταιρίας NatureWorks που προκάλεσε δυσκολίες στον εγκλεισμό των δραστικών ουσιών, λόγω της μη διαλυτότητάς του στην ακετόνη, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί άλλη ποιότητα ώστε να μην γίνει αλλαγή στην τεχνική σύνθεσης νανοσωματιδίων. Το πολυ(γαλακτικό οξύ) που χρησιμοποιήθηκε τελικά (Δείγμα Α) προέκυψε από υδρολυτική διάσπαση του πολυ(γαλακτικού οξέος) PLI005, με στόχο την μείωση του μοριακού βάρους.

Πιο συγκεκριμένα, 100 g από το εμπορικό πολυμερές PLI005 τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη πληρείται με απιονισμένο νερό και μερικές σταγόνες οξικού οξέος ( $CH_3COOH$ ) έως ότου επιτευχθεί όξινο περιβάλλον με  $pH=3$ . Το υλικό υποβάλλεται σε στερεάς κατάστασης υδρολυτική αποικοδόμηση σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος για 3 ημέρες σε φούρνο στους  $60^\circ C$ . Στη συνέχεια, το υλικό διηθείται και εκπλένεται τρεις φορές με 200 ml απιονισμένο νερό εκάστοτε. Τέλος, ξηραίνεται σε φούρνο στους  $80^\circ C$  για 5 ώρες. Η ομοιογένεια των υδρολυμένων κόκκων επαληθεύεται μέσα από τριπλή επιμέτρηση του ιξώδους αυτών.

#### 4.2 Πειραματική διαδικασία παρασκευής φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και πολυμερούς

Φυσικό μείγμα ονομάζεται το σώμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες χημικές ουσίες, οι οποίες συνυπάρχουν χωρίς να αντιδρούν μεταξύ τους. Η ανάμειξη των χημικών ουσιών γίνεται σε τυχαίες αναλογίες και κάθε ουσία διατηρεί αμετάβλητες τις αρχικές του ιδιότητες.

Για την παρασκευή των φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και πολυμερούς εξετάστηκαν τρεις τεχνικές με πολυμερές το Δείγμα Γ ( $\overline{M}_v = 210000$  g/mol) και ως δραστική ουσία το ρ-κουμαρικό οξύ σε τυχαία αναλογία της ουσίας μέσα στο φυσικό μείγμα 23 %.

Τεχνική 1: Ξηρή ανάμειξη πολυμερούς πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) σε μορφή κυλινδρικών κόκκων (πελλέτες, pellets) και ρ-κουμαρικού οξέος. Σε αυτή την τεχνική το πολυμερές και η ουσία ζυγίστηκαν και αναμείχθηκαν μηχανικά ως έχουν (στην εμπορική τους μορφή) για να γίνει το φυσικό μείγμα.

Τεχνική 2: Ξηρή ανάμειξη πολυμερούς πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) σε μορφή σκόνης και ρ-κουμαρικό οξύ. Η μορφή σκόνης του PLA επιτεύχθηκε με την βοήθεια μύλου ή Pulverizer της εταιρίας Fritsch (model Pulverisette 14) με ροή υγρού αζώτου μέσα στον κύριο θάλαμο θρυμματοποίησης για αποφυγή καταπόνησης του πολυμερούς και φαινομένων αποικοδόμησης. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν κατάλληλες ποσότητες από την σκόνη πολυμερούς και την δραστική ουσία.

Τεχνική 3: Η τεχνική αυτή βασίζεται σε διάλυση του πολυμερούς-ουσίας και ακόλουθη καταβύθιση και περιλαμβάνει τα εξής στάδια. Σε κωνική φιάλη των 50 ml προστίθεται ποσότητα 0.4-0.5g PLA και 30 ml χλωροφορμίου. Το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση έως ότου διαλυθεί το πολυμερές (αναλόγως το μοριακό βάρος του πολυμερούς από 0.5-1ώρα). Μετά, προστίθεται η προζυγισμένη δραστική ουσία και αφήνεται για ανάδευση έως ότου ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα της εταιρίας Büchi (model Rotavapor® R-210) (Εικόνα 15) για εξάτμιση του χλωροφορμίου και παραλαβή του φυσικού μείγματος (Εικόνα 14). Οι συνθήκες εξάτμισης του χλωροφορμίου είναι στα 350 mbar

και η θερμοκρασία του υδατόλουτρου στους 40 °C. Το φυσικό μείγμα ξηραίνεται στο φούρνο για 5 ώρες στους 80°C για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων χλωροφορμίου.



**Εικόνα 14:** Φυσικό μείγμα πολυ(γαλακτικού οξέος) και ρ-κουμαρικού οξέος



**Εικόνα 15:** Περιστροφικός εξατμιστήρας Büchi (model Rotavapor® R-210)

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω, για την παρασκευή των φυσικών μειγμάτων επιλέχθηκε η Τεχνική 3. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν ποσότητες από τις δραστικές ουσίες τέτοιες ώστε το συνολικό μείγμα να αποτελείται από 0%, 10%, 20%, 30%, 40% και 50% ποσοστό της ουσίας μέσα στο μείγμα πολυμερούς-δραστικής ουσίας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Συγκεντρωτικός πίνακας φυσικών μειγμάτων

Πολυμερές	Περιεκτικότητα σε p-Κουμαρικό οξύ	Περιεκτικότητα σε p-Μεθοξικιναμικό οξύ
Δείγμα Α	0,10,20,30,40,50 %	0,10,20,30,40,50 %
Δείγμα Β	0,10,20,30,40,50 %	0,10,20,30,40,50 %
Δείγμα Γ	0,10,20,30,40,50 %	-

#### 4.3 Θερμική ανάλυση (DSC και TGA) φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και πολυμερούς

Η ανάλυση των φυσικών μειγμάτων έγινε με την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) και την Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA). Η αρχή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης αναπτύχθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2 και η αρχή της Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης αναλύεται παρακάτω. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η Εναλασσόμενη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (ADSC) με στόχο τον διαχωρισμό επικαλυπτόμενων κορυφών τήξης μεταξύ του πολυμερούς και του p-μεθοξικιναμικού οξέος.

Για τις συγκεκριμένες αναλύσεις DSC έγινε χρήση της συσκευής Mettler Toledo DSC 1 STARe System. Η διαδικασία μέτρησης των δειγμάτων του PLA περιλαμβάνει τη ζύγιση μίας ποσότητας πολυμερούς 5-10 mg, η οποία πρώτα έχει ξηρανθεί (4 ώρες, 50 °C, 400 mbar). Στη συνέχεια η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε κατάλληλο καψίδιο αλουμινίου, το οποίο σφραγίζεται αεροστεγώς και τοποθετείται στον έναν εκ των δύο θερμαινόμενων υποδοχέων του οργάνου.

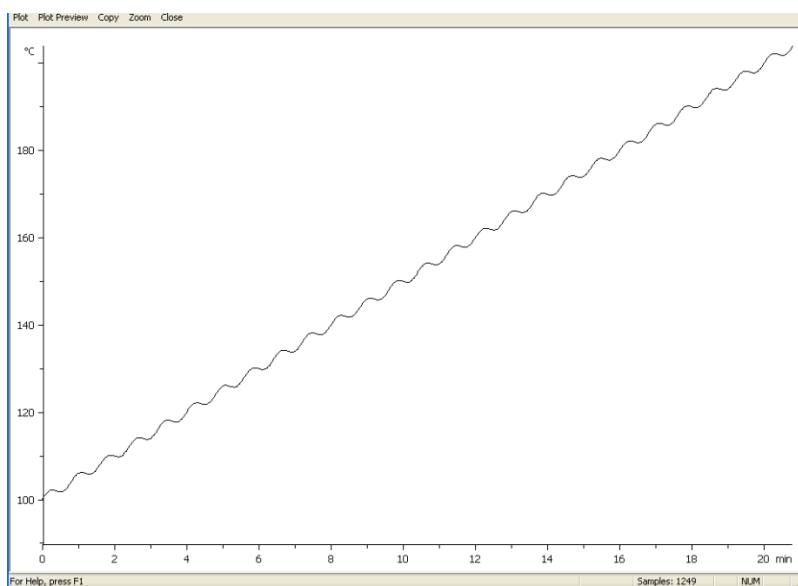
Για την περίπτωση των φυσικών μειγμάτων, τα δείγματα αρχικά θερμάνθηκαν μέχρι τους 80 °C για απομάκρυνση τυχόν υγρασίας ή χλωροφορμίου, ακολούθησε ψύξη μέχρι τους 20 °C και τέλος από τους 20 °C θέρμανση έως τους 250 °C, με συνεχή ροή φέροντος αζώτου 20 mL/min και ρυθμούς θέρμανσης/ψύξης 10°C/min. Το αποτέλεσμα της θερμοκρασιακής σάρωσης είναι η εξαγωγή ενός θερμογραφήματος από το οποίο, με τη βοήθεια του λογισμικού που συνοδεύει το όργανο, εξάγονται οι επιθυμητές πληροφορίες ( $T_g$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H_m$ ). Πρέπει να σημειωθεί ότι για την ανάλυση DSC πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις, από όπου εξάχθηκε ο μέσος όρος αυτών.

Η αρχή της Εναλασσόμενης Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης είναι η ίδια με την κλασική μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης. Χρησιμοποιείται όπου η εφαρμογή της

Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης είναι ανεπιτυχής. Τα κύρια χαρακτηριστικά και οι δυνατότητες αυτής της μεθόδου είναι:

- ❖ Καλύτερη ανάλυση χωρίς απώλεια ευαισθησίας χάρη στο μικρότερο μέσο ρυθμό θέρμανσης
- ❖ Διαχωρισμός επικαλυπτόμενων φαινομένων με αποτέλεσμα την ευρεία χρήση του σε πολυμερή, τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα
- ❖ Ακριβή μέτρηση των ειδικών θερμοχωρητικότητας κατά την διάρκεια χημικών ή φυσικών μεταβάσεων [1]

Η μέθοδος της ανάλυσης ADSC που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Το θερμοκρασιακό προφίλ που ακολουθήθηκε είναι θέρμανση από τους 100 °C έως τους 190 °C, με ρυθμό θέρμανσης 5°C ανά λεπτό.



**Εικόνα 16:** Θερμοκρασιακό προφίλ ADSC

Οι μετρήσεις TGA γίνονται στο θερμοζυγό Mettler Toledo TGA/DSC 1 STARe System του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών. Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία, τα δείγματα για τις αναλύσεις TGA είναι 5-15 mg, τα οποία πρώτα έχουν ξηρανθεί (4 ώρες, 50 °C). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χωνευτήρια αλούμινας, χωρητικότητας 70 mL, σε ατμόσφαιρα αζώτου. Η ροή αζώτου στο θάλαμο ήταν 10 mL/min. Το θερμοκρασιακό προφίλ των δοκιμών για όλα τα δείγματα κυμάνθηκε μεταξύ 25°C και 600 °C.

#### 4.4 Πειραματική διαδικασία εγκλεισμού δραστικών μορίων σε νανοσωματίδια PLA

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων από πολυ(γαλακτικό οξύ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη.

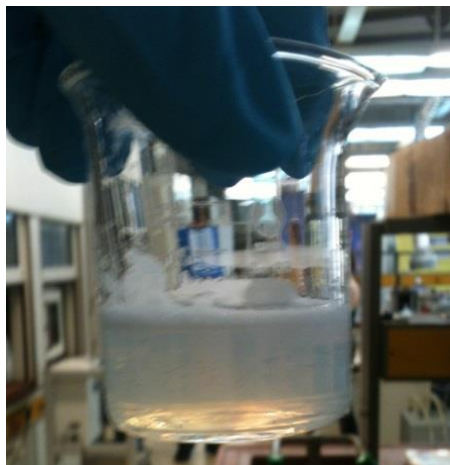
Αρχικά, για τα πειράματα του εγκλεισμού παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε μεγάλη ποσότητα, έτσι ώστε να λαμβάνεται κάθε φορά όσο χρειαστεί για τον κάθε εγκλεισμό. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθεται 1 g πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μαζί με 100 ml απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψει διάλυμα περιεκτικότητας 1% (w/v). Το ποτήρι ζέσεως με το υδατικό διάλυμα αφήνεται για ανάδευση για αρκετές ώρες μέχρι να διαλυθεί πλήρως η πολυ(βινυλική αλκοόλη).

Από το υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) που έχουμε παρασκευάσει ογκομετρούμε 15 ml και τα τοποθετούμε σε ένα ποτήρι ζέσεως για ανάδευση. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η οργανική φάση, ζυγίζοντας πρώτα το πολυ(γαλακτικό οξύ) και τις δραστικές ουσίες ώστε το ποσοστό φόρτωσης των νανοσωματιδίων να είναι 20%. Το ποσοστό φόρτωσης (drug loading) δίνεται από τον τύπο

$$\text{Ποσοστό Φόρτωσης \%} = \frac{\text{μάζα ουσίας (mg)}}{\text{μάζα πολυμερούς (mg)}} * 100\%$$

Στη συνέχεια, το πολυμερές και η εκάστοτε ουσία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 3 ml ακετόνης και αφού ο δοκιμαστικός σωλήνας καλυφθεί με προστατευτική ταινία (parafilm) που εμποδίζει την εξάτμιση του διαλύτη, οδηγείται για ανάδευση σε vortex έως ότου διαλυθεί πλήρως το πολυμερές και η ουσία. Έπειτα, έχοντας έτοιμο για χρήση το υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) και την οργανική φάση, σε ένα ποτήρι ζέσεως αποχύνουμε ταυτόχρονα τις δύο φάσεις και αρχίζει η ανάδευση με υπερήχους (Hielsher Sonicator, Ultrasonic Processor UP 100H, Berlin, Germany) για έξι λεπτά. Οι ενδείξεις του οργάνου είναι 100 Watt, 30 kHz, 1 cycle και 100% amplitude. Κατά την ανάμειξη της οργανικής με την υδατική φάση παρατηρείται ο σχηματισμός γαλακτώματος (Εικόνα 17). Η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη (ακετόνη) πραγματοποιείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα για 3 ώρες στα 100 mbar.





**Εικόνα 17:** Δημιουργία γαλακτώματος

Η απομόνωση των νανοσωματιδίων από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 12000 RPM για 20 λεπτά σε φυγόκεντρο Sorvall RC28S της εταιρίας DuPont (Εικόνα 18). Τα σωματίδια καταβυθίζονται ύστερα από κάθε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα φυλάσσεται σε κωνικές φιάλες. Τα σωματίδια του πυθμένα επαναδιασπείρονται σε απιονισμένο νερό, ώστε να ακολουθήσουν οι επόμενες φυγοκεντρήσεις. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την τρίτη φυγόκεντρο, όπου στο τέλος αυτής τα νανοσωματίδια φυλάσσονται για να ακολουθήσει ξήρανση σε κατάψυξη (λυοφιλοποίηση ή freeze-drying). Με τον όρο ξήρανση σε κατάψυξη εννοείται βαθιά κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περίπου μισή ώρα και μετά ψύξη υπό κενό στους  $-40^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες. Έτσι, λαμβάνονται τα νανοσωματίδια σε στερεή μορφή.

Με βάση την ίδια διαδικασία παρασκευάστηκαν τα «κενά» νανοσωματίδια (blanks), τα οποία δεν περιέχουν δραστική ουσία και αποτελούν την αναφορά για τα νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη ουσία (loaded).



**Εικόνα 18:** Φυγόκεντρος Sorvall RC28S, DuPont

Μετά την διεργασία της ξήρανσης σε κατάψυξη, ζυγίστηκαν τα νανοσωματίδια σε στερεή μορφή από όπου προκύπτει η απόδοση της διεργασία εγκλεισμού (yield) και δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Απόδοση διεργασίας \%} = \frac{\text{μάζα Νανοσωματιδίων (mg)}}{\text{μάζα πολυμερούς} + \text{μάζα ουσίας (mg)}} * 100\%$$

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιτυχημένες δοκιμές εγκλεισμού για την παρασκευή νανοσωματιδίων.

**Πίνακας 9:** Συγκεντρωτικός πίνακας παρασκευής νανοσωματιδίων

Όνομασία	Πολυμερές	Δραστικό μόριο	Ποσοστό Φόρτωσης (%)	Μάζα πολυμερούς για τον εγκλεισμό (mg)
A	Δείγμα A	-	20	30.7
A-p-κουμαρικό	Δείγμα A	p-κουμαρικό οξύ	20	52.3
A-p-μεθοξυκινναμικό	Δείγμα A	p-μεθοξυκινναμικό οξύ	20	49.4
B	Δείγμα B	-	20	52.6
B-p-κουμαρικό	Δείγμα B	p-κουμαρικό οξύ	20	48.1
B-p-μεθοξυκινναμικό	Δείγμα B	p-μεθοξυκινναμικό οξύ	20	49.9

#### 4.5 Μέθοδοι χαρακτηρισμού πρώτων υλών και νανοσωματιδίων

##### 4.5.1 Ιξωδομετρία διαλύματος

Η ιξωδομετρία διαλύματος ανήκει στις "έμμεσες" μεθόδους προσδιορισμού του μοριακού βάρους. Είναι εφαρμόσιμη σε πολυμερή, που διαλύονται πλήρως, χωρίς δυνατότητα χημικής

αντίδρασης με το διαλύτη ή αντίδρασης αποπολυμερισμού, και που σχηματίζουν σταθερά διαλύματα σε θερμοκρασίες από 25 °C μέχρι 150 °C [1]. Το ιξώδες αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα των πολυμερικών διαλυμάτων, η οποία έχει ιδιαίτερη σημασία αφού σχετίζεται με το μέσο μοριακό βάρος. Ο προσδιορισμός του ιξώδους γίνεται με τη χρήση ιξωδομέτρων, τα οποία διακρίνονται στους εξής τύπους [2]:

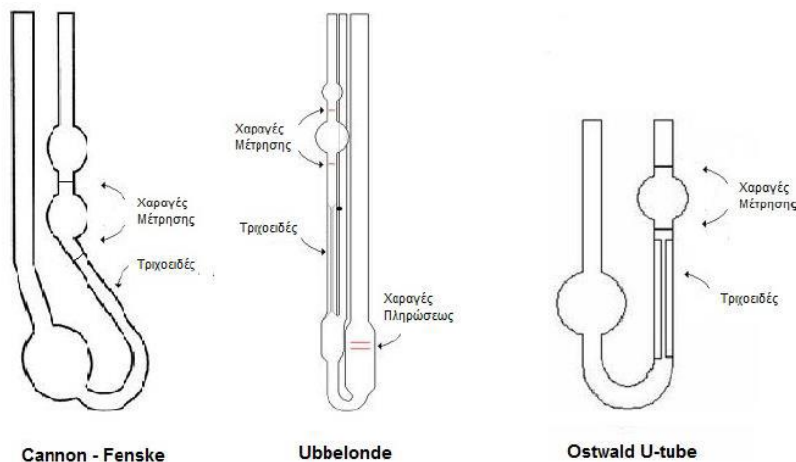
- Τριχοειδούς ροής
- Περιστροφής
- Ταλάντωσης
- Πτώσης πίεσης
- Άλλοι τύποι

Τα ιξωδομέτρα τριχοειδούς ροής διακρίνονται σε τρεις τύπους:

- ❖ Ubbelonde
- ❖ Ostwald U-tube και
- ❖ Cannon-Frenske

οι οποίοι αναπαρίστανται στην Εικόνα 19 [3].

Στην πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιείται ιξωδομέτρο τριχοειδούς ροής, τύπου Ubbelonde.



**Εικόνα 19:** Τρεις τύποι ιξωδομέτρων τριχοειδούς ροής

Το απόλυτο ιξώδες,  $\eta$ , συσχετίζεται με το χρόνο εκροής του υγρού και με τις διαστάσεις του ιξωδομέτρου σύμφωνα με την εξίσωση του Poiseuille:

$$\eta = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 V l} \quad (1)$$

όπου

$\Delta P$ : η διαφορά πίεσης ανάμεσα στα δύο 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)

Σε περίπτωση που 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,  $\rho$ , και την επιτάχυνση της βαρύτητας,  $g$ :

$$\eta = \frac{\rho g h \pi r^4 t}{8 V l} \quad (2)$$

Θέτοντας το κλάσμα  $\frac{\rho g h \pi r^4}{8 V l}$  ως σταθερά του ιξωδομέτρου, η παραπάνω εξίσωση μετατρέπεται:

$$\eta = K_{\text{ιξωδομέτρου}} \cdot t \cdot \rho \quad (3)$$

Όπου,

$\eta$ : το απόλυτο ιξώδες (cP)

$\rho$ : η πυκνότητα του υγρού (g/mL)

$K_{\text{ιξωδομέτρου}}$ : η σταθερά του ιξωδομέτρου ( $\text{mm}^2/\text{s}^2$ )

$t$ : ο χρόνος εκροής (s)

Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας αποτυπώνονται σε διάφορες εκφράσεις ιξώδους, η ονομασία των οποίων εξαρτάται από το σύστημα ορολογίας (Πίνακας 10) [4].

**Πίνακας 10:** Ορολογία για την ιξωδομετρία διαλύματος

Όρος	ISO (IUPAC)	BS 5168
$\nu = \frac{\eta}{\rho} \text{ (cSt)}$	Λόγος ιξώδους-πυκνότητας	Κινηματικό ιξώδες
$RV = \frac{\eta}{\eta_0}$	Λόγος ιξώδους (Viscosity ratio)	Σχετικό ιξώδες (Relative viscosity)
$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = RV - 1$	Σχετική αύξηση ιξώδους	Ειδικό ιξώδες (Specific viscosity)
$\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{C * \eta_0} \text{ (dL/g)}$	Αριθμός ιξώδους	Ανηγμένο ιξώδες (Reduced viscosity)
$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta/\eta_0)}{C} \text{ (dL/g)}$	Λογαριθμικός αριθμός ιξώδους	Συμφυές ιξώδες (Inherent viscosity)
$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} = \eta_{red} \text{ (dL/g)}$	Οριακός αριθμός ιξώδους (Limiting viscosity number)	Εσωτερικό ιξώδες (Intrinsic viscosity)

Όπου,

$\eta$ : το απόλυτο ιξώδες διαλύματος (cP)

$\rho$ : η πυκνότητα (g/mL)

$\eta_0$ : το απόλυτο ιξώδες του διαλύτη

C: η συγκέντρωση του διαλύματος (g/100 mL διαλύτη)

Στην ιξωδομετρία πολυμερών, η Εξίσωση (3) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των διαφόρων εκφράσεων ιξώδους (Πίνακας 10) τόσο του διαλύτη, όσο και του διαλύματος του πολυμερούς, με χρήση των αντίστοιχων χρόνων εκροής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το ίδιο ιξωδόμετρο για τη μέτρηση του χρόνου εκροής του διαλύτη και του διαλύματος, οι υπολογισμοί απλοποιούνται και το σχετικό ιξώδες, για παράδειγμα, υπολογίζεται βάσει της Εξίσωσης (4). Επίσης, όταν το διάλυμα του πολυμερούς είναι αραιό (<1% κ.ο.), γίνεται η θεώρηση ότι οι πυκνότητα του διαλύματος ( $\rho$ ) είναι ίση με αυτή του διαλύτη ( $\rho_0$ ) και η Εξίσωση (4) απλουστεύεται ακόμα περισσότερο στην Εξίσωση (5). Για παράδειγμα:

$$RV = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{K\rho t}{K\rho_0 t_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (4)$$

$$RV = \frac{t}{t_0} \quad (5)$$

Όπου:

$K, K_0$ : οι σταθερές των ιζωδομέτρων για το διάλυμα και το διαλύτη

$\rho, \rho_0$ : οι πυκνότητες του διαλύματος και του διαλύτη

$t, t_0$ : οι χρόνοι εκροής του διαλύματος και του διαλύτη αντίστοιχα [5-7]

Στην παρούσα εργασία, το σχετικό και το ειδικό ιξώδες υπολογίζονται απευθείας από το χρόνο εκροής του διαλύματος πολυμερούς και το χρόνο εκροής του καθαρού διαλύτη αντίστοιχα, καθώς οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο ίδιο ιζωδόμετρο ( $K = K_0$ ) και η πυκνότητα του διαλύματος θεωρείται ίση με αυτή του διαλύτη, λόγω των αραιών διαλυμάτων. Η τιμή του αριθμού ιξώδους, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος τείνει προς το μηδέν σε άπειρη δηλαδή αραιώση, ονομάζεται οριακός αριθμός ιξώδους ή εσωτερικό ιξώδες  $[\eta]$ . Μία καλή εκτίμηση του οριακού αριθμού ιξώδους γίνεται μέσω της εξίσωσης Huggins [Εξίσωση (6)], χρησιμοποιώντας τις μαθηματικές σχέσεις του επόμενου πίνακα, που προκύπτουν από αυτή. Η σταθερά Huggins ( $k_H$ ) θεωρείται ίση με 1/3 ή 3/8 με αποτέλεσμα οι όροι στο δεξί μέλος των Εξισώσεων (Πίνακας 11) μετά το  $[\eta]$  να μηδενίζονται:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C + \dots \quad (6)$$

**Πίνακας 11:** Μαθηματικές σχέσεις για την εκτίμηση του οριακού αριθμού ιξώδους

$\frac{1}{C} \sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_{rel})} = [\eta] + (k_H - 1/3)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{1}{4} \frac{\eta_{sp}}{C} + \frac{3}{4} \frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + (k_H - 3/8)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{1}{3} \frac{\eta_{sp}}{C} + \frac{2}{3} \frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + (k_H - 1/3)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{\eta_{sp}}{C} e^{-\frac{\eta_{sp}}{3}} = [\eta] + (k_H - 1/3)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{(1 + 1.5\eta_{sp})^{1/2} - 1}{0.75C} = [\eta] + (k_H - 3/8)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{(1 + \frac{4}{3}\eta_{sp})^{1/2} - 1}{0.67C} = [\eta] + (k_H - 1/3)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{4}{C} (\eta_{rel}^{\frac{1}{4}} - 1) = [\eta] + (k_H - 3/8)[\eta]^2 C + \dots$
$\frac{3}{C} (\eta_{rel}^{\frac{1}{3}} - 1) = [\eta] + (k_H - 1/3)[\eta]^2 C + \dots$

**Πίνακας 12:** Σταθερές εξίσωσης Mark Houwing- Sakurada για διαφόρους τύπους πολυ(γαλακτικού οξέος)

Υλικό	K (dL/g)(g/mol) <sup>-a</sup>	A	Συνθήκες διάλυσης	Πηγή
PLLA	5.45·10 <sup>-4</sup>	0.730	25°C σε χλωροφόρμιο	[8]
PDLLA	2.21·10 <sup>-4</sup>	0.770	25°C σε χλωροφόρμιο	[8]
PDLLA	1.29·10 <sup>-4</sup>	0.820	25°C σε χλωροφόρμιο	[9]
Γραμμικό PLLA	4.41·10 <sup>-4</sup>	0.720	25°C σε χλωροφόρμιο	[10]
PDLLA	6.06·10 <sup>-4</sup>	0.640	25°C σε χλωροφόρμιο	[11]
PLLA	2.48·10 <sup>-4</sup>	0.770	25°C σε χλωροφόρμιο	[12]
PDLLA	1.33·10 <sup>-4</sup>	0.790	25°C σε χλωροφόρμιο	[12]
PLA	1.31·10 <sup>-4</sup>	0.777	30°C σε χλωροφόρμιο	[13]
PDLLA	2.59·10 <sup>-4</sup>	0.698	35°C σε τετραϋδροφουράνιο	[14]
PLLA (άμορφο)	6.40·10 <sup>-4</sup>	0.680	30°C σε τετραϋδροφουράνιο	[15]
PLLA (ημικρυσταλλικό)	1.00·10 <sup>-3</sup>	0.650	30°C σε τετραϋδροφουράνιο	[15]
PLA	1.74·10 <sup>-4</sup>	0.736	30°C σε τετραϋδροφουράνιο	[13]
PDLLA	2.27·10 <sup>-4</sup>	0.750	30°C σε βενζόλιο	[16]
PLLA	5.72·10 <sup>-4</sup>	0.720	30°C σε βενζόλιο	[11]
PDLLA	1.58·10 <sup>-4</sup>	0.780	25°C σε οξικό αιθυλεστέρα	[17]
PDLLA	1.63·10 <sup>-4</sup>	0.730	25°C σε οξικό αιθυλεστέρα	[17]

Ο οριακός αριθμός ιξώδους συνδέεται με το μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος, μέσω της εξίσωσης Mark-Houwling-Sakurada:

$$[\eta] = K\overline{M}_V^a \quad (7)$$

Όπου,

$K, a$ : σταθερές για ορισμένη θερμοκρασία και σύστημα πολυμερούς-διαλύτη-θερμοκρασίας [4].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι το χλωροφόρμιο, το τετραυδροφουράνιο (THF), το βενζόλιο και ο οξικός αιθυλεστέρας. Τιμές των σταθερών  $K$  και  $a$  για αυτούς τους διαλύτες, σε δεδομένη θερμοκρασία και για διάφορες δομές πολυ(γαλακτικού οξέος) συνοψίζει ο Πίνακας 12.

#### Πειραματική διαδικασία

Οι διατάξεις και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την ιξωδομετρία των διαλυμάτων πολυ(γαλακτικού οξέος) είναι τα εξής:

- ❖ Φούρνος κενού
- ❖ Ξηραντήρας με πεντοξείδιο του φωσφόρου ( $P_2O_5$ )
- ❖ Χλωροφόρμιο
- ❖ Κωνικές φιάλες των 50 ή 100 mL.
- ❖ Ιξωδόμετρο τύπου Ubbelohde σταθεράς  $K= 0.002807 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$ .
- ❖ Λουτρό ελεγχόμενης θερμοκρασίας, όπου εμβαπτίζεται το ιξωδόμετρο.
- ❖ Χρονόμετρο με ικανότητα μέτρησης έως και  $10^{-1}$  seconds.

Η ξήρανση του εκάστοτε δείγματος, πριν τη δημιουργία του διαλύματος, είναι απαραίτητη λόγω της ευαισθησίας του πολυ(γαλακτικού οξέος) στην υδρόλυση. Συνεπώς, ποσότητα περίπου 1 g ξηραίνεται σε κύπελλα αλουμινίου για 5 ώρες στους  $80^\circ \text{C}$  μέσα σε φούρνο κενού με πίεση 400 mbar. Ακολούθως, το δείγμα μεταφέρεται σε ξηραντήρα και αφήνεται να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, ζυγίζονται περίπου 0.05 g από το ξηραμένο δείγμα και διαλύονται σε 25 mL χλωροφορμίου σε κωνική φιάλη, για την παρασκευή διαλύματος 0.2 %



β/ο. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε πλάκα ανάδευσης από 1 έως 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή με ελαφριά θέρμανση στους 35 με 40 °C. Ο χρόνος ανάδευσης και η θερμοκρασία ποικίλλουν ανάλογα με το δείγμα.

Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία, οι μετρήσεις του χρόνου εκροής πραγματοποιούνται στους 30 °C, χρησιμοποιώντας ιξωδόμετρο τριχοειδούς ροής, τύπου Ubbelohde σταθεράς  $K=0.002807 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$ . Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι πριν από κάθε μέτρηση είναι απαραίτητος ο προσεκτικός καθαρισμός του ιξωδομέτρου ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα από προηγούμενα διαλύματα πολυμερούς και τυχόν ακαθαρσίες, όπως σκόνη. Ακολούθως, το προς μέτρηση διάλυμα διηθείται για απομάκρυνση ακαθαρσιών. Έπειτα, εισάγεται στο ιξωδόμετρο και με αναρρόφηση η στάθμη του υγρού φτάνει σε σημείο έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από την άνω χαραγή του ιξωδομέτρου, το οποίο βρίσκεται σε λουτρό 30 °C και στη συνέχεια γίνονται οι πρώτες μετρήσεις. Μετριέται ο χρόνος εκροής του διαλύματος ανάμεσα στις δύο χαραγές του ιξωδομέτρου, οι οποίες φαίνονται στην Εικόνα 15. Επισημαίνεται ότι από κάθε διάλυμα λαμβάνονται 3 μετρήσεις. Η απόκλιση μεταξύ των τριών μετρήσεων δεν πρέπει να ξεπερνά το 2% και τελικά ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο μέσος όρος τους.

Ο προσδιορισμός του οριακού αριθμού ιξώδους  $[\eta]$ , για τα υπό μελέτη συστήματα πολυ(γαλακτικού οξέος)-χλωροφορμίου στους 30 °C, γίνεται μέσω της Εξίσωσης (8), η οποία αποτελεί την απλοποιημένη Εξίσωση (7). Έπειτα υπολογίζεται το μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος με χρήση της εξίσωσης (9), η οποία προκύπτει από την Εξίσωση (7) με κατάλληλη επιλογή των σταθερών.

$$[\eta] = \frac{1}{C} \sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_{red})} \quad (8)$$

$$[\eta] = 0.00013 \cdot 10^{-4} \overline{M}_v^{0.777} \quad (9)$$

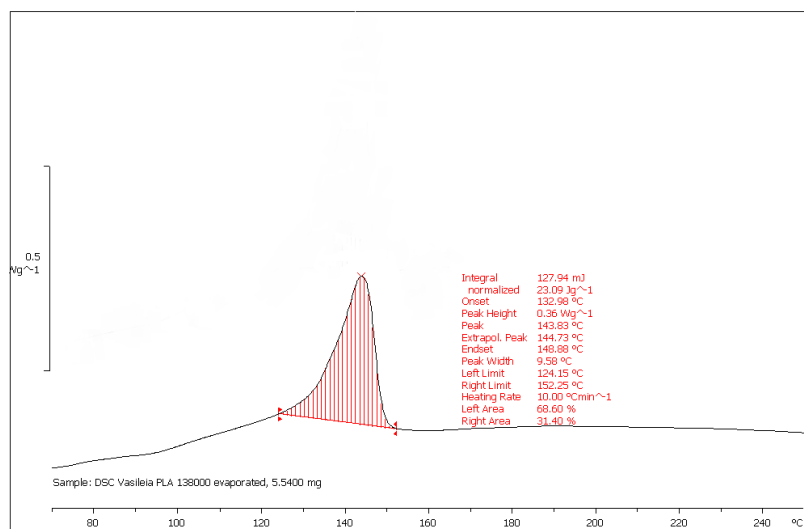
Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούνται οι σταθερές  $K=1.31 \cdot 10^{-4} (\text{dL g}^{-1})(\text{g mol}^{-1})^{-0.777}$  και  $a=0.777$ , όπως φαίνεται από την Εξίσωση (9).

#### 4.5.2 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Για τις συγκεκριμένες αναλύσεις έγινε χρήση της συσκευής Mettler Toledo DSC 1 STARe System (Εικόνα 21). Η διαδικασία μέτρησης των δειγμάτων του πολυ(γαλακτικού οξέος) περιλαμβάνει τη ζύγιση μίας ποσότητας πολυμερούς 5-10 mg, η οποία πρώτα έχει ξηρανθεί (4 ώρες, 50 °C, 400 mbar). Στη συνέχεια η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε κατάλληλο καψίδιο αλουμινίου, το οποίο σφραγίζεται αεροστεγώς και τοποθετείται στον έναν εκ των δύο θερμαινόμενων υποδοχέων του οργάνου.

Το θερμοκρασιακό προφίλ των δοκιμών για το PLA, το ρ-κουμαρικό οξύ και το ρ-μεθοξικιναμικό οξύ κυμάνθηκε μεταξύ 20 °C και 340 °C. Για την περίπτωση των νανοσωματιδίων, τα δείγματα αρχικά θερμάνθηκαν μέχρι τους 80 °C, ακολούθησε ψύξη μέχρι τους 20 °C και τέλος από τους 20 °C θέρμανση έως τους 250 °C, με συνεχή ροή φέροντος αζώτου 20 mL/min και ρυθμούς θέρμανσης/ψύξης 10°C/min. Το αποτέλεσμα της θερμοκρασιακής σάρωσης είναι η εξαγωγή ενός θερμογραφήματος από το οποίο, με τη βοήθεια του λογισμικού που συνοδεύει το όργανο, εξάγονται οι επιθυμητές πληροφορίες ( $T_g$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H_m$ ). Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό κρυσταλλικότητας ενός ημικρυσταλλικού πολυμερούς, γνωρίζοντας την ενθαλπία τήξης του ολοκρυσταλλικού πολυμερούς ( $\Delta H_0$ ), μέσω της σχέσης:

$$x_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_0} * 100\%$$



Εικόνα 20: Παράδειγμα καμπύλης DSC πολυ(γαλακτικού οξέος)



**Εικόνα 21:** Συσκευή Mettler Toledo DSC 1 STARe System

#### 4.5.3 Θερμοβαρουμετρική Ανάλυση (TGA)

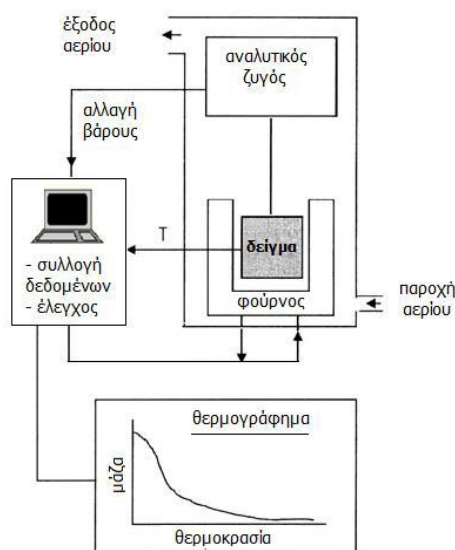
Η θερμοβαρουμετρική ανάλυση είναι μία τεχνική όπου μετράται η μάζα ενός υλικού συναρτήσει της θερμοκρασίας ή του χρόνου, καθώς το δείγμα υπόκειται σε ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, κάτω από ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Η ατμόσφαιρα, ανάλογα με το φέρον αέριο, μπορεί να είναι αδρανής (π.χ. He, N<sub>2</sub>, Ar), οξειδωτική (π.χ. O<sub>2</sub>, αέρας) ή αναγωγική (π.χ. 8-10% H<sub>2</sub> σε N<sub>2</sub>) [19]. Η θερμοβαρουμετρική ανάλυση χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητας ενός υλικού. Επιπλέον, εφαρμόζεται στην παρακολούθηση φαινομένων αποσύνθεσης και οξείδωσης ή την μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων, που εμφανίζονται κατά την θερμική καταπόνηση ενός δείγματος και έχουν σαν συνέπεια μεταβολές στη μάζα του. Επίσης, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις εξάχνωσης, εξάτμισης και εκρόφησης αερίων συστατικών από δείγματα [18,20].

Κατά τη θερμοβαρουμετρική ανάλυση, το υπό εξέταση δείγμα, θερμαίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες (περιβάλλον αερίου, ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας, τελική θερμοκρασία) και καταγράφεται συνεχώς το βάρος του, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Από τα αποτελέσματα είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση (για δυναμική καταπόνηση), το χρόνο που πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση (για ισοθερμοκρασιακή καταπόνηση), την κινητική των αντιδράσεων διάσπασης και τις ποσότητες των σωμάτων που αντέδρασαν. Από τις δύο προαναφερθείσες παρατηρήσεις είναι δυνατόν να εξαχθούν ποιοτικά κυρίως συμπεράσματα, ενώ από τις τελευταίες μπορούν να γίνουν ποσοτικοί υπολογισμοί. Σημαντικές παράμετροι στην θερμοβαρουμετρική 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 [20].

Τα πολυμερή παρουσιάζουν απώλεια μάζας κατά την εφαρμογή της μεθόδου, η οποία μπορεί να οφείλεται στην απώλεια υγρασίας, υπολειμμάτων διαλυτών, χαμηλού μοριακού βάρους προσθέτων ή ολιγομερών, και στην παραγωγή πτητικών προϊόντων διάσπασης [21].

Τα κύρια μέρη ενός σύγχρονου TG αναλυτή είναι ο ζυγός, ο φούρνος και το σύστημα ελέγχου των λειτουργικών παραμέτρων επεξεργασίας δεδομένων (Σχήμα 24). Ο επικρατέστερος μηχανισμός ζύγισης είναι η ζύγιση μηδενικού σημείου. Όταν το δείγμα τοποθετείται στο ζυγό, ο άξονας του ζυγού εκτρέπεται από την αρχική του θέση και η εκτροπή αυτή συλλαμβάνεται από ένα φωτοκύτταρο. Το φωτοκύτταρο ενεργοποιεί έναν ηλεκτρικό κινητήρα για την επαναφορά του άξονα του ζυγού στην ισορροπία και το ρεύμα που καταναλώνεται από τον κινητήρα για την επαναφορά είναι ευθέως ανάλογο της αλλαγής του βάρους. Ο φούρνος κατασκευάζεται συνήθως από χαλαζία (για θερμοκρασίες λειτουργίας έως 1000 °C) ή από πυρίμαχα υλικά (για θερμοκρασίες λειτουργίας έως 1600 °C), όμως, σε κάθε περίπτωση, απαιτείται η παροχή φέροντος αερίου για την απομάκρυνση διαβρωτικών αερίων, που παράγονται κατά την αποδόμηση. Τέλος, ο Η/Υ ελέγχει όλες τις παραμέτρους του οργάνου, επεξεργάζεται και αποθηκεύει όλα τα δεδομένα και αποδίδει το θερμογράφημα.

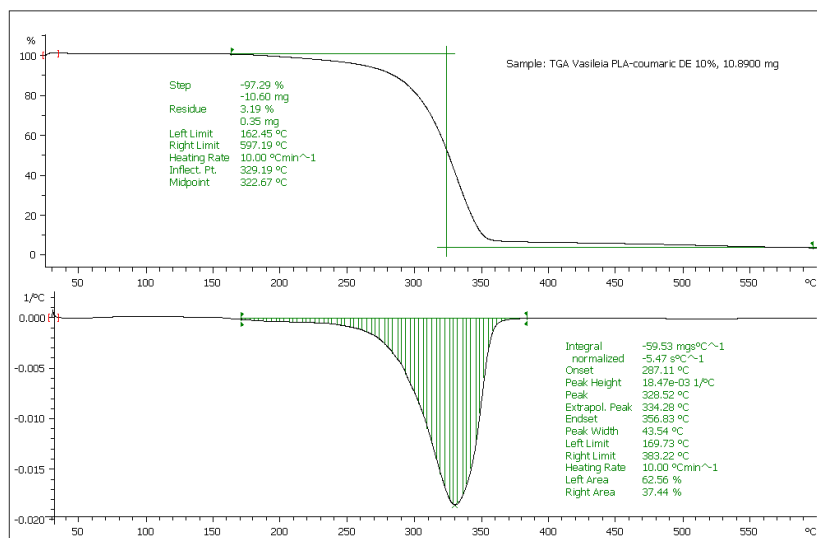


**Σχήμα 24:** Απλοποιημένη διάταξη ενός TG αναλυτή

Τα συμπεράσματα της TGA ανάλυσης βασίζονται στη μελέτη των TG θερμογραφημάτων. Στα γραφήματα αυτά απεικονίζεται η μεταβολή βάρους του δείγματος σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο ανάλυσης του. Ένα σημαντικό εργαλείο για την ερμηνεία αυτών των γραφημάτων είναι η πρώτη παράγωγος της καμπύλης βάρους του θερμοζυγού (DTG). Η φυσική σημασία της πρώτης παραγωγού είναι ο ρυθμός μεταβολής βάρους ενός δείγματος κατά τη θέρμανσή του. Η καμπύλη αυτή βοηθά σημαντικά την ερμηνεία των καμπύλων TG, λύνοντας προβλήματα υπερκαλυπτόμενων θερμικών αντιδράσεων. Από τη μελέτη των γραφημάτων προκύπτουν βασικές πληροφορίες σχετικά με τη θερμική συμπεριφορά ενός υλικού, όπως η θερμοκρασία έναρξης, λήξης και μέγιστου ρυθμού μεταβολής βάρους. Για τον υπολογισμό των θερμοκρασιών έναρξης και λήξης της αντίδρασης που προκαλεί τη μεταβολή βάρους, ακολουθείται μια ειδική διαδικασία που περιγράφεται κατά ASTM ως εξής:

- (i) Προσδιορίζεται το σημείο μέγιστου ρυθμού της αντίδρασης από την DTG καμπύλη.
- (ii) Χαράσσεται εφαπτόμενη γραμμή στην καμπύλη βάρους σε σημείο πριν την έναρξη της αντίδρασης.
- (iii) Χαράσσεται η εφαπτόμενη γραμμή στη καμπύλη βάρους σε σημείο μετά το πέρας της αντίδρασης.
- (iv) Χαράσσεται εφαπτόμενη γραμμή στην καμπύλη βάρους στο σημείο μέγιστου ρυθμού.

Η τομή των εφαπτόμενων γραμμών από τα βήματα ii και iv ορίζουν το σημείο έναρξης της αντίδρασης, και η τομή των εφαπτόμενων γραμμών από τα βήματα iii και iv ορίζουν το πέρας της αντίδρασης [20].



**Εικόνα 22:** Παράδειγμα καμπύλης TGA ενός πολυ(γαλακτικού οξέος)

Οι μετρήσεις γίνονται στο θερμοζυγό Mettler Toledo TGA/DSC 1 STARe System του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών. Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία, τα δείγματα για τις αναλύσεις TGA είναι 5-15 mg, τα οποία πρώτα έχουν ξηρανθεί (4 ώρες, 50 °C). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χωνευτήρια αλούμινας, χωρητικότητας 70 mL, σε ατμόσφαιρα αζώτου. Η ροή αζώτου στο θάλαμο ήταν 10 mL/min. Το θερμοκρασιακό προφίλ των δοκιμών για όλα τα δείγματα κυμάνθηκε μεταξύ 25°C και 600 °C.

Το αποτέλεσμα της θερμοκρασιακής σάρωσης είναι η εξαγωγή ενός θερμογραφήματος από το οποίο, με κατάλληλη επεξεργασία, η οποία έχει περιγραφεί παραπάνω, εξαγονται οι επιθυμητές πληροφορίες, δηλαδή η θερμοκρασία αποικοδόμησης και το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας. Το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας είναι το επί τοις εκατόν κλάσμα της μάζας του δείγματος που έχει παραμείνει στον θερμοζυγό προς την αρχική μάζα του δείγματος:

$$\% \text{ Υπόλειμμα μάζας} = \frac{\text{παρχική}}{\text{πτελικό}} * 100\%$$

#### 4.5.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων, όσον αφορά το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI), πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) σε όργανο Malvern Zetasizer Nano (Εικόνα 23).

Τα δείγματα προς ανάλυση εμβαπτίστηκαν σε λουτρό υπερήχων της εταιρίας Branson (model 2210) για 5 λεπτά για το σπάσιμο τυχόν συσσωματωμάτων των νανοσωματιδίων. Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για ανάλυση DLS, 20 μl από την διασπορά των νανοσωματιδίων κάθε ουσίας, αραιώνονται με 2.98 ml δις-απιονισμένο νερό, αναδεύεται και οδηγείται για μέτρηση η οποία πραγματοποιείται στους  $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η DTS 1060. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις για το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς PDI, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος. Με την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης φωτός προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων.

Η προετοιμασία του δείγματος ακολουθεί την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Για κάθε δείγμα οι μετρήσεις γίνονται τρεις φορές, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος.



**Εικόνα 23:** Όργανο Malvern Zetasizer Nano

#### 4.5.5 Φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis)

Στην φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από 190-800 nm από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Τα ορατά και υπεριώδη φάσματα μιας ένωσης δεν χαρακτηρίζουν το μόριο ως σύνολο, αλλά δίνουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες ατόμων μέσα στο μόριο. Ενώσεις που έχουν αυτές τις ομάδες ατόμων μετριοούνται στη φασματομετρία UV-Vis ποσοτικά με μεγάλη ακρίβεια σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer, ο οποίος δίνεται από την σχέση:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = a \cdot b \cdot c = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου: A η απορρόφηση

T η διαπερατότητα

P<sub>0</sub> η ισχύς της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει στο διάλυμα

P η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα

b το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο διάλυμα

c η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται

a η απορροφητικότητα

ε η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας (ε=α\*ΜΒ)

Στο υπεριώδες φάσμα διακρίνουμε δύο περιοχές: το εγγύς υπεριώδες (400-190nm) και το άπω υπεριώδες (190-110 nm). Όμως, η συνήθης οργανολογία περιορίζεται στο εγγύς υπεριώδες, διότι η ακτινοβολία κάτω από τα 190 nm απορροφάται από τον ατμοσφαιρικό αέρα και από τον χαλαζία από τον οποίο είναι κατασκευασμένες οι κυψελίδες [22].

Η φασματομετρία Υπεριώδους- Ορατού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού των ουσιών είτε με άμεσο τρόπο είτε με έμμεσο. Το όργανο για τις μετρήσεις απεικονίζεται στην Εικόνα 24.





**Εικόνα 24:** φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-M51 της BEL Engineering

#### 4.5.5.1 Έμμεσος προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού (Indirect EE)

Η ικανότητα εγκλεισμού των ουσιών στα νανοσωματίδια (Encapsulation Efficiency, EE) προσδιορίζεται έμμεσα μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μη εγκλεισμένων ουσιών στα υπερκείμενα διαλύματα S1, S2 και S3. Η ποσοτικοποίηση αυτή γίνεται συγκριτικά με την καμπύλης αναφοράς κάθε ουσίας που κατασκευάζεται από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης.

Συνεπώς, η έμμεση απόδοση εγκλεισμού της κάθε δραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια προσδιορίζεται από την σχέση:

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

#### 4.5.5.2 Άμεσος προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού (Direct EE)

Η άμεση απόδοση εγκλεισμού προσδιορίζεται επίσης μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα από τα νανοσωματίδια διαλύεται σε 2 ml διχλωρομεθάνιο ώστε να διαλυθεί το πολυμερές. Στη συνέχεια, εξαμτίζεται το διχλωρομεθάνιο και προστίθεται ο διαλύτης της κάθε ουσίας, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το νερό και για τις δύο ουσίες. Ποσότητα από το διάλυμα αυτό αναλύεται στο UV-Vis, όπου σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη (καμπύλη βαθμονόμησης) προκύπτει η συγκέντρωση της ουσίας στα νανοσωματίδια.

Συνεπώς, η άμεση απόδοση εγκλεισμού της κάθε δραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια προσδιορίζεται από την σχέση:

$$Direct EE \% = \frac{Ποσότητα\ ουσίας\ στα\ NPs\ (mg)}{αρχική\ ποσότητα\ ουσίας\ (mg)} * 100\%$$

#### 4.6 Βιβλιογραφικές Αναφορές

- [1] ASTM D 2857-70. Dilute Solution viscosity of polymers
- [2] Α. Δ. Ντόντος, 'Συνθετικά μακρομόρια, Βασική θεώρηση', 2002
- [3] Π. Θεοδούλου, 'Μελέτη πολυμερισμού στερεάς κατάστασης Πολυ(γαλακτικού οξέος), Διπλωματική Εργασία, Ε.Μ.Π. 2012
- [4] Εργαστηριακός Οδηγός μαθήματος «Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών Ι», Αθήνα 2009
- [5] R. Brown, 'Handbook of plastics test methods', London 1981
- [6] R. Young, P. Lovell, 'Introduction to polymers', London 1991
- [7] A. Jenkins, 'Polymer Science: A material Science Handbook', New York 1972
- [8] H. Tsuji, Y. Ikada, 'Blends of aliphatic polyesters, I. Physical properties and morphologies of solution-cast blends from poly(DL-lactide) and poly( $\epsilon$  caprolactone), Journal of Applied Polymer Science, 1996; 60: 2367-2375
- [9] J. Huang, M. S. Lisowski, J. Runt, E. Hall, R. Kean, N. Buehler, J. S. Lin, 'Crystallization and Microstructure of Poly(l-lactide-co-meso-lactide) copolymers', Macromolecular Bioscience, 1998; 31: 2593-2599
- [10] Y. Doi, K. Fukuda, 'Biodegradable plastics and polymers', New York 1994
- [11] A. Schindler, D. Harper, 'Polylactide. II Viscosity-molecular weight relationships and underturbed chain dimensions', Journal of Polymer Science, 1979; 17
- [12] P. Van de Witte, P. J. Dijkstra, J. W. A. Van de Berg, J. Feijen, 'Phase behavior of Polylactides in solvent-non solvent mixtures', Journal of Polymer Science, 1996; 34: 2553-2568
- [13] J. R. Dorgan, J. Janzen, D. M. Knauss, S. B. Hait, B. R. Limoges, M. H. Hutchinson, 'Fundamental Solution and Single-chain Properties of Polylactides', Journal of Polymer Science, 2005; 43: 3100-3111
- [14] J. Van Dijk, J. Smit, F. Kohn, J. Feijen, 'Characterization of Poly(DL-Lactic Acid) by gel permeation Chromatography', Journal of Polymer Science, 1983; 21: 197-208
- [15] M. Spinu, C. Jackson, M. Keating, K. Gardner, 'Material design of Poly(lactic acid) system: Block copolymers, star homo- and copolymers and stereocomplexes', Journal of Macromolecular Science, 1996; 33: 1497-1530

- [16] A. P. Gupta, V. Kumar, 'New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-Polylactide: A critique', *European Polymer Journal*, 2007; 43: 4053-4074
- [17] K. Xu, A. Kozluca, E. Denkbas, E. Piskin, 'Synthesis of PDLLA homopolymers with different molecular weights', *Journal of Applied Polymer Science*, 1996; 59: 561-563
- [18] Σ. Βουγιούκα, 'Αριστοποίηση Ιδιοτήτων Πολυαμιδικών ρητινών με Τεχνολογία Πολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης', Διδακτορική Διατριβή, Ε.Μ.Π., Αθήνα 2004
- [19] G. Brauer, 'Chemical analysis', *Encyclopedia of polymer science and technology*, 1965
- [20] Α. Παππά, 'Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης: Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρία μάζας', Ε.Μ.Π., Αθήνα 2004
- [21] J. D. Menczel, R. B. Prime, 'Thermal Analysis of polymers, Fundamentals and Application', 2009
- [22] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, 'Φυσικές μέθοδοι Ανάλυσης: Φασματομετρικές Μέθοδοι', 2012

# Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και συζήτηση χαρακτηρισμού φυσικών μειγμάτων μέσω θερμικής ανάλυσης

## 5.1 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού δειγμάτων πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA)

Τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική ήταν το Δείγμα Α με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ , το Δείγμα Β με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$  και το Δείγμα Γ με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 210000 \text{ g/mol}$ .

Στα συγκεκριμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλύσεις Ιξωδομετρίας και Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 13 και 14:

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα αναλύσεων Ιξωδομετρίας

Δείγμα	$[\eta]$ (dL/g)	$\overline{M}_v$ (g/mol)
A	$0.553 \pm 0.002$	41608
B	$1.293 \pm 0.039$	138251
Γ	$1.850 \pm 0.108$	209784

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα DSC

Δείγμα	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$X_c$ (%)
A	56	143.7	28.9	31.0
B	56.6	143.8	23.1	24.8
Γ	-	155.9	26.3	28.2

Όσο αφορά στις θερμικές ιδιότητες, και τα τρία δείγματα είναι ημικρυσταλλικά υλικά με  $\Delta H_m$  από 23.1 έως 28.9 J/g, με αντίστοιχη κατά μάζα κρυσταλλικότητα από 24.8 % έως 31.0 %. Η ενθαλπία κρυστάλλωσης ολοκρυσταλλικού PLA είναι  $\Delta H_0 = 93.1 \text{ J/g}$ . Παρουσιάζουν σημεία υαλώδους έως 56 °C, ενώ το δείγμα Γ δεν εμφάνισε σημείο υαλώδους μετάπτωσης.

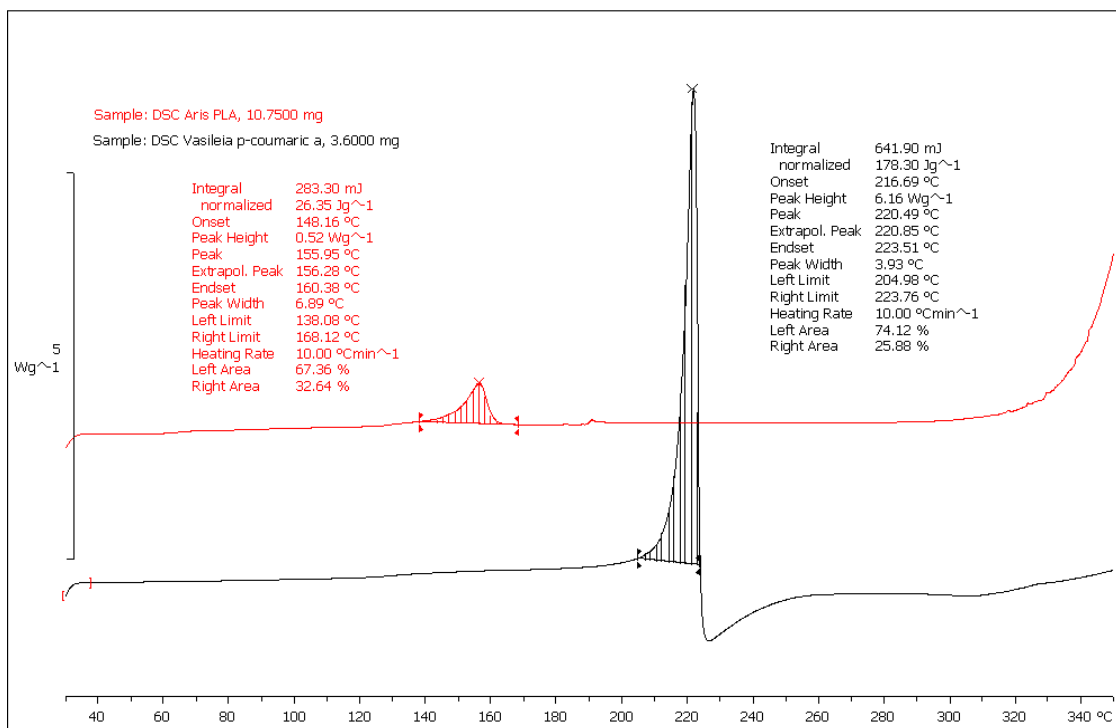
## 5.2 Επιλογή τεχνικής παρασκευής φυσικών μειγμάτων δραστικής ουσίας και PLA

Για την επιλογή της μεθόδου παρασκευής των φυσικών μειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Δείγμα Γ με μέσου-ιξώδους μοριακό βάρος  $\overline{M}_v = 210000$  g/mol και το p-κουμαρικό οξύ σε περιεκτικότητα 23%. Η περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας στο φυσικό μείγμα δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Περιεκτικότητα δραστικής ουσίας \%} = \frac{\text{μάζα ουσίας (mg)}}{\text{μάζα ουσίας} + \text{μάζα πολυμερούς (mg)}} * 100\%$$

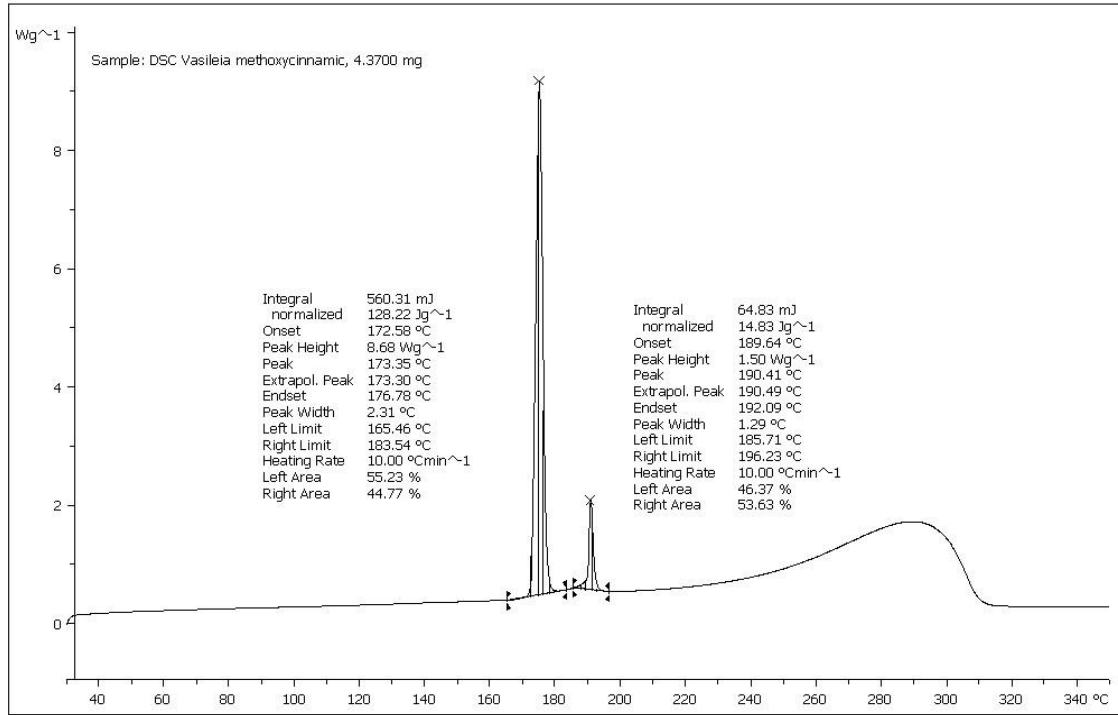
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.2 εξετάστηκαν τρεις τεχνικές παρασκευής, καθώς στην βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί ο ακριβής τρόπος παρασκευής φυσικών μειγμάτων. Η επιλογή της τεχνικής βασίζεται στην πιο ομοιόμορφη ανάμειξη της δραστικής ουσίας με το πολυμερές, με στόχο να αντιστοιχεί το φυσικό μείγμα στο σύστημα των νανοσφαιριδίων. Για το λόγο αυτό, στόχος είναι η κορυφή τήξης της ουσίας στο μείγμα να είναι συνάρτηση της συγκέντρωσής της και όχι τόσο έντονη όσο στην καθαρή μορφή της. Δηλαδή, θα πρέπει να παρατηρηθεί διαφοροποίηση στην ενθαλπία τήξης της ουσίας στο φυσικό μείγμα από την ενθαλπία τήξης της ουσίας σε καθαρή μορφή.

Στο Σχήμα 25 φαίνεται το γράφημα από την ανάλυση DSC για το Δείγμα Γ και το p-κουμαρικό οξύ, στο Σχήμα 26 για το p-μεθοξικιναμικό οξύ, ενώ στο Σχήμα 27 φαίνονται οι αναλύσεις των τριών μεθόδων παρασκευής.



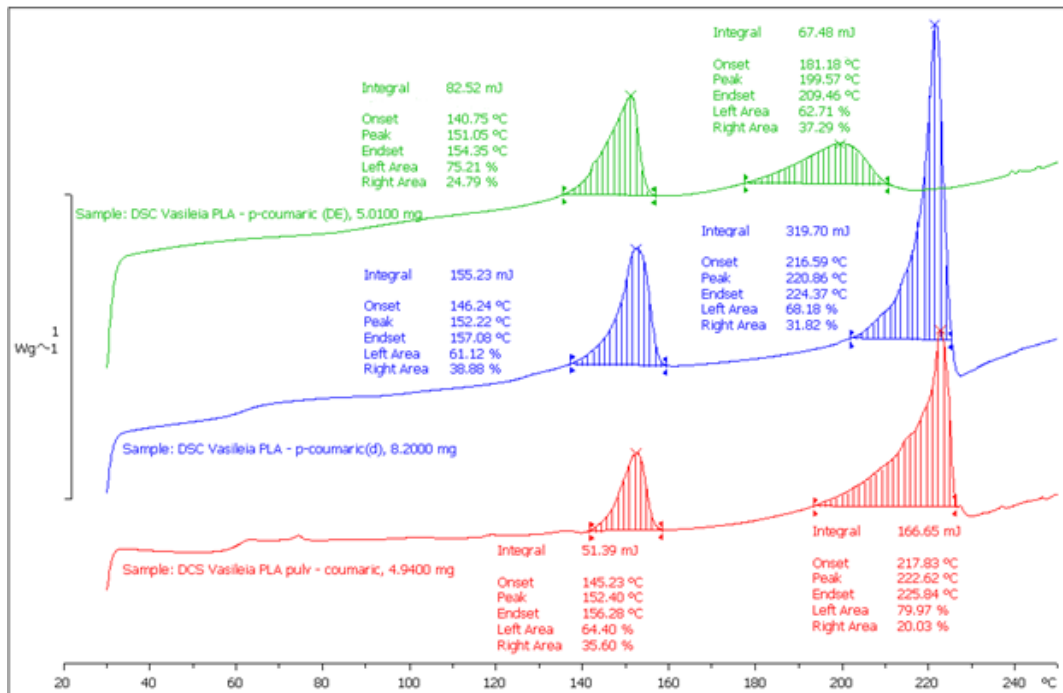
Σχήμα 25: Καμπύλη DSC για το Δείγμα Γ και το p-κουμαρικό οξύ

Στο Σχήμα 25 η κόκκινη καμπύλη αναφέρεται στο πολυμερές όπου παρατηρούμε θερμοκρασία τήξης  $T_m = 156.0 \text{ }^\circ\text{C}$  και ενθαλπία τήξης  $\Delta H_m = 26.35 \text{ J/g}$ . Η μαύρη καμπύλη αναφέρεται στο p-κουμαρικό οξύ με θερμοκρασία τήξης  $T_m = 220.5 \text{ }^\circ\text{C}$  και ενθαλπία τήξης  $\Delta H_m = 178.3 \text{ J/g}$ . Παρατηρούμε ότι η τήξη του p-κουμαρικού οξέος και του p-μεθοξυκιναμικού οξέος (Σχήμα 26) έπονται της τήξης του PLA.



Σχήμα 26: Καμπύλη DSC για το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ

Στο Σχήμα 26 παρουσιάζεται η ανάλυση DSC για το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ, όπου παρατηρούνται δύο περιοχές κρυσταλλικών περιοχών με κύρια θερμοκρασία τήξης  $T_m=173.4^{\circ}\text{C}$  και ενθαλπία τήξης  $\Delta H_m = 128.22 \text{ J/g}$ .

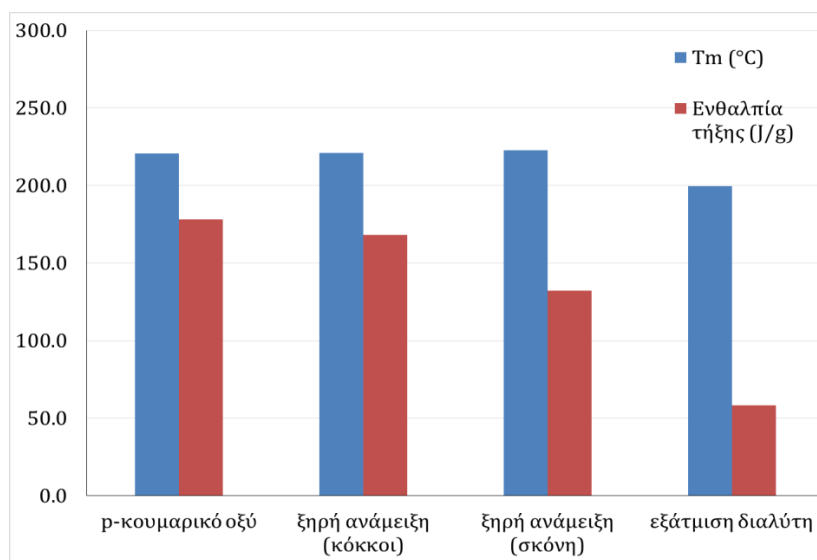


Σχήμα 27: Καμπύλη DSC για τις τρεις τεχνικές παρασκευής των φυσικών μειγμάτων



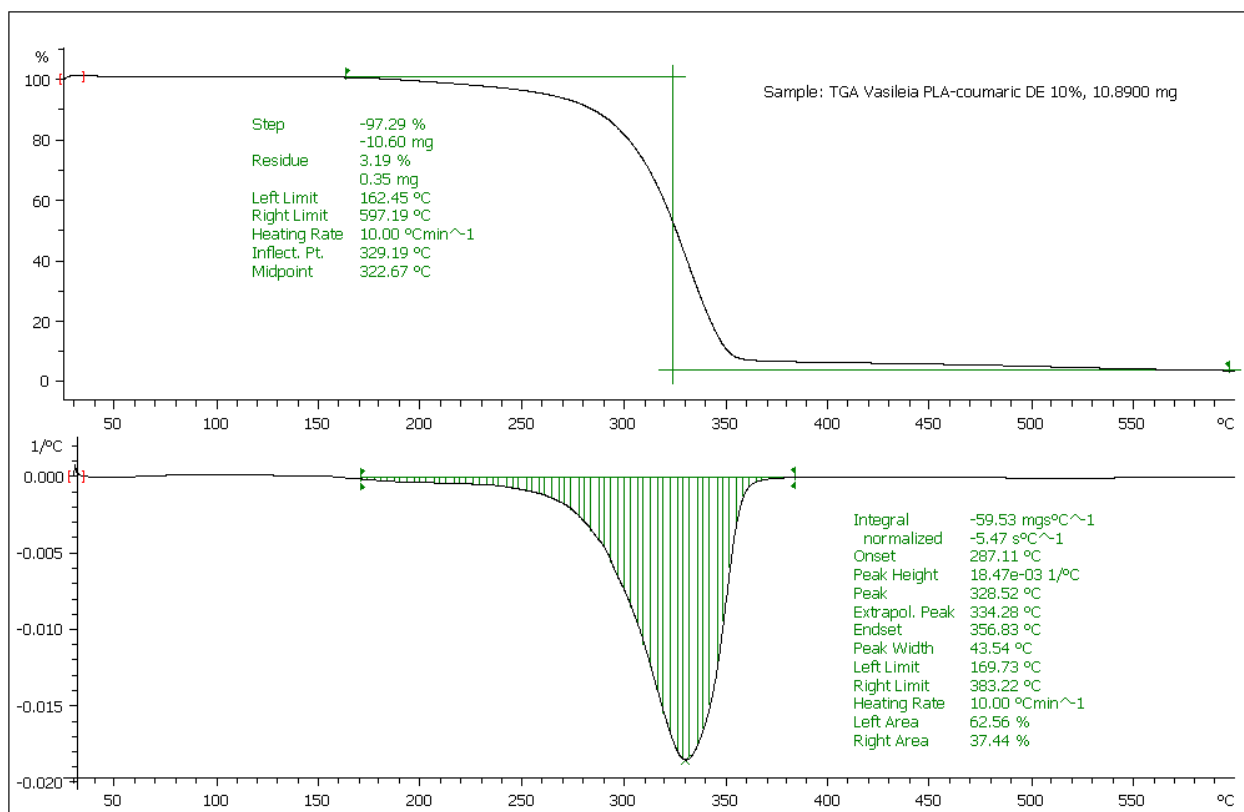
Στο Σχήμα 27 παρουσιάζονται οι τρεις τεχνικές παρασκευής φυσικών μειγμάτων. Η μπλε καμπύλη αναφέρεται στην Τεχνική 1 (πολυμερές σε μορφή κυλινδρικών κόκκων), η κόκκινη καμπύλη στην Τεχνική 2 (πολυμερές σε μορφή σκόνης) και η πράσινη καμπύλη στην Τεχνική 3 (εξάτμιση διαλύτη). Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των φυσικών μειγμάτων δεν λαμβάνονται οι τιμές του οργάνου για την κανονικοποιημένη ενθαλπία τήξης του πολυμερούς και της ουσίας, καθώς δεν είναι η πραγματική. Η κανονικοποίηση γίνεται με βάση τις ποσότητες των πρώτων υλών για την παρασκευή του φυσικού μείγματος και την τιμή του οργάνου για την ολική ενθαλπία. Έτσι, στα αντίστοιχα γραφήματα δεν εμφανίζονται οι κανονικοποιημένες (normalized) ενθαλπίες, αλλά υπολογίζονται.

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης και της ενθαλπίας τήξης του *p*-κουμαρικού οξέος για τις τρεις τεχνικές παρασκευής. Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη διαφοροποίηση συμβαίνει με την τεχνική 3, δηλαδή με την διάλυση-καταβύθιση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ομοιόμορφη ανάμειξη της ουσίας και του πολυμερούς και επομένως την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων που μεταβάλλουν τη συμπεριφορά της ουσίας σε μείγμα κατά την τήξη σε σχέση με την καθαρή μορφή της και η ενθαλπία τήξης αποτελεί πλέον συνάρτηση της συγκέντρωσής μέσα στο μείγμα. Παρατηρείται ότι η αμέσως καλύτερη τεχνική είναι η ξηρή ανάμειξη όπου το πολυμερές είναι σε μορφή σκόνης (Τεχνική 2), ενώ η χειρότερη είναι η τεχνική 1, όπως αναμενόταν.



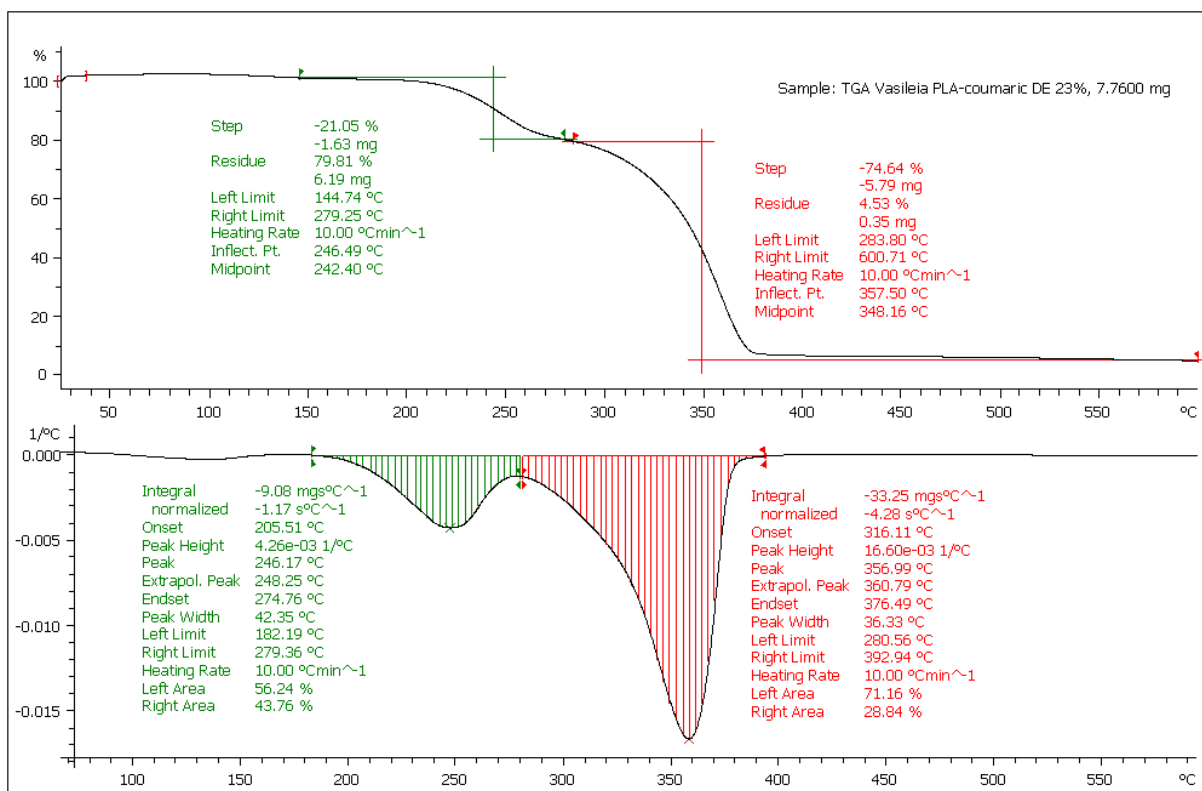
**Διάγραμμα 2:** Σύγκριση τιμών ενθαλπίας και θερμοκρασίας τήξης για τις τρεις τεχνικές

Η επιλογή της 3<sup>ης</sup> Τεχνικής ακολουθείται και από ποσοτική επιβεβαίωση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στο φυσικό μείγμα που παρασκευάστηκε με την τεχνική αυτή. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις TGA στα φυσικά μείγματα ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Γ σε περιεκτικότητα ουσίας 10, 20, 30, 40 και 50%.



**Σχήμα 28:** Καμπύλη TGA φυσικού μείγματος περιεκτικότητας ρ-κουμαρικού οξέος 10 %

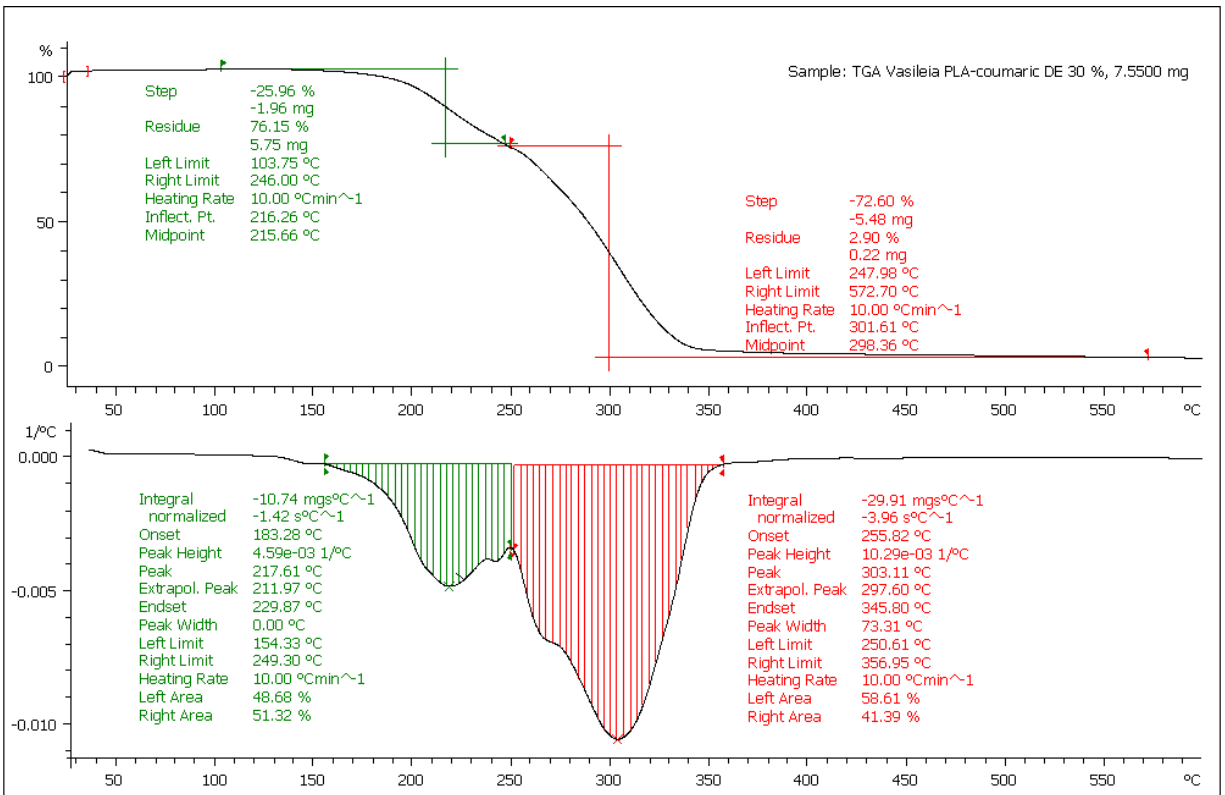
Στο Σχήμα 28, η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σε ένα στάδιο, χωρίς να είναι δυνατή η ανίχνευση του ρ-κουμαρικού οξέος ως ένα επιπλέον στάδιο αποικοδόμησης. Το υπόλειμμα της αποικοδόμησης είναι το 3.19 % και το μέγιστο της αποικοδόμησης εμφανίζεται στη θερμοκρασία 328.5 °C. Σημειώνεται ότι σε κάθε Σχήμα από αυτά που παρουσιάζουν αποτελέσματα TGA, υπάρχουν δύο διαγράμματα. Το πρώτο, αντιστοιχεί στην καθαυτό καμπύλη TGA και σε αυτό σημειώνεται η ποσοστιαία απώλεια μάζας και το υπόλειμμα μάζας του υλικού. Το δεύτερο παρουσιάζει το κομμάτι εκείνο της πρώτης παραγώγου της καμπύλης που αντιστοιχεί στην αποσύνθεση του υλικού. Σε αυτό σημειώνεται η θερμοκρασία αποικοδόμησης (T<sub>d</sub>) του δείγματος.



**Σχήμα 29:** Καμπύλη TGA φυσικού μείγματος περιεκτικότητας ρ-κουμαρικού οξέος 23 %

Στο Σχήμα 29 η αποικοδόμηση γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του ρ-κουμαρικού οξέος με υπόλειμμα αποικοδόμησης 79.81 % και μέγιστη θερμοκρασία 246.2 °C. Το δεύτερο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του PLA με υπόλειμμα 4.53 % και μέγιστη θερμοκρασία 357.0 °C.

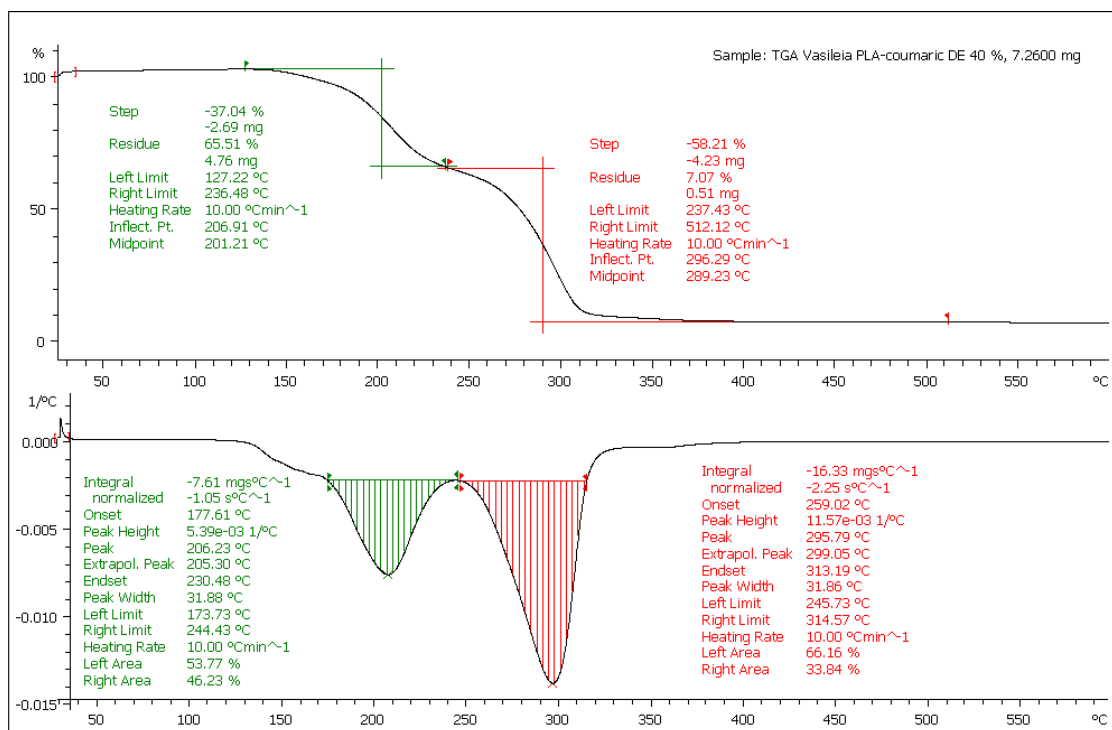
Αντίστοιχα, στο Σχήμα 30 η αποικοδόμηση γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του ρ-κουμαρικού οξέος με υπόλειμμα αποικοδόμησης 76.15 % και μέγιστη θερμοκρασία 217.6 °C. Το δεύτερο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του PLA με υπόλειμμα 2.9 % και μέγιστη θερμοκρασία 303.1°C.



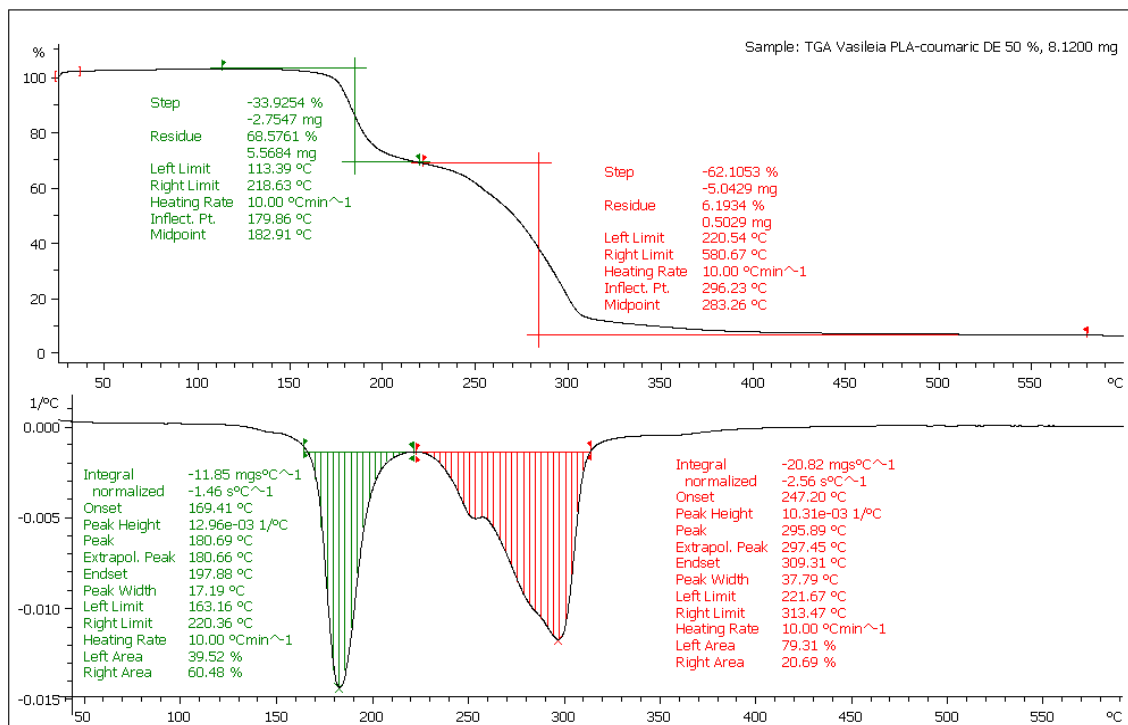
**Σχήμα 30:** Καμπύλη TGA φυσικού μείγματος περιεκτικότητας p-κουμαρικού οξέος 30 %

Στο Σχήμα 31 η αποικοδόμηση γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του p-κουμαρικού οξέος με υπόλειμμα 65.51 % και μέγιστη θερμοκρασία 206.2°C. Το δεύτερο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του PLA με υπόλειμμα 7.07 % και μέγιστη θερμοκρασία 295.8 °C.

Στο Σχήμα 32 η αποικοδόμηση γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του p-κουμαρικού οξέος με υπόλειμμα 68.57 % και μέγιστη θερμοκρασία 180.7 °C. Το δεύτερο στάδιο αφορά στην αποικοδόμηση του PLA με υπόλειμμα αποικοδόμησης 6.19 % και μέγιστη θερμοκρασία 295.9 °C.



Σχήμα 31: Καμπύλη TGA φυσικού μείγματος περιεκτικότητας ρ-κουμαρικού οξέος 40 %



Σχήμα 32: Καμπύλη TGA φυσικού μείγματος περιεκτικότητας ρ-κουμαρικού οξέος 50 %

Στις περιπτώσεις όπου εντοπίστηκαν τα δύο στάδια της αποικοδόμησης, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της πραγματικής συγκέντρωσης του *p*-κουμαρικού οξέος στα φυσικά μείγματα, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα της τεχνικής ανάμειξης. Πιο συγκεκριμένα, από το σχετικό λόγο των εμβαδών των δυο κορυφών του διαγράμματος της πρώτης παραγώγου προκύπτει ο Πίνακας 15. Παρατηρείται ότι η ονομαστική συγκέντρωση και η πραγματική συγκέντρωση που υπολογίστηκε μέσω της TGA ανάλυσης, έχουν μικρές αποκλίσεις, καθιστώντας την τεχνική ανάμειξης 3 κατάλληλη για παρασκευή των φυσικών μειγμάτων.

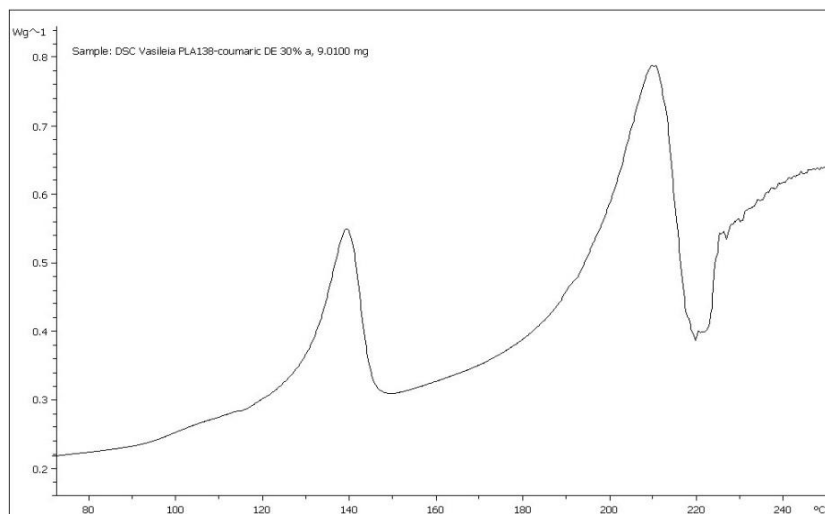
**Πίνακας 15:** Πραγματική συγκέντρωση ουσίας στα φυσικά μείγματα από την θερμοβαρυμετρική ανάλυση

<b>Φυσικά Μείγματα <i>p</i>-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Γ</b>	
<b>Ονομαστική συγκέντρωση ουσίας (%)</b>	<b>Πραγματική συγκέντρωση ουσίας (%)</b>
10	0
23	27
30	35
40	46
50	56

### 5.3 Προσδιορισμός διαλυτότητας/αναμειξιμότητας δραστικών ουσιών και πολυ(γαλακτικού οξέος)

Έχοντας επιλέξει τεχνική παρασκευής των φυσικών μειγμάτων και έχοντας απορρίψει το Δείγμα Γ λόγω μειωμένης διαλυτότητας στο διαλύτη εγκλεισμού, τα πειράματα συνεχίστηκαν για το Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ ), το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ ) και τις δύο δραστικές ουσίες. Σκοπός είναι για κάθε συνδυασμό πολυμερούς και δραστικής ουσίας να υπολογίσουμε την μέγιστη αναμειξιμότητα μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης.

Για όλα τα φυσικά μείγματα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις, από όπου εξάχθηκε ο μέσος όρος για την ενθαλπία τήξης της ουσίας. Κάθε φορά επιλεγόταν δείγμα από διαφορετικό σημείο του φυσικού μείγματος (Εικόνα 14). Κάποια δείγματα παρουσίασαν προβληματική συμπεριφορά η οποία μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ίχνων χλωροφορμίου ή ακαθαρσιών (Σχήμα 33).



**Σχήμα 33:** Παράδειγμα προβληματικού δείγματος DSC

### 5.3.1 Φυσικά μείγματα p-κουμαρικού οξέος

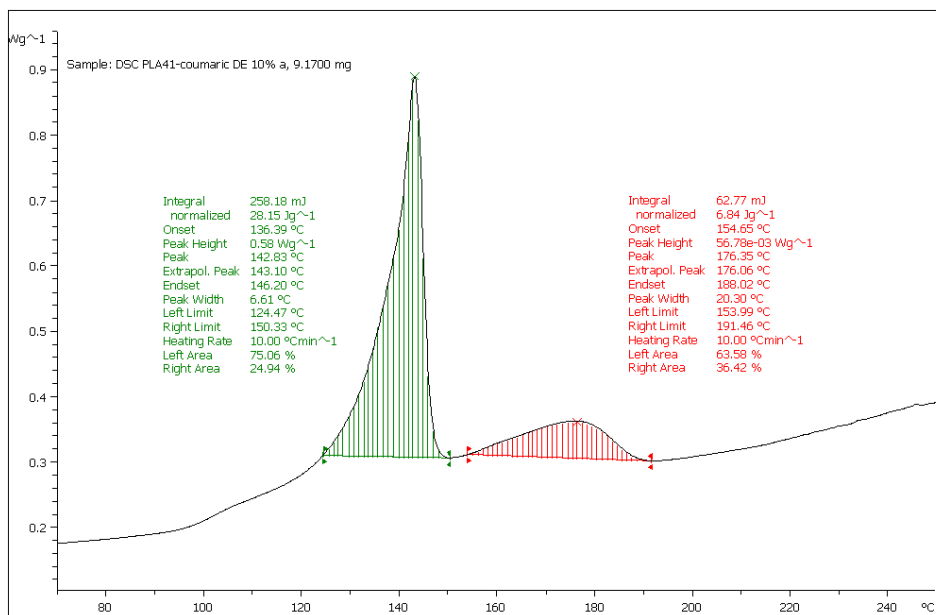
Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φυσικών μειγμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 16 και 17. Τα γραφήματα από την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α.

**Πίνακας 16:** Αποτελέσματα DSC των φυσικών μειγμάτων με το Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ )

Περιεκτικότητα Φυσικού μείγματος (%)	Ενθαλπία τήξης ουσίας $\Delta H_m$ (J/g)
10 %	$70.21 \pm 1.68$
20%	$125.58 \pm 3.46$
30%	$132.5 \pm 1.39$
40%	147.25
50%	$187.79 \pm 5.8$

**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα DSC των φυσικών μειγμάτων με το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ )

Περιεκτικότητα Φυσικού μείγματος (%)	Ενθαλπία τήξης ουσίας $\Delta H_m$ (J/g)
10 %	$47.51 \pm 2$
20%	$102.31 \pm 5.63$
30%	$125.92 \pm 4.89$
40%	137.22
50%	$158.70 \pm 10.43$



**Σχήμα 33:** Ενδεικτικό γράφημα DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος περιεκτικότητας 10%

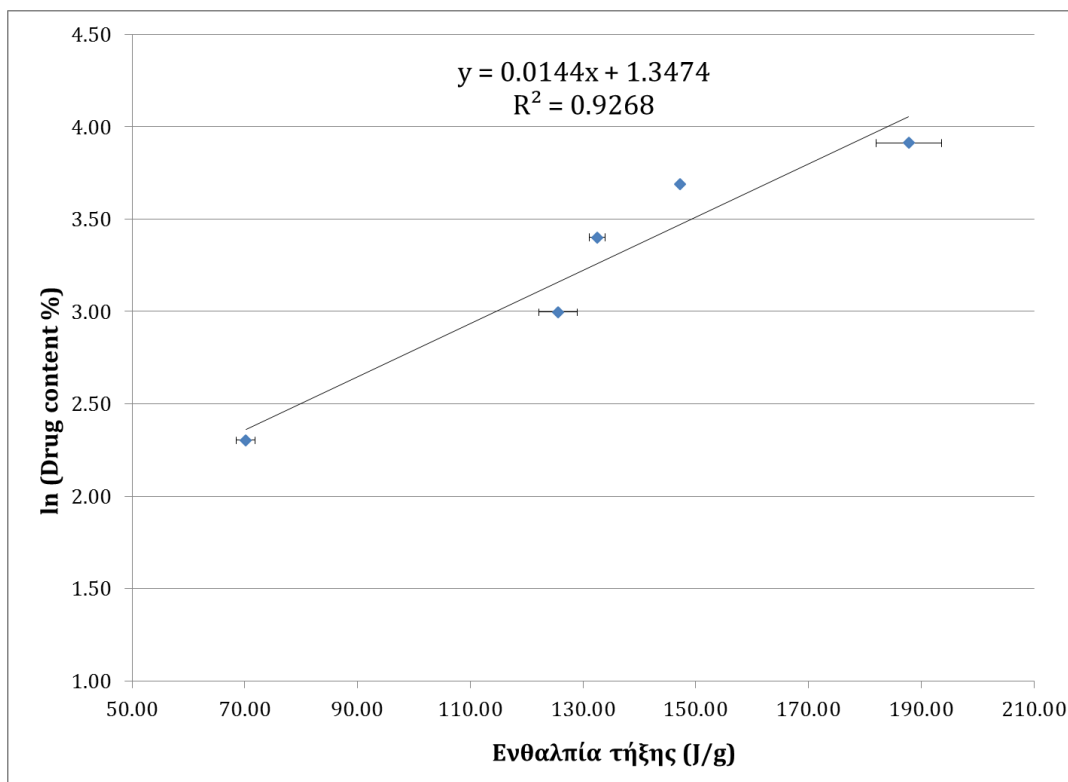
Στη συνέχεια συσχετίζονται οι ενθαλπίες τήξης της ουσίας με την περιεκτικότητά της στο κάθε φυσικό μείγμα, εφαρμόζοντας κατάλληλη σχέση, όπου ο φυσικός λογάριθμος της περιεκτικότητας της ουσίας αναπαρίσταται συναρτήσει της ενθαλπίας τήξης της ουσίας, σύμφωνα με τους Bragagni, 2012 και Theeweus, 1974 μέσω της σχέσης:

$$\ln(\text{περιεκτικότητα ουσίας \%}) = \alpha \cdot \text{Ενθαλπία τήξης} + \beta$$

Όπου α: κλίση ευθείας και β: αποτέμνουσα ευθείας

Σύμφωνα με την έρευνα των Bragagni et al., το R<sup>2</sup> των γραφημάτων αυτών κυμαινόταν από 0.789 έως 0.881. Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε R<sup>2</sup> από 0.9268 έως 0.9892, όπως θα φανεί ακολούθως και επομένως αυτό υποδεικνύει ότι υπήρξε ικανοποιητική προσαρμογή των δεδομένων στην ανωτέρω εξίσωση.



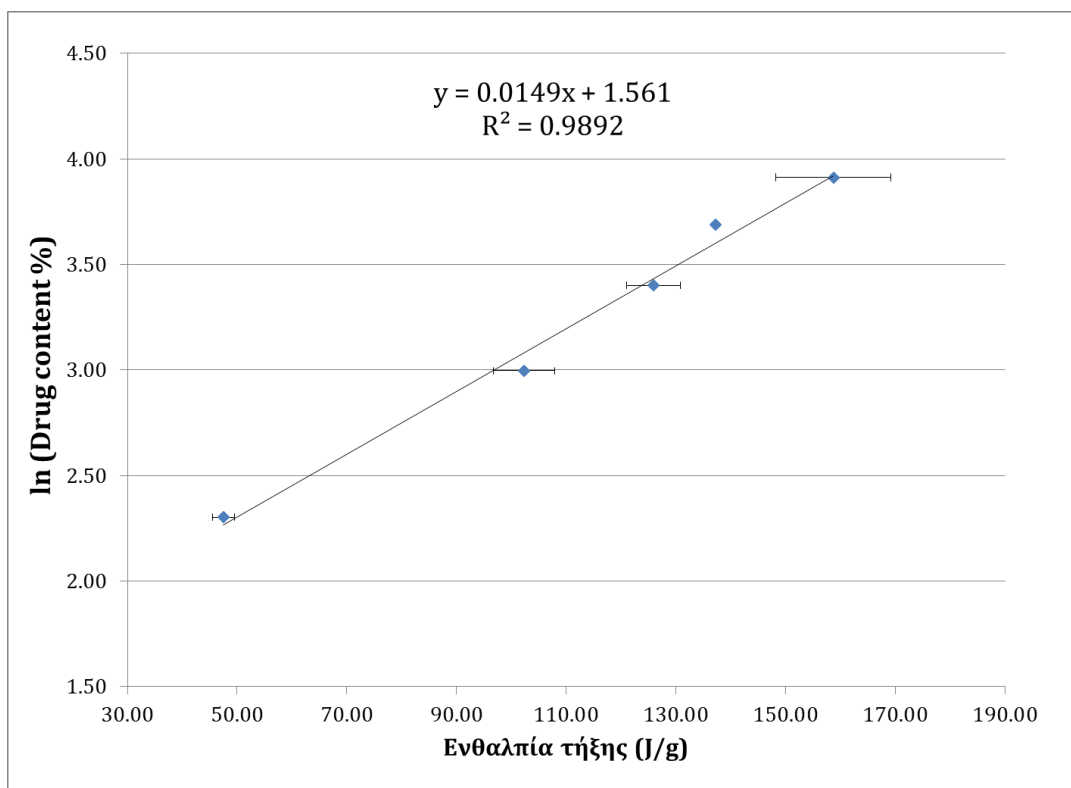


**Διάγραμμα 3:** Συγκέντρωση p-κουμαρικού οξέος στα φυσικά μείγματα με το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol), σε συνάρτηση με την ενθαλπία τήξης

Η αποτέμνουσα της ευθείας αντιστοιχεί στο σημείο μηδενικής ενθαλπίας τήξης. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση του p-κουμαρικού οξέος σε αυτό το σημείο, είναι η μέγιστη συγκέντρωση όπου τα δύο υλικά είναι πλήρως αναμειγμένα. Το πολυμερές διαλυτοποιεί την ουσία και άρα δεν υφίσταται η έννοια της «τήξης» της δραστικής ουσίας.

Άρα,

$$\text{μέγιστη αναμειξιμότητα με το Δείγμα A} = \exp(1.3474) = 3.847\%$$



**Διάγραμμα 4:** Συγκέντρωση p-κουμαρικού οξέος στα φυσικά μείγματα με το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol), σε συνάρτηση με την ενθαλπία τήξης

Αντίστοιχα με παραπάνω υπολογίζεται η μέγιστη αναμειξιμότητα των δύο υλικών από την αποτέμνουσα. Άρα,

$$\text{μέγιστη αναμειξιμότητα με το Δείγμα Β} = \exp(1.561) = 4.763 \%$$

### 5.3.2 Φυσικά μείγματα p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φυσικών μειγμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 18 και 19. Τα γραφήματα από την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β.

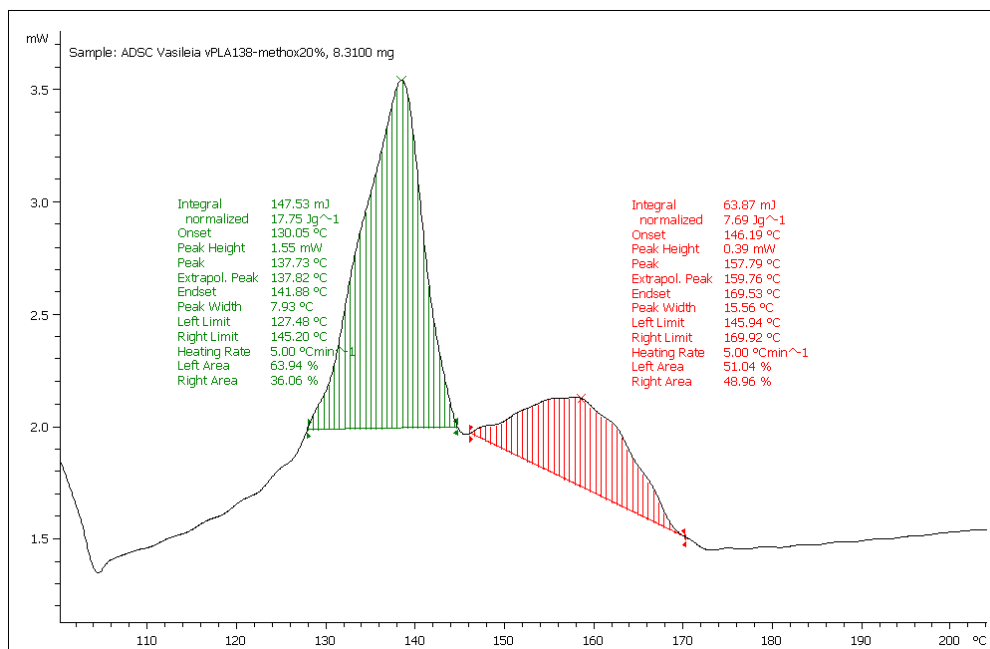
Στο Σχήμα 34 παρουσιάζεται ένα γράφημα DSC για τα φυσικά μείγματα του p-μεθοξυκιναμικού οξέος, όπου παρουσιάζονται οι επικαλυπτόμενες κορυφές της τήξης του πολυ(γαλακτικού οξέος) και του p-μεθοξυκιναμικού οξέος. Έτσι, κρίθηκε απαραίτητο να εφαρμοστεί η Εναλασσόμενη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (ADSC) για να διαχωριστούν τα φαινόμενα.

**Πίνακας 18:** Αποτελέσματα DSC των φυσικών μειγμάτων με το Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol)

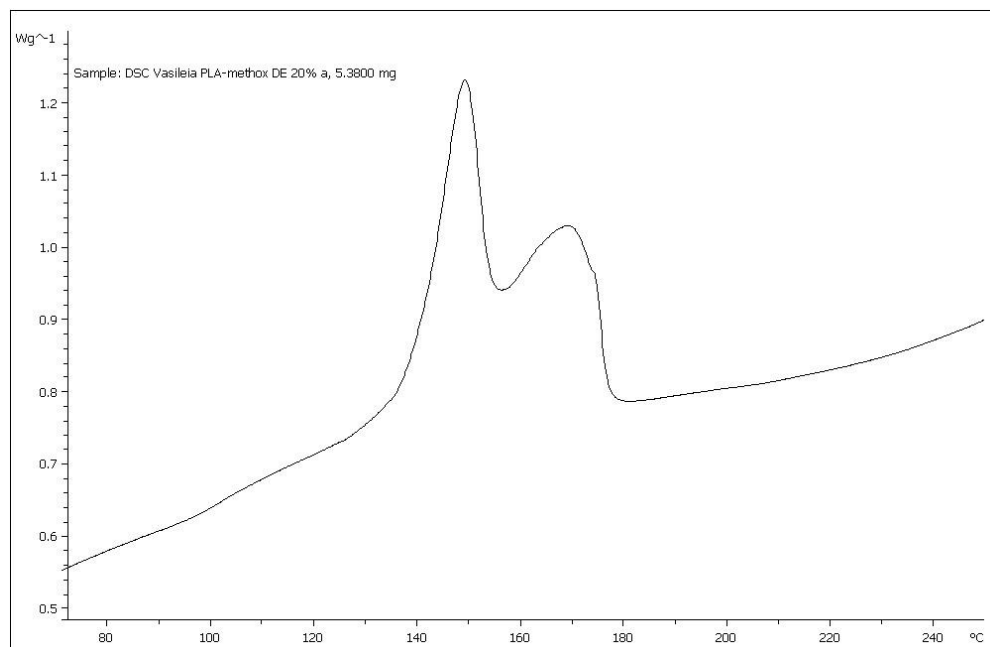
Περιεκτικότητα Φυσικού μείγματος (%)	Ενθαλπία τήξης ουσίας $\Delta H_m$ (J/g)
10 %	0
20%	$87.48 \pm 4.85$
30%	118.67
40%	$133.58 \pm 3.23$
50%	$150.26 \pm 2.48$

**Πίνακας 19:** Αποτελέσματα DSC των φυσικών μειγμάτων με το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol)

Περιεκτικότητα Φυσικού μείγματος (%)	Ενθαλπία τήξης ουσίας $\Delta H_m$ (J/g)
10 %	0
20%	$38.44 \pm 2.17$
30%	$102.27 \pm 4.63$
40%	$117.01 \pm 1.22$
50%	$126.71 \pm 3.88$

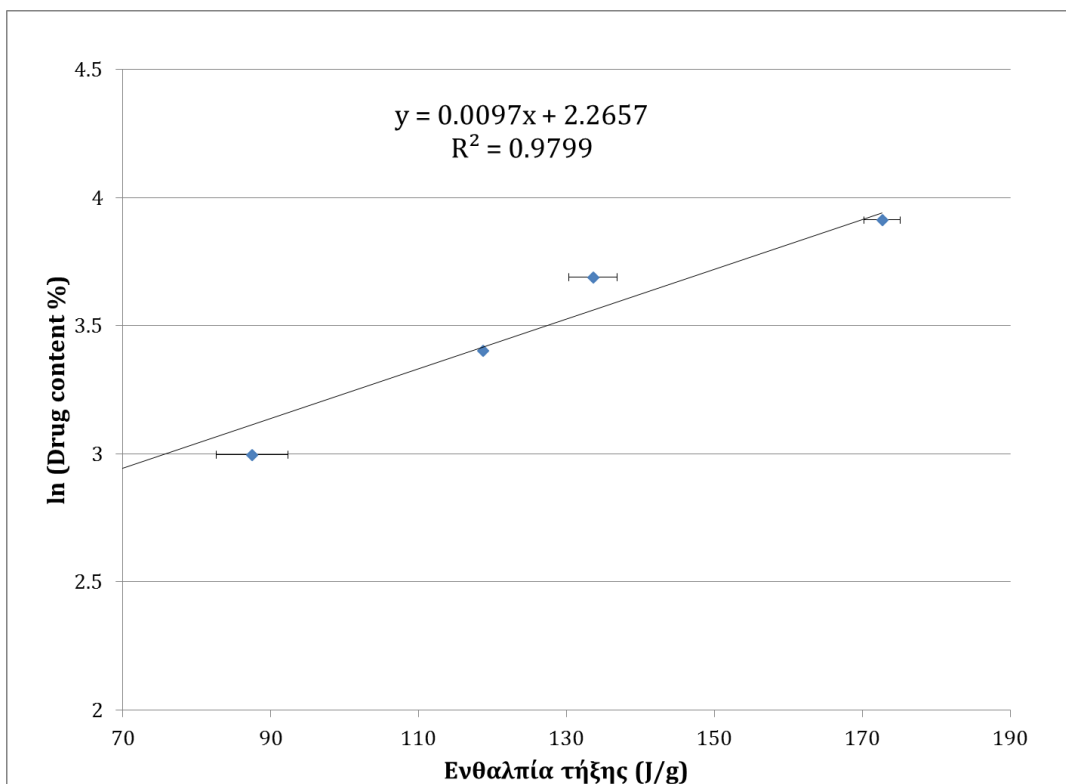


**Σχήμα 34:** Ενδεικτικό γράφημα DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξικιναμικού οξέος περιεκτικότητας 20%



**Σχήμα 35:** Επικαλυπτόμενα φαινόμενα τήξης πολυ(γαλακτικού οξέος) και ρ-μεθοξικιναμικού οξέος

Στη συνέχεια συσχετίζονται οι ενθαλπίες τήξης της ουσίας με την περιεκτικότητά της στο κάθε φυσικό μείγμα, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

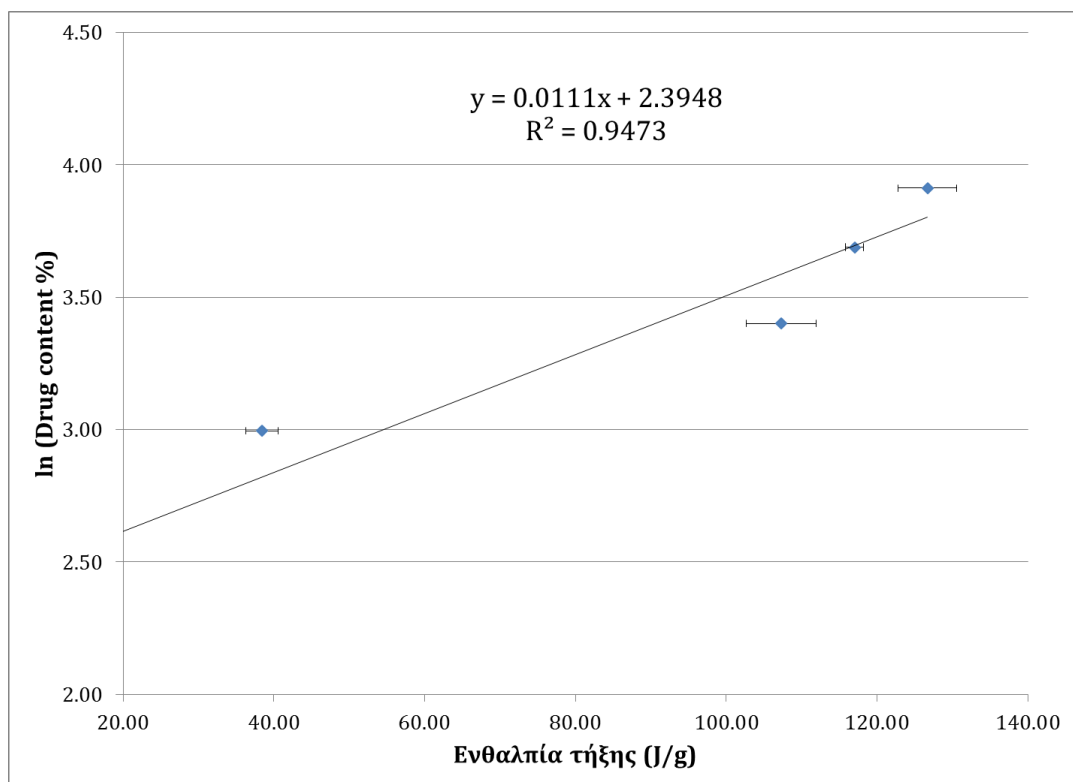


**Διάγραμμα 4:** Συγκέντρωση p-μεθοξυκιναμικού οξέος στα φυσικά μείγματα με το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ ), σε συνάρτηση με την ενθαλπία τήξης

Αντίστοιχα με παραπάνω υπολογίζεται η μέγιστη αναμειξιμότητα των δύο υλικών από την αποτέμνουσα. Άρα,

$$\text{μέγιστη αναμειξιμότητα με το Δείγμα A} = \exp(2.2657) = 9.63 \%$$

Έτσι, έπρεπε το δείγμα 10% να είχε εμφανίσει κορυφή τήξης του p-μεθοξυκιναμικού οξέος. Δικαιολογείται όμως μία τόσο μικρή απόκλιση. Μπορεί τα 3-4 mg του δείγματος για το DSC να μην είχαν περιεκτικότητα 10% σε p-μεθοξυκιναμικό οξύ.



**Διάγραμμα 5:** Συγκέντρωση p-μεθοξυκιναμικού οξέος στα φυσικά μείγματα με το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ ), σε συνάρτηση με την ενθαλπία τήξης

Αντίστοιχα με παραπάνω υπολογίζεται η μέγιστη αναμειξιμότητα των δύο υλικών από την αποτέμνουσα και δικαιολογείται η απουσία ενθαλπίας τήξης στο φυσικό μείγμα περικετικότητας 10 % σε p-μεθοξυκιναμικό οξύ:

$$\text{μέγιστη αναμειξιμότητα με το Δείγμα Β} = \exp(2.3948) = 10.966 \%$$

Συνοψίζοντας την ανάλυση DSC στις τέσσερις περιπτώσεις, παρατηρούμε ότι και οι δύο ουσίες εμφάνισαν μεγαλύτερη διαλυτότητα (4.763 % για το p-κουμαρικό οξύ και 10.966 % για το p-μεθοξυκιναμικό οξύ) στο Δείγμα Β, το οποίο παρουσιάζει το μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα και συζήτηση παρασκευής νανοσωματιδίων PLA με δραστική ουσία

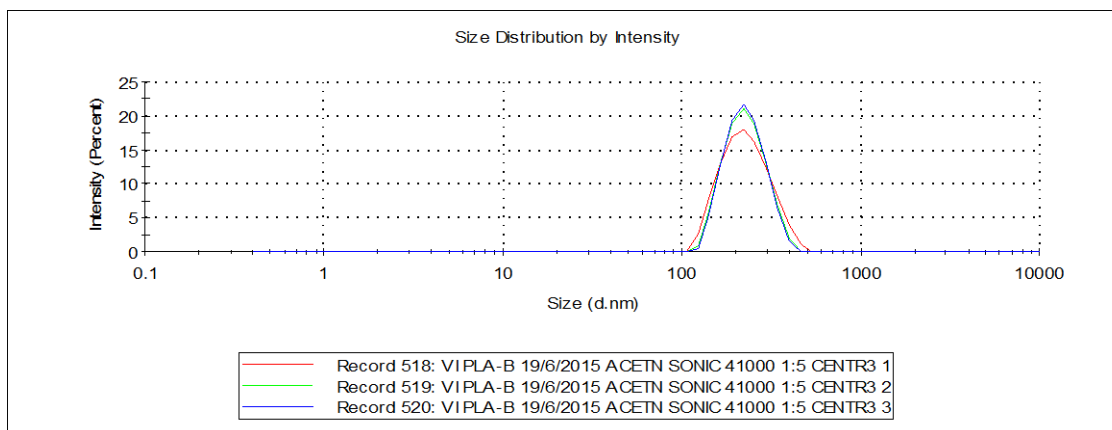
### 6.1 Χαρακτηρισμός τοπολογίας «κενών» νανοσωματιδίων PLA

Παρασκευάστηκαν αρχικά «κενά» νανοσωματίδια PLA. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις με την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός πραγματοποιήθηκαν για κάθε πολυμερές την ίδια εργαστηριακή μέρα του πειράματος εγκλεισμού, ώστε να μην έχει συμβεί συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 20 και στα Διαγράμματα 6, 7, 8 και 9 αντίστοιχα για κάθε πολυμερές.

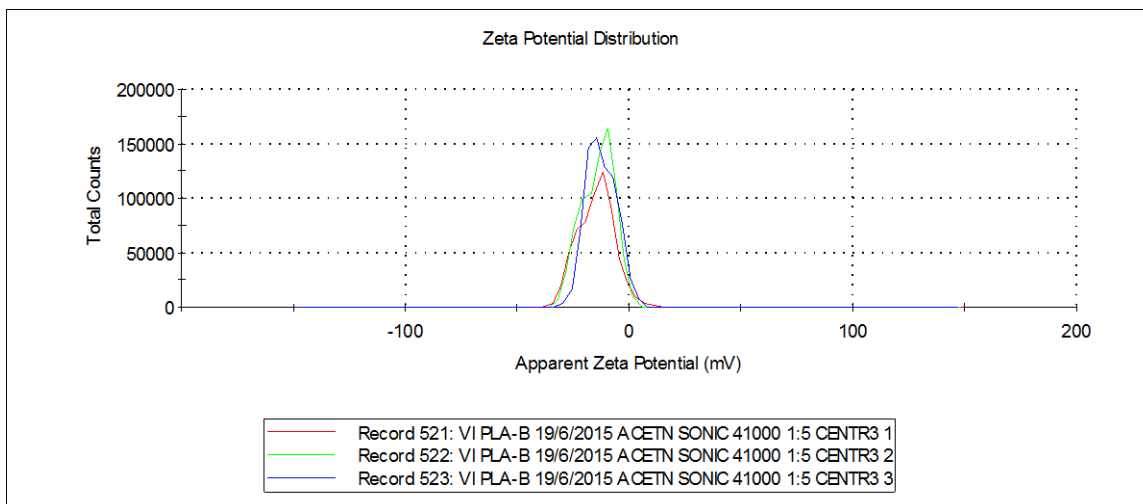
**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα χαρακτηρισμού «κενών» νανοσωματιδίων

Δείγμα	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV) (25°C)
A	216.0 ± 1.0	0.072 ± 0.034	-13.7 ± 1.1
B	273.1 ± 3.1	0.162 ± 0.019	-12.5 ± 5.6

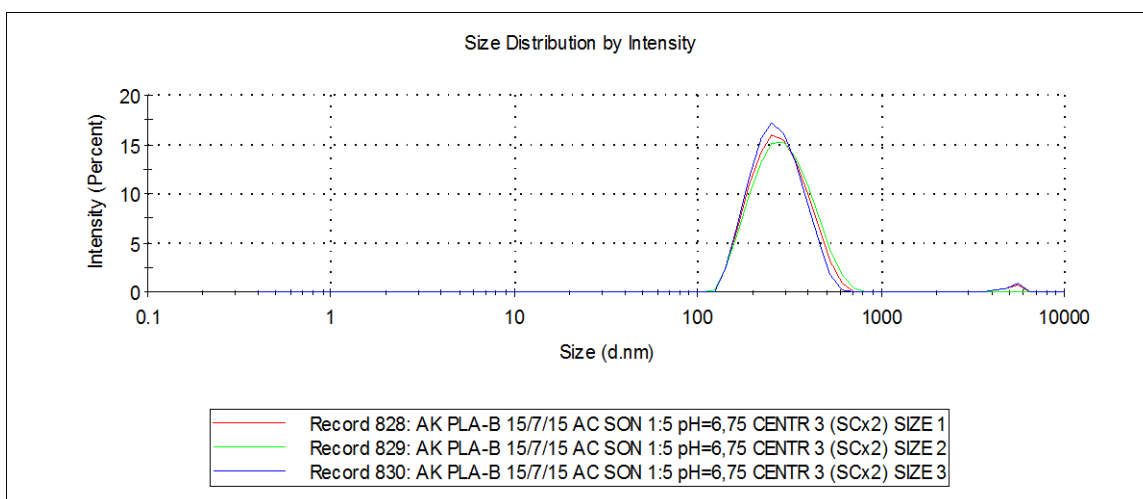
Παρατηρείται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι ικανοποιητικό, με αρκετά μικρό δείκτη πολυδιασποράς (PDI). Ας σημειωθεί, ότι ο δείκτης πολυδιασποράς αντιπροσωπεύει την σχετική διακύμανση στην κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων και πρέπει να λαμβάνει μικρές τιμές, από 0.1 έως 0.5. Άρα στη συγκεκριμένη περίπτωση, συμπεραίνουμε ότι η διακύμανση στην κατανομή του μεγέθους είναι πολύ μικρή. Τέλος, το ζ-δυναμικό είναι αρκετά αρνητικό, το οποίο φανερώνει σταθερότητα στις κολλοειδείς διασπορές.



**Διάγραμμα 6:** Κατανομή μεγέθους των «κενών» νανοσωματιδίων από το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol)

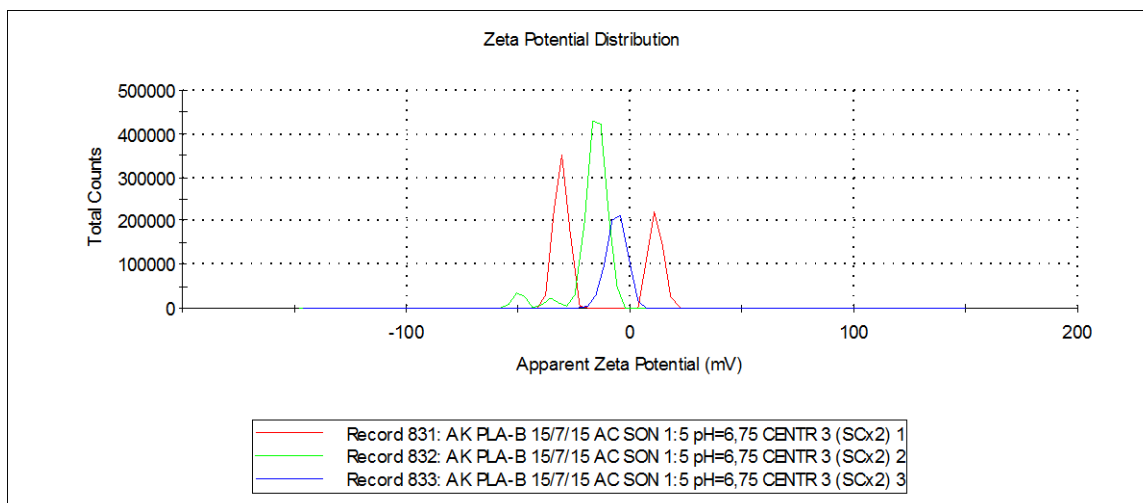


**Διάγραμμα 7:** Κατανομή του ζ-δυναμικού των «κενών» νανοσωματιδίων από το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol)



**Διάγραμμα 8:** Κατανομή μεγέθους των «κενών» νανοσωματιδίων από το Δείγμα B ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol)





**Διάγραμμα 9:** Κατανομή του ζ-δυναμικού των «κενών» νανοσωματιδίων από το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ )

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζεται η σταθμική απόδοση της διεργασίας, η οποία κυμάνθηκε έως 57% με την υψηλότερη τιμή στο δείγμα του χαμηλότερου μοριακού βάρους.

**Πίνακας 21:** Απόδοση διεργασίας σύνθεσης «κενών» νανοσωματιδίων

Δείγμα	Μάζα πολυμερούς για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα ουσίας για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα Νανοσωματιδίων μετά το freeze-drying (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
A	30.7	-	17.4	56.6
B	52.6	-	15.6	29.7

## 6.2 Χαρακτηρισμός τοπολογίας νανοσωματιδίων PLA που περιέχουν δραστική ουσία

Τα επόμενα πειράματα αφορούν στον εγκλεισμό των βιοδραστικών ενώσεων στα νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος). Αξίζει να αναφερθεί, ότι οι ουσίες εγκλείστηκαν με επιτυχία στις νανοσφαίρες πολυμερούς, μιας και δεν έχει σημειωθεί ο εγκλεισμός τους στην βιβλιογραφία.

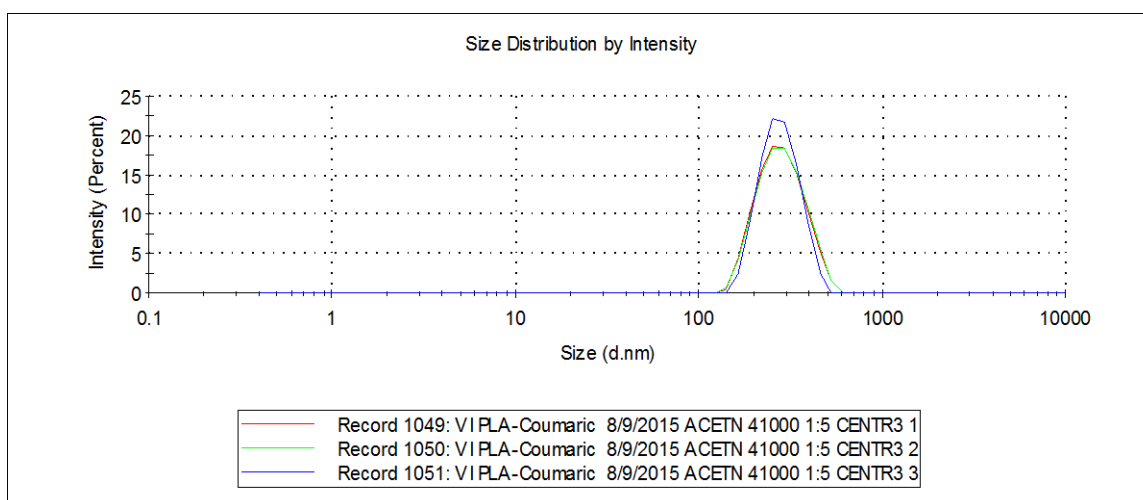
Αρχικά γίνεται ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων που περιέχουν p-κουμαρικό οξύ. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του μεγέθους για τα δύο πολυμερή παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων που περιέχουν p-κουμαρικό οξύ

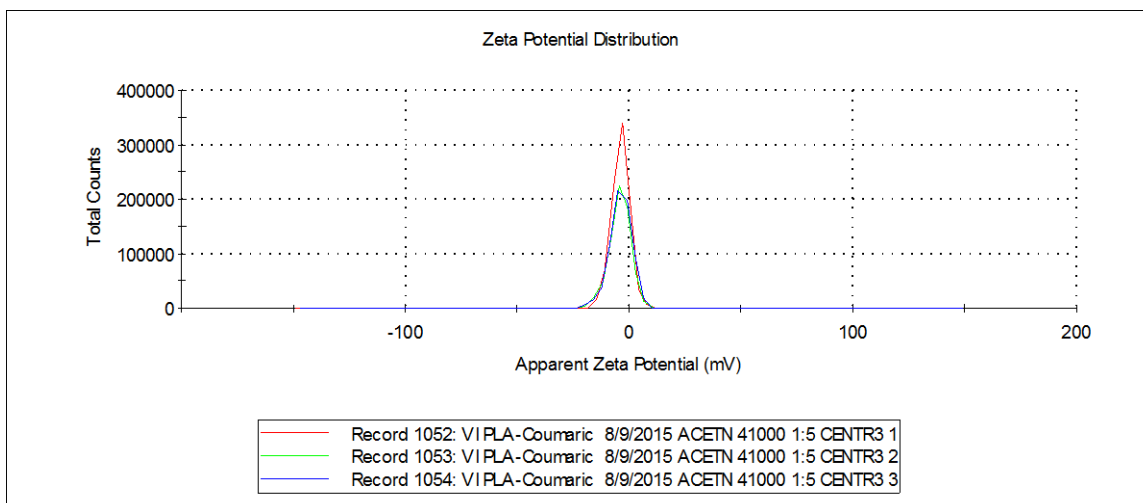
Δείγμα	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV) (25°C)
A- p-κουμαρικό	266.8 ± 1.1	0.062 ± 0.035	-3.8 ± 0.2
B- p-κουμαρικό	290.0 ± 2.9	0.039 ± 0.010	-12.6 ± 0.3

Παρατηρούμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων που περιέχουν το p-κουμαρικό οξύ είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των «κενών» νανοσωματιδίων. Επίσης, ο δείκτης πολυδιασποράς μειώθηκε περισσότερο και το ζ-δυναμικό αυξήθηκε, ιδιαίτερα στο Δείγμα A.

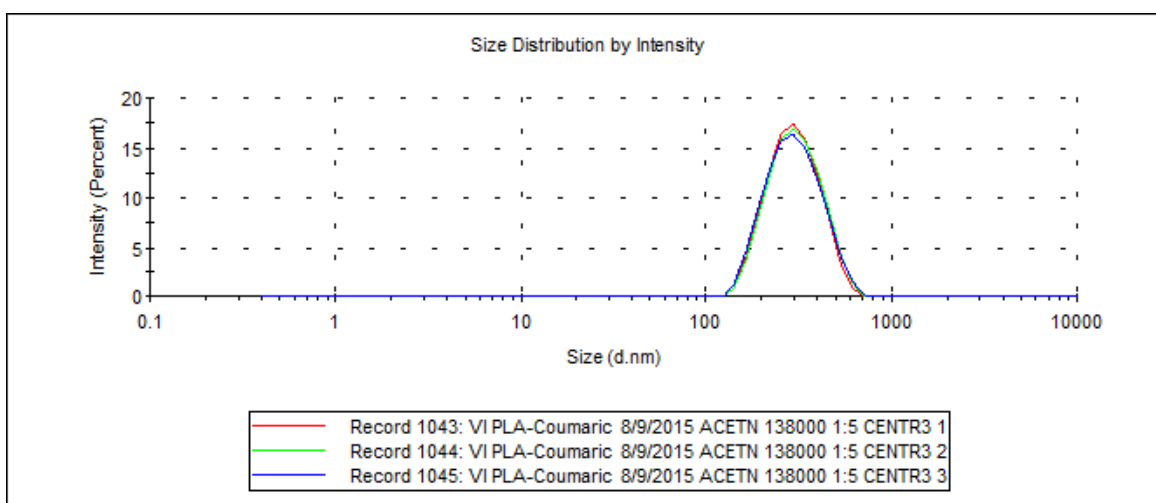
Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις του DLS.



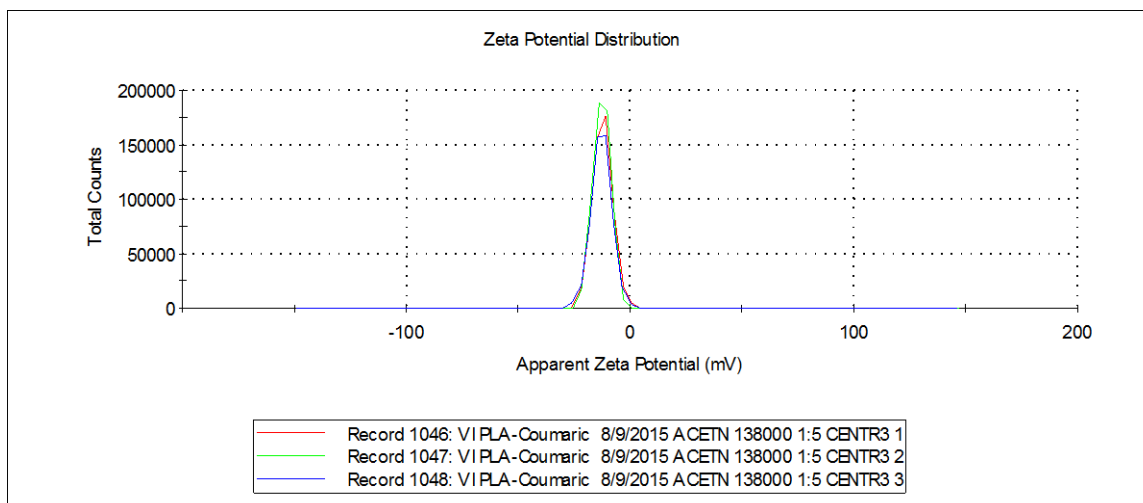
**Διάγραμμα 10:** Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων από το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol) που περιέχουν p-κουμαρικό οξύ



**Διάγραμμα 11:** Κατανομή του ζ-δυναμικού των νανοσωματίδων από το Δείγμα A ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol) που περιέχουν ρ-κουμαρικό οξύ



**Διάγραμμα 12:** Κατανομή μεγέθους νανοσωματίδων από το Δείγμα B ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) που περιέχουν ρ-κουμαρικό οξύ



**Διάγραμμα 13:** Κατανομή ζ-δυναμικού των νανοσωματίδιων από το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) που περιέχουν ρ-κουμαρικό οξύ

Για την απόδοση της διεργασίας ζυγίστηκαν τα νανοσωματίδια μετά την ξήρανση σε κατάψυξη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 23. Ωστόσο η χαμηλή τιμή 5 % για το σύστημα νανοσωματιδίων με πολυμερές Δείγματος Β υποδεικνύει ότι το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί.

**Πίνακας 23:** Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του ρ-κουμαρικού οξέος

Δείγμα	Μάζα πολυμερούς για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα ουσίας για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα Νανοσωματιδίων μετά το freeze-drying (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
A-ρ-κουμαρικό	52.3	10.5	25.6	40.76
B- ρ-κουμαρικό	48.1	9.7	2.9	5.01

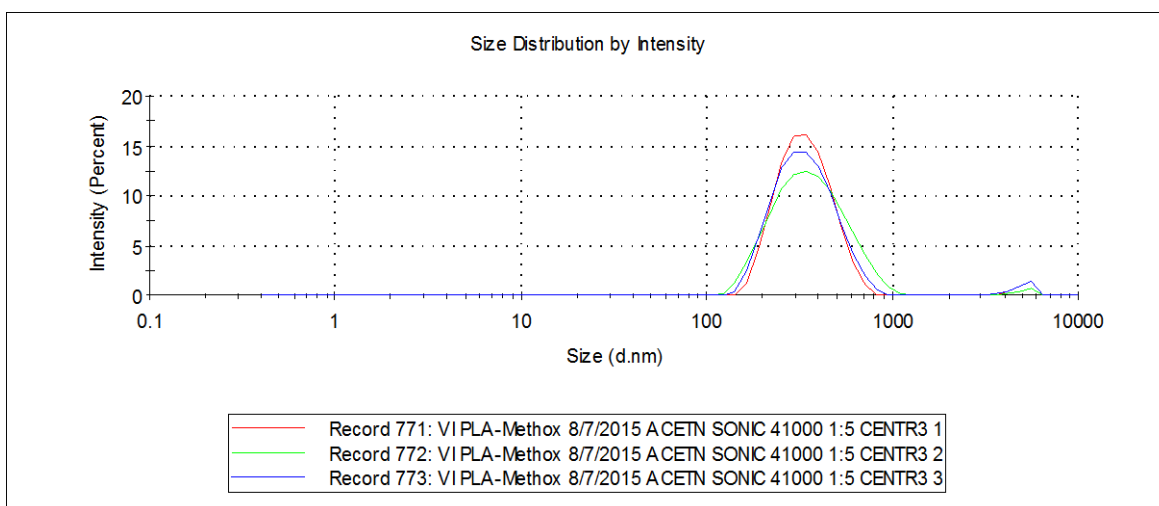
Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν οι εγκλεισμοί του ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος στα δύο είδη πολυ(γαλακτικού οξέος). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 24.

**Πίνακας 24:** Αποτελέσματα χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων που περιέχουν ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ

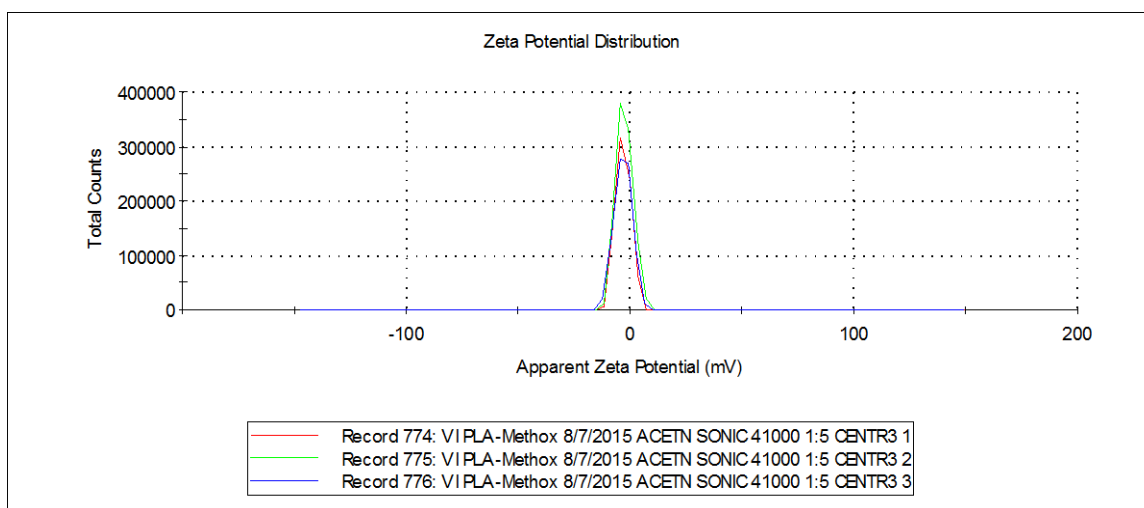
Δείγμα	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV) (25°C)
A- ρ-μεθοξυκιναμικό	336.9 ± 4	0.205 ± 0.008	-2.9 ± 0.2
B-ρ- μεθοξυκιναμικό	329.0 ± 1.2	0.126 ± 0.004	-5.2 ± 0.4

Παρατηρούμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων που περιέχουν ρ-μεθοξικιναμικό οξύ αυξήθηκε κατά 60nm στην περίπτωση του Δείγματος Β και 120nm στην περίπτωση του Δείγματος Α σε σχέση με τα «κενά» νανοσωματίδια. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς μέσα στα αποδεκτά, όμως, όρια, και αύξηση του ζ-δυναμικού, κυρίως στο Δείγμα Α.

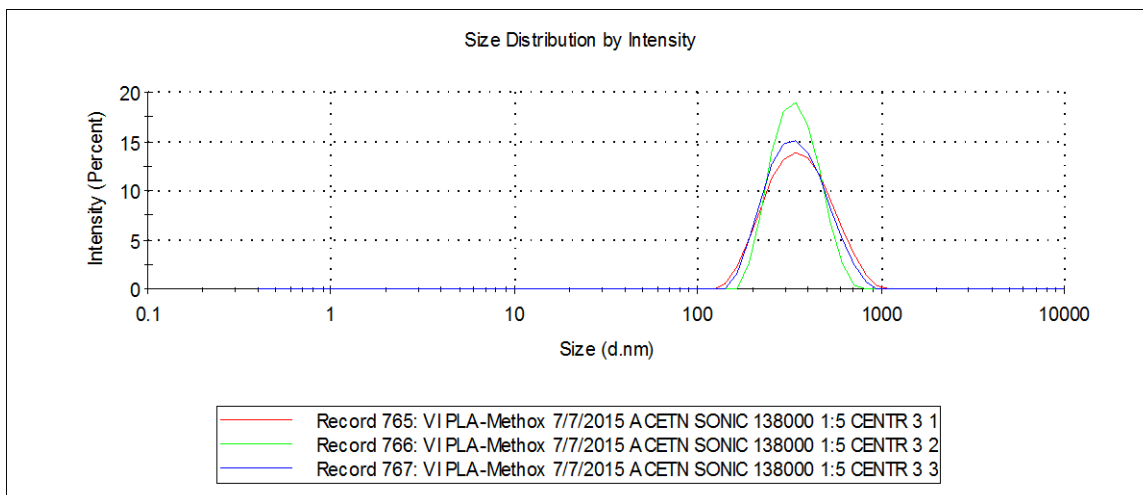
Ακολουθούν τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις μέσω της μεθόδου DLS.



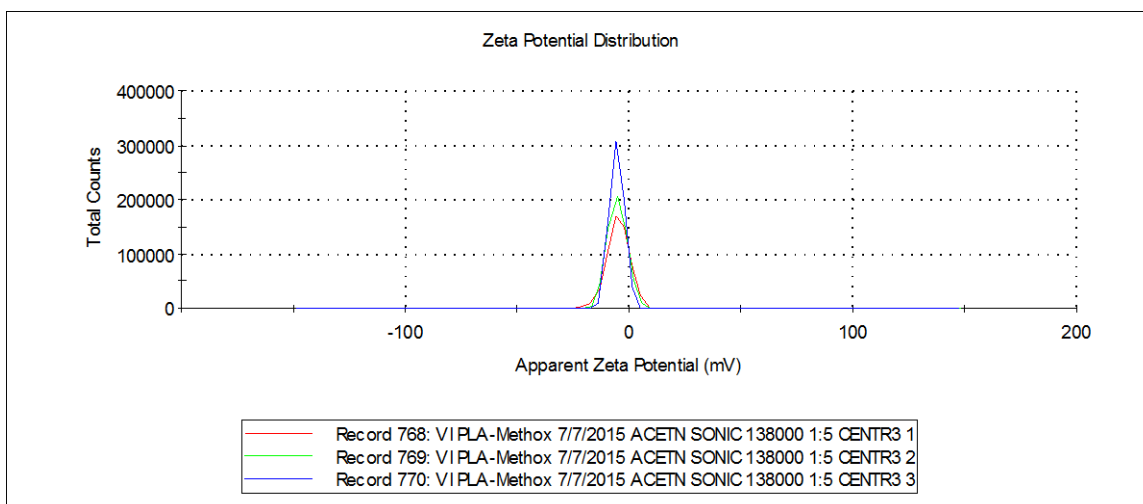
**Διάγραμμα 14:** Κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων από Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol) που περιέχουν ρ-μεθοξικιναμικό οξύ



**Διάγραμμα 15:** Κατανομή του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων από Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol) που περιέχουν ρ-μεθοξικιναμικό οξύ



**Διάγραμμα 16:** Κατανομή μεγέθους νανοσωματίδιων από το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) που περιέχουν ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ



**Διάγραμμα 17:** Κατανομή ζ-δυναμικού των νανοσωματίδιων από το Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) που περιέχουν ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ

Για την απόδοση της διεργασίας ζυγίστηκαν τα νανοσωματίδια μετά την ξήρανση σε κατάψυξη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.

**Πίνακας 25:** Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού του p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Δείγμα	Μάζα πολυμερούς για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα ουσίας για τον εγκλεισμό (mg)	Μάζα Νανοσωματιδίων μετά το freeze-drying (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
A-p-μεθοξυκιναμικό	49.4	9.8	25.2	42.56
B- p-μεθοξυκιναμικό	49.9	10.2	21.7	36.1

### 6.3 Αποτελέσματα απόδοσης εγκλεισμού των δραστικών ουσιών σε νανοσωματίδια PLA

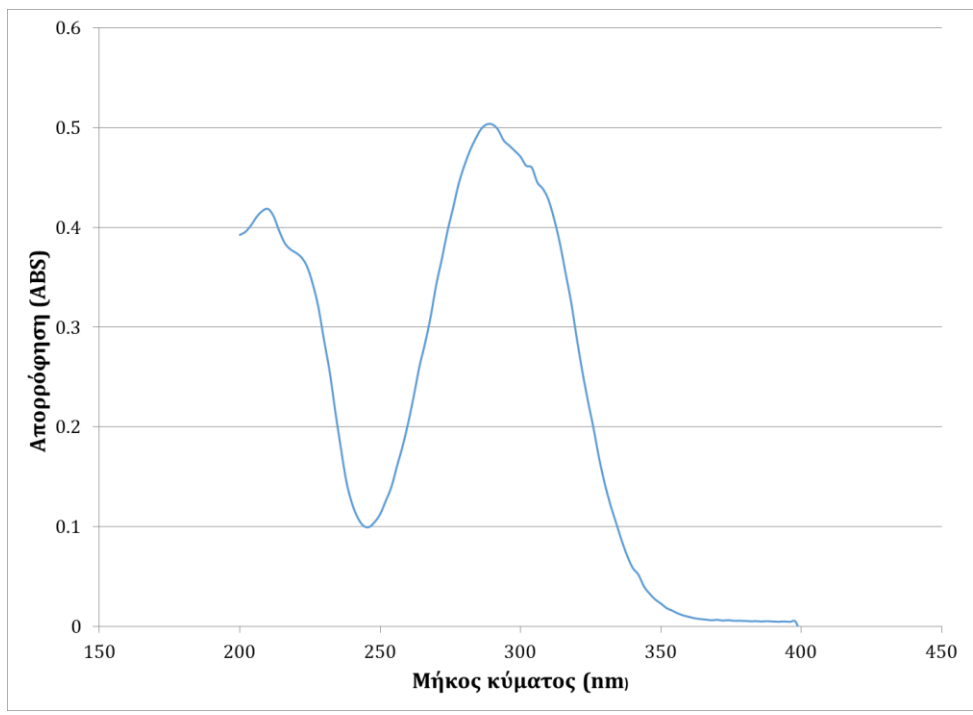
Υπολογίστηκε η έμμεση απόδοση εγκλεισμού (Indirect Encapsulation Efficiency) και η άμεση απόδοση εγκλεισμού (Direct Encapsulation Efficiency) για τις δύο ουσίες. Για για τον άμεσο και τον έμμεσο προσδιορισμό του εγκλεισμού, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης των δύο ουσιών στο όργανο UV-Vis, συναρτήσει της συγκέντρωσης.

#### 6.3.1 Έμμεση και άμεση απόδοση εγκλεισμού p-κουμαρικού οξέος

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα του p-κουμαρικού οξέος σε διαλύτη νερό, προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 288 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Για γνωστές συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται ακολούθως.

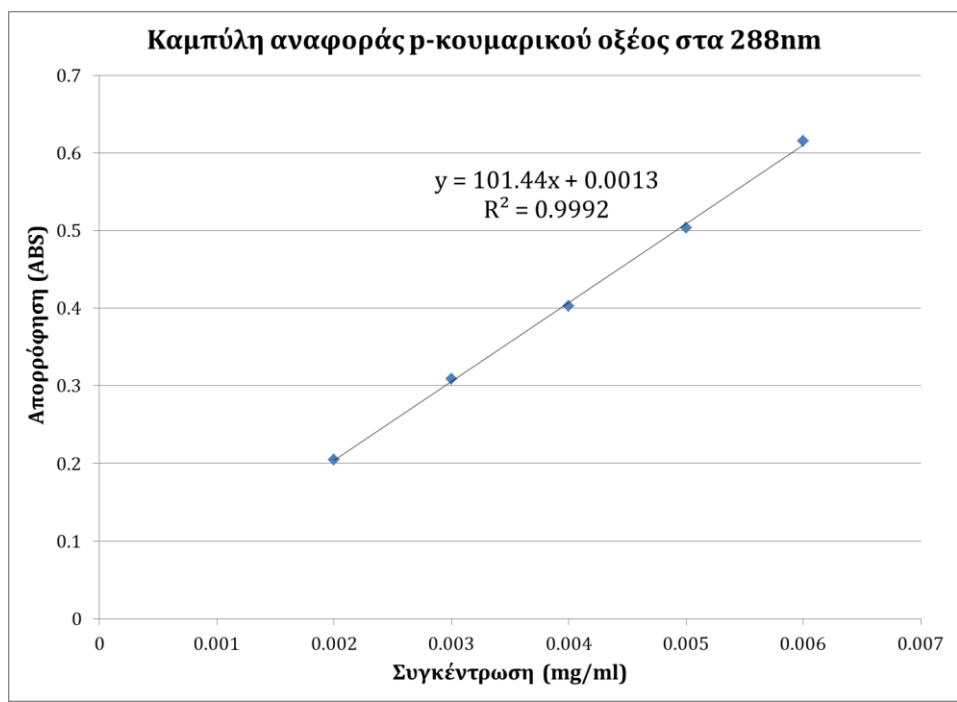
**Πίνακας 26:** Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του p-κουμαρικού οξέος

Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση ABS
0.006	0.615
0.005	0.5032
0.004	0.403
0.003	0.3092
0.002	0.2048



**Διάγραμμα 18:** Το φάσμα απορρόφησης του p-κουμαρικού οξέος

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Πίνακα 26, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς του p-κουμαρικού οξέος στα 288 nm, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 19.



**Διάγραμμα 19:** Καμπύλη αναφοράς p-κουμαρικού οξέος



Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της μάζας του μη εγκλεισμένου *p*-κουμαρικού οξέος, η οποία λήφθηκε από τα υπερκείμενα S1, S2 και S3 των φυγοκεντρήσεων. Συγκεκριμένα, για κάθε υπερκείμενο λήφθηκε η μέγιστη απορρόφηση στα 288 nm. Επίσης, έγινε μέτρηση του όγκου των υπερκείμενων διαλυμάτων, ώστε να βρεθεί μέσω της συγκέντρωσης, η ακριβής μάζα της μη εγκλεισμένης ουσίας στο σύνολο των υπερκειμένων. Καθώς τα υπερκείμενα ήταν πολύ πυκνά, για την μέτρηση τους πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:50 ώστε οι απορροφήσεις να βρίσκονται μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 27 για το Δείγμα Α και στον Πίνακα 28 για το Δείγμα Β.

**Πίνακας 27:** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τον εγκλεισμό στο Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol)

Υπερκείμενο	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Όγκος (ml)	Μάζα (mg)
S1	0.3726	0.184	28	5.174
S2	-	-	-	-
S3	-	-	-	-
			Σύνολο	5.174

**Πίνακας 28:** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τον εγκλεισμό στο Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol)

Υπερκείμενο	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Όγκος (ml)	Μάζα (mg)
S1	0.3223	0.158	28	4.430
S2	-	-	-	-
S3	-	-	-	-
			Σύνολο	4.430

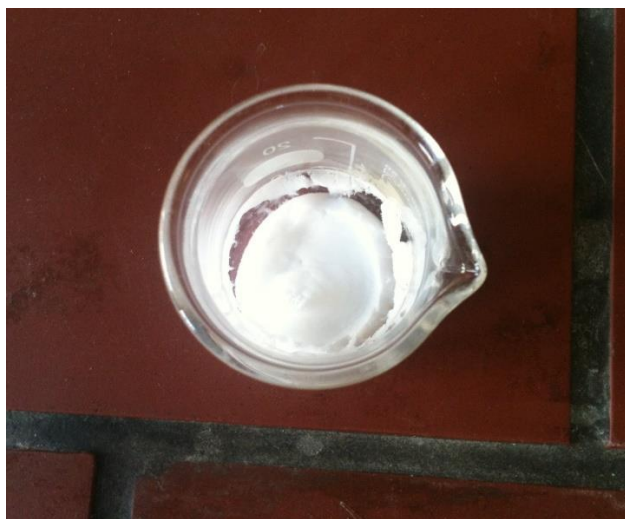
Αφού υπολογίστηκε η συνολική μάζα *p*-κουμαρικού οξέος που δεν εγκλείστηκε, μπορεί να υπολογιστεί η έμμεση απόδοση των εγκλεισμών. Τα αποτελέσματα της απόδοσης εγκλεισμού του *p*-κουμαρικού οξέος στα δύο πολυμερή παρατίθενται στον Πίνακα 29.

**Πίνακας 29:** Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του p-κουμαρικού οξέος

Εγκλεισμός	Αρχική μάζα (mg)	Μάζα από υπερκείμενα (mg)	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A	5.7	5.174	9.22
B	5.4	4.430	17.95

Παρατηρούμε, ότι το p-κουμαρικό οξύ εγκλείστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στο Δείγμα B (μεγαλύτερου μοριακού βάρους).

Για την άμεση απόδοση εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν τα νανοσωματίδια ύστερα από την διαδικασία της ξήρανσης σε κατάψυξη. Ύστερα από αυτή τη διαδικασία, τα νανοσωματίδια που ελήφθησαν είχαν μορφή βαμβακιού ή αλλιώς όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία fluffy και απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 25:** Μορφή νανοσωματίδιων μετά την λυοφιλοποίηση (freeze drying)

Το διάλυμα που προκύπτει μετά την εξάτμιση του διχλωρομεθανίου, αραιώνεται σε αναλογία 1:10 για να είναι στα όρια συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων UV-Vis στα νανοσωματίδια παρουσιάζονται παρακάτω.

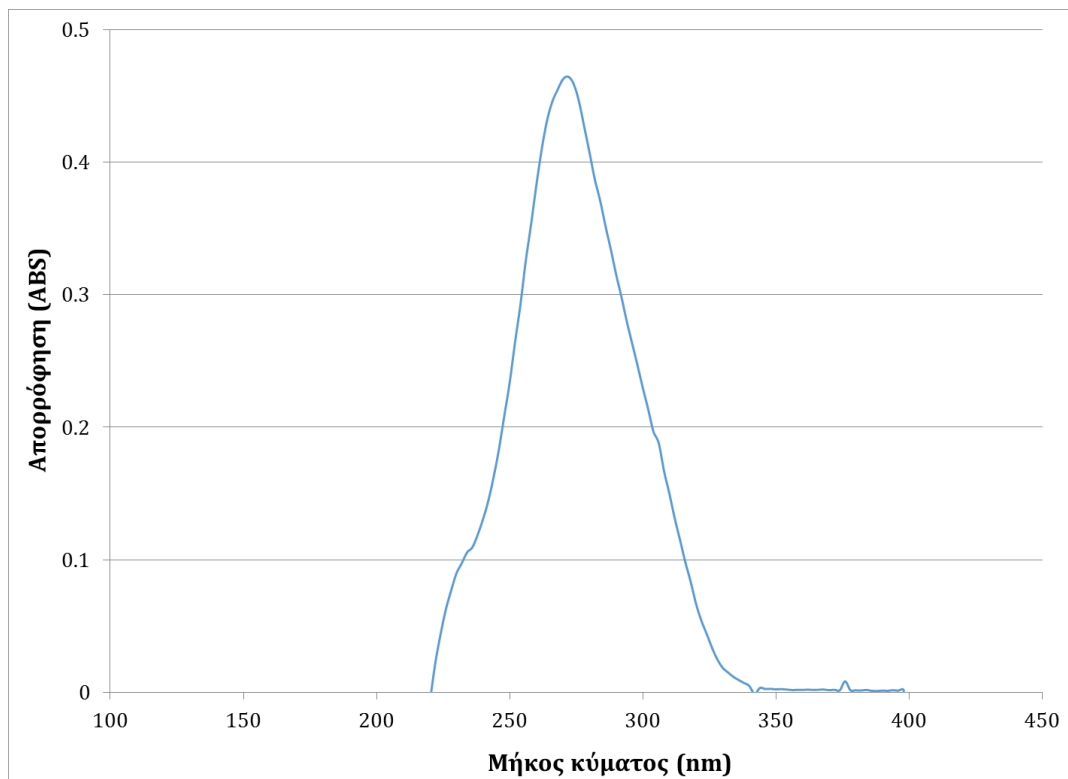
**Πίνακας 30:** Άμεση απόδοση εγκλεισμού του p-κουμαρικού οξέος

Νανοσωματίδια (NPs)	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μάζα ουσίας στα NPs (mg)	Άμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A-p-κουμαρικό 2.6 mg	0.098	0.009	0.61	10.70
B- p-κουμαρικό 1.2 mg	0.5193	0.051	0.74	13.71

Παρατηρείται ότι και με την μέθοδο της άμεσης απόδοσης εγκλεισμού, το p-κουμαρικό οξύ εγκλείστηκε περισσότερο στο Δείγμα Β (μεγαλύτερου μοριακού βάρους) και λιγότερο στο Δείγμα Α.

### 6.3.2 Έμμεση και άμεση απόδοση εγκλεισμού p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα του p-μεθοξυκιναμικού οξέος σε διαλύτη νερό, προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 272 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



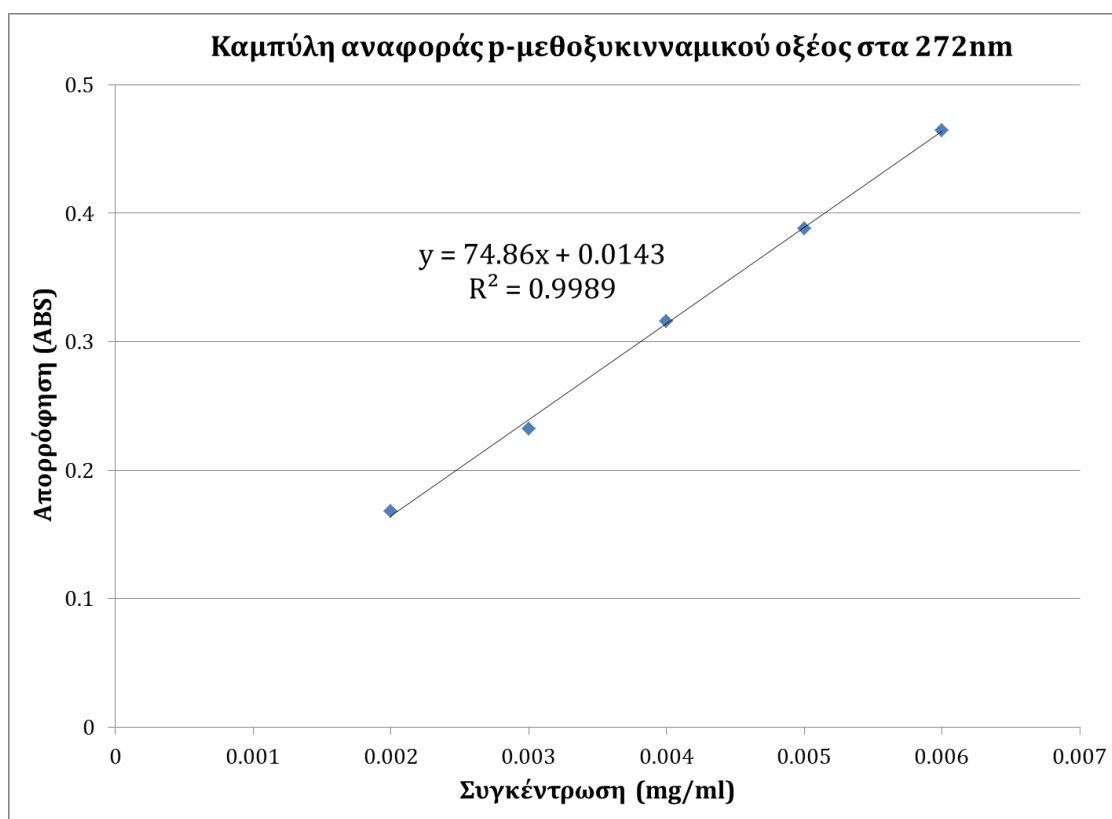
**Διάγραμμα 20:** Το φάσμα του p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Για γνωστές συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται ακολούθως.

**Πίνακας 31:** Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του ρ-μεθοξικιναμικού οξέος

Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση ABS
0.006	0.4646
0.005	0.388
0.004	0.3157
0.003	0.2324
0.002	0.1681

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Πίνακα 31, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς του ρ-μεθοξικιναμικού οξέος στα 272 nm, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 20.



**Διάγραμμα 20:** Καμπύλη αναφοράς ρ-μεθοξικιναμικού οξέος

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της μάζας του μη εγκλεισμένου ρ-μεθοξικιναμικού οξέος, η οποία λήφθηκε από τα υπερκείμενα S1, S2 και S3 των φυγοκεντρήσεων. Συγκεκριμένα, για κάθε υπερκείμενο λήφθηκε η μέγιστη απορρόφηση στα

272 nm. Επίσης, έγινε μέτρηση του όγκου των υπερκείμενων διαλυμάτων, ώστε να βρεθεί μέσω της συγκέντρωσης, η ακριβής μάζα της μη εγκλεισμένης ουσίας στο σύνολο των υπερκειμένων. Καθώς τα υπερκείμενα ήταν πολύ πυκνά, για την μέτρηση τους πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:50 ώστε οι απορροφήσεις να βρίσκονται μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 32 για το Δείγμα Α και στον Πίνακα 33 για το Δείγμα Β.

**Πίνακας 32:** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τον εγκλεισμό στο Δείγμα Α ( $\overline{M}_v = 41000$  g/mol)

Υπερκείμενο	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Όγκος (ml)	Μάζα (mg)
S1	0.3675	0.236	27	6.369
S2	-	-	-	-
S3	-	-	-	-
			Σύνολο	6.369

**Πίνακας 33:** Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τον εγκλεισμό στο Δείγμα Β ( $\overline{M}_v = 138000$  g/mol)

Υπερκείμενο	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Όγκος (ml)	Μάζα (mg)
S1	0.2616	0.165	27	4.460
S2	-	-	-	-
S3	-	-	-	-
			Σύνολο	4.460

Αφού υπολογίστηκε η συνολική μάζα p-μεθοξυκιναμικού οξέος που δεν εγκλείστηκε, μπορεί να υπολογιστεί η έμμεση απόδοση των εγκλεισμών. Τα αποτελέσματα της απόδοσης εγκλεισμού του p-μεθοξυκιναμικού οξέος στα δύο πολυμερή παρατίθενται στον Πίνακα 34.

**Πίνακας 34:** Έμμεση απόδοση εγκλεισμού του p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Εγκλεισμός	Αρχική μάζα (mg)	Μάζα από υπερκείμενα (mg)	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A	9.8	6.369	35.01
B	10.2	4.460	56.28

Παρατηρείται ότι το p-μεθοξυκιναμικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού σε σχέση με το p-κουμαρικό οξύ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το p-μεθοξυκιναμικό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερη υδροφοβικότητα σε σχέση με το p-κουμαρικό οξύ, που είναι περισσότερο υδρόφιλη ουσία. Επίσης, το p-μεθοξυκιναμικό οξύ εγκλείστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στο Δείγμα Β (μεγαλύτερου μοριακού βάρους).

Για την άμεση απόδοση εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν τα νανοσωματίδια ύστερα από την διαδικασία της ξήρανσης σε κατάψυξη. Ύστερα από αυτή τη διαδικασία, τα νανοσωματίδια που ελήφθησαν είχαν μορφή βαμβακιού ή αλλιώς όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία fluffy και απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 26:** Μορφή νανοσωματίδιων μετά την λυοφιλοποίηση (freeze drying)

Όσον αφορά την άμεση απόδοση εγκλεισμού, το διάλυμα που προκύπτει μετά την εξάτμιση του διχλωρομεθανίου, αραιώνεται σε αναλογία 1:10 για να είναι στα όρια συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων UV-Vis στα νανοσωματίδια παρουσιάζονται παρακάτω.

**Πίνακας 35:** Άμεση απόδοση εγκλεισμού του p-μεθοξυκιναμικού οξέος

Νανοσωματίδια	Απορρόφηση ABS	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μάζα ουσίας στα NPs (mg)	Άμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A-p-μεθοξυκιναμικό 2 mg	0.3509	0.045	4.05	41.29
B- p-μεθοξυκιναμικό 2.8 mg	0.4593	0.059	6.45	63.23

Παρατηρείται ότι και με την μέθοδο της άμεσης απόδοσης εγκλεισμού, το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ εγκλείστηκε περισσότερο στο Δείγμα Β (μεγαλύτερου μοριακού βάρους) και λιγότερο στο Δείγμα Α.

#### 6.4 Συσχετισμός αποτελέσματος διεργασιών εγκλεισμού με αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων παρατίθεται ο Πίνακας 36.

**Πίνακας 36:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα διαλυτότητας ουσίας: πολυμερούς και χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη ουσία

Πολυμερές-Ουσία	Μοριακό βάρος (g/mol) PLA	DSC Μέγιστη Αναμειξιμότητα (%)	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού (%)	Άμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A-ρ-κουμαρικό	41000	3.847	9.22	10.70
B- ρ-κουμαρικό	138000	4.763	17.95	13.71
A- ρ-μεθοξυκιναμικό	41000	9.63	35.01	41.29
B- ρ-μεθοξυκιναμικό	138000	10.966	56.28	63.23

Από την άμεση και την έμμεση μέθοδο για την απόδοση εγκλεισμού προέκυψαν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Άρα για μελλοντικούς εγκλεισμούς των δύο αυτών ουσιών, και οι δύο τεχνικές είναι έγκυρες. Οι συγκρίσιμες τιμές των δύο μεθόδων προσδιορισμού της απόδοσης εγκλεισμού επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες όπου μελετώνται και οι δύο μέθοδοι.

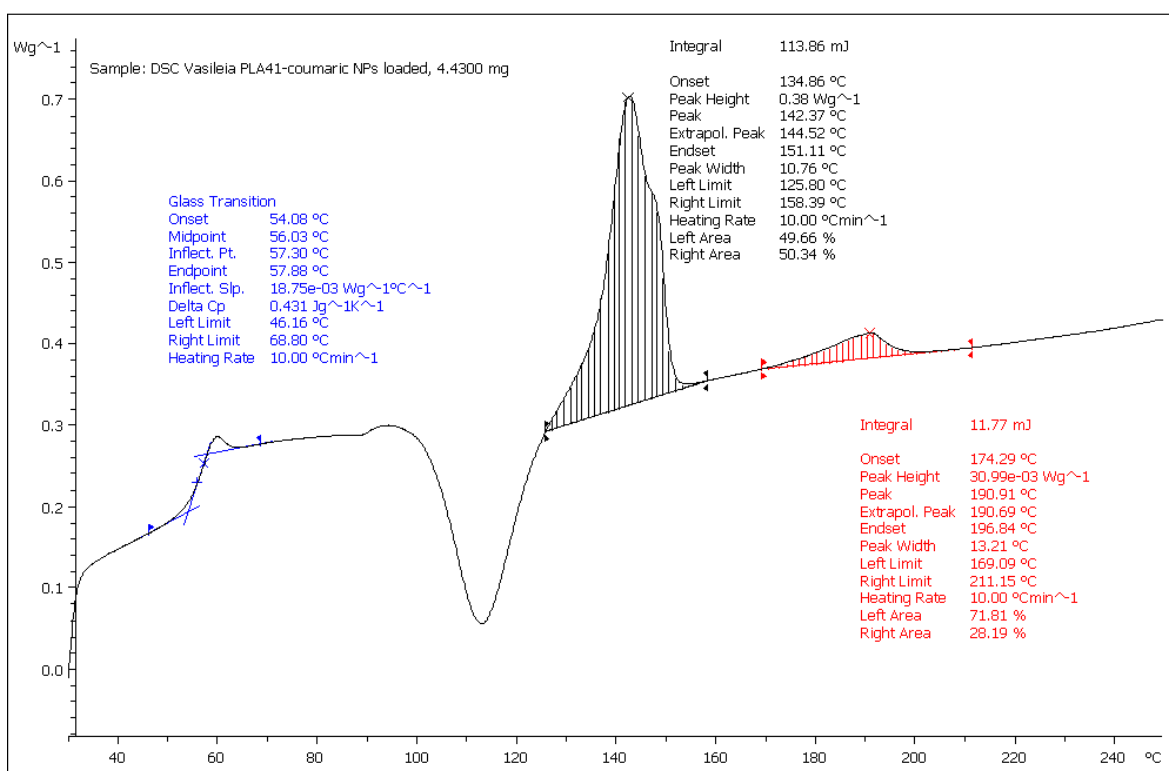
Τα ποσοστά εγκλεισμού είναι σε συμφωνία με τις τιμές της μέγιστης αναμειξιμότητας από την ανάλυση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Τα ποσοστά αναμειξιμότητας για το ρ-κουμαρικό οξύ είναι χαμηλότερα από αυτά του ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος, λαμβάνοντας υπόψιν την πιο υδροφιλική φύση του ρ-κουμαρικού οξέος. Η μεγαλύτερη αναμειξιμότητα των δύο ουσιών παρατηρήθηκε με το δείγμα πολυμερούς Β.

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) μπορεί να θεωρηθεί ένα έγκυρο εργαλείο για τις μελέτες προσχεδιασμού, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για την στερεά κατάσταση της φαρμακευτικής ουσίας μέσα στα νανοσωματίδια.

## 6.5 Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων

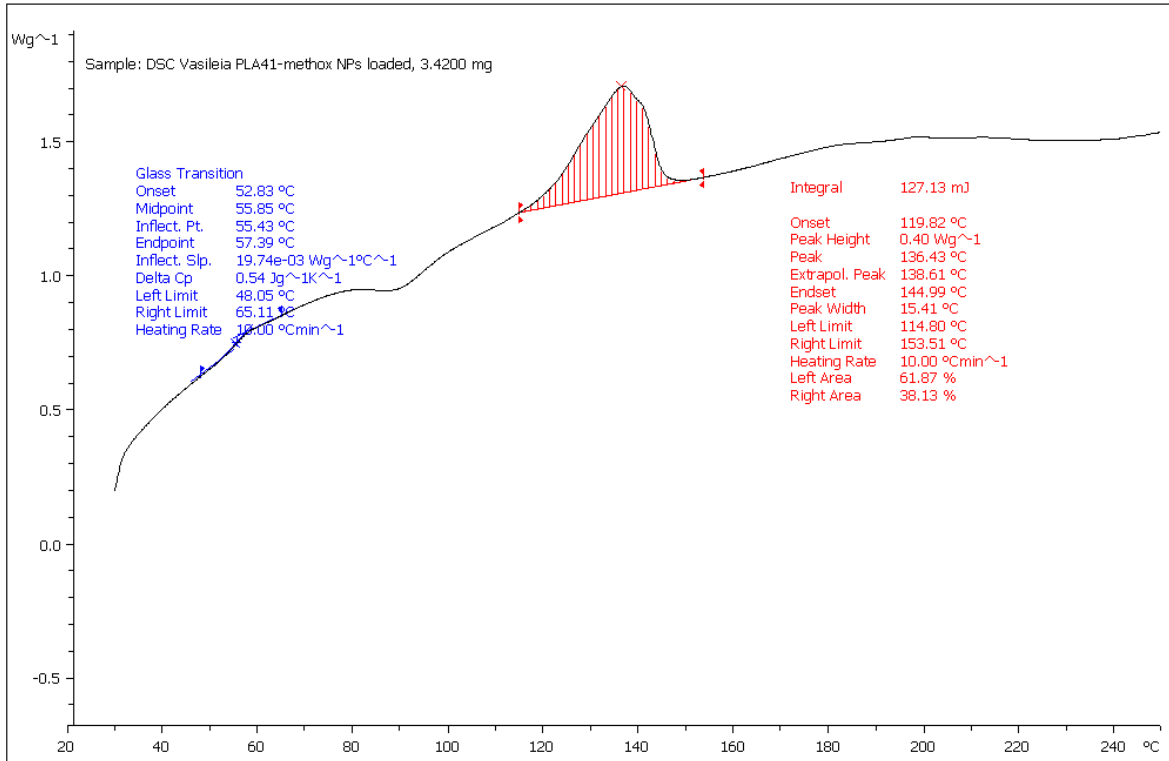
Στα νανοσωματίδια μετά την διαδικασία της ξήρανης με κατάψυξη (freeze-drying) πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις DSC και TGA.

Τα Σχήματα 36 έως 38 αφορούν την ανάλυση DSC και τα Σχήματα 39 και 40 την ανάλυση TGA. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τα γραφήματα DSC δεν εξάχθηκε η κανονικοποιημένη ενθαλπία τήξης όπως την αναγράφει το όργανο. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση το ποσοστό φόρτωσης των δραστικών ουσιών στα νανοσωματίδια, που είναι 20%. Να σημειωθεί ότι ο εγκλεισμός του  $\rho$ -κουμαρικού οξέος στο Δείγμα Β όπως αναφέρθηκε παραπάνω είχε απόδοση διεργασίας 5 %. Για το λόγο αυτό δεν ήταν επαρκής η ποσότητα των νανοσωματιδίων για να γίνει ανάλυση DSC και TGA σε αυτό το δείγμα, οπότε ο εγκλεισμός πρέπει να επαναληφθεί.

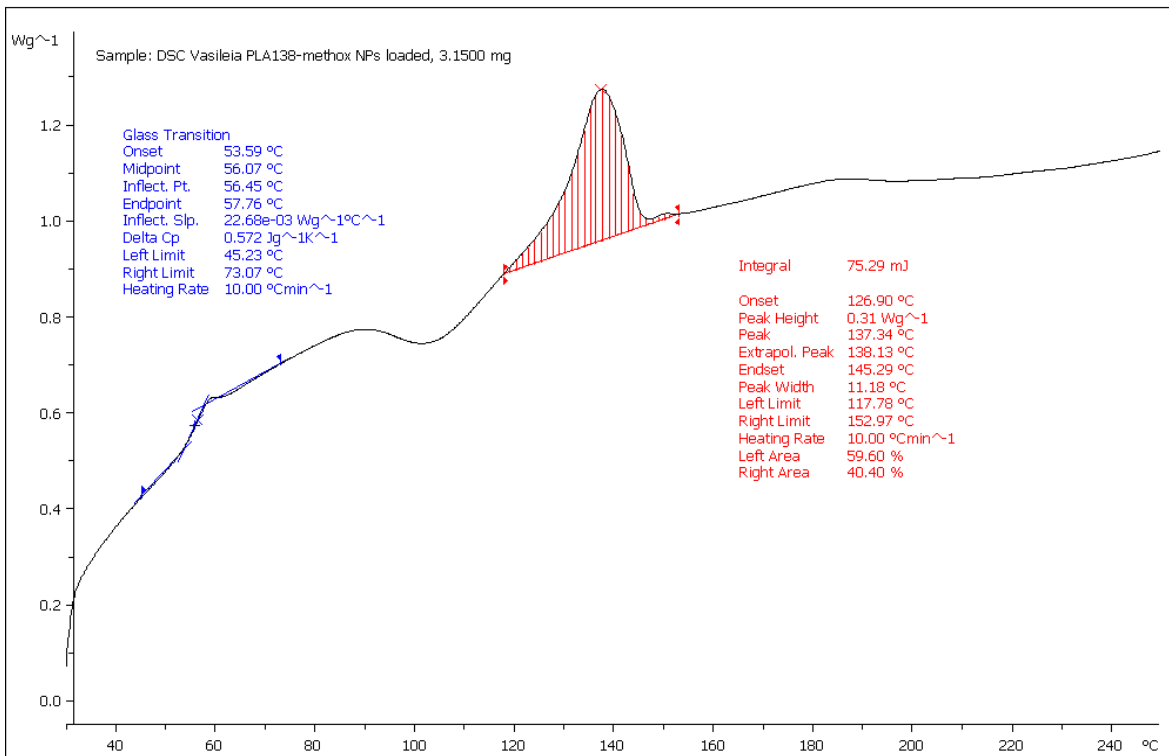


Σχήμα 36: Καμπύλη DSC για τα νανοσωματίδια Α- $\rho$ -κουμαρικό οξύ





Σχήμα 37: Καμπύλη DSC για τα νανοσωματίδια Α-ρ-μεθοξικιναμικό οξύ



Σχήμα 38: Καμπύλη DSC για τα νανοσωματίδια Β-ρ-μεθοξικιναμικό οξύ

Παρατηρείται ότι στα νανοσωματίδια που περιέχουν την δραστική ουσία ρ-μεθοξυκινναμικό οξύ, δεν εμφανίζεται κορυφή τήξης της ουσίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ουσία βρίσκεται στις άμορφες περιοχές του πολυμερούς, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται από την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης. Η απουσία της κορυφής τήξης του ρ-μεθοξυκινναμικού οξέος θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στη διάλυση του στην πολυμερική μήτρα, λόγω της νανοκλίμακας των αντίστοιχων υλικών. Στον Πίνακα 37 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τα τρία από τα τρία δείγματα νανοσωματίδιων.

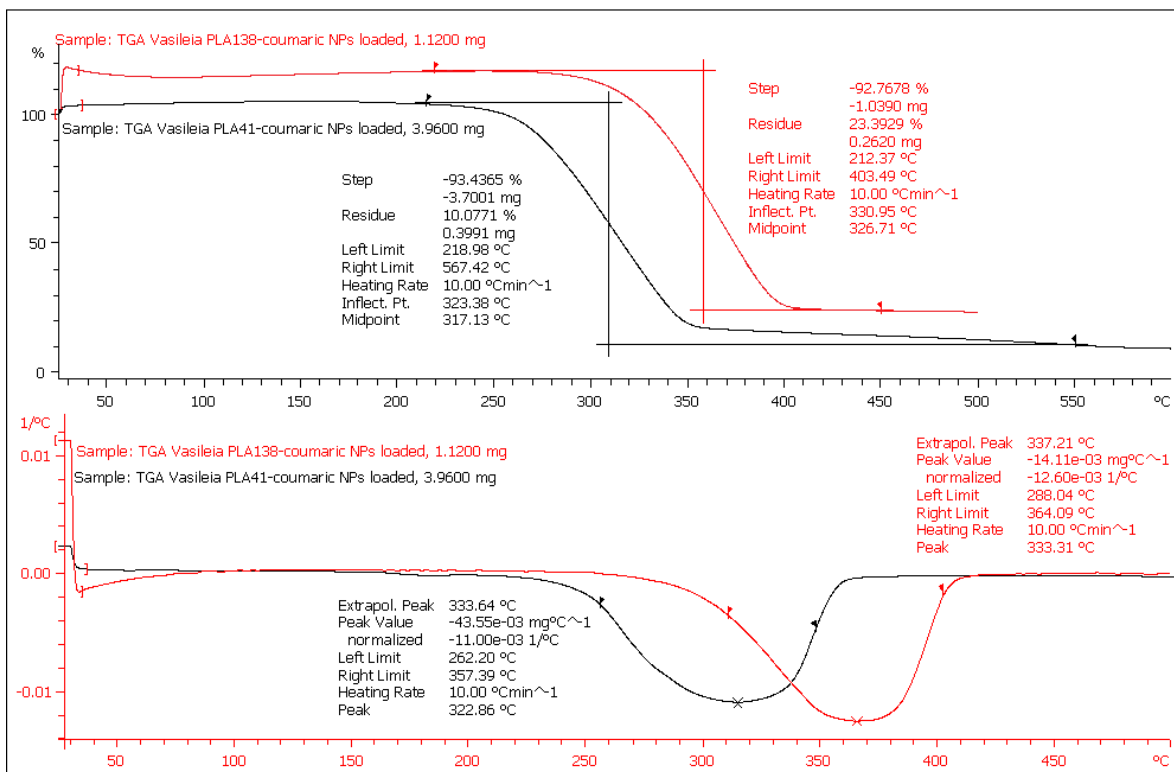
**Πίνακας 37:** Αποτελέσματα DSC για τα νανοσωματίδια πολυμερών

<b>Νανοσωματίδια</b>	<b>T<sub>g</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>m, πολυμερούς</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>m, πολυμερούς</sub> (J/g)</b>	<b>T<sub>m, ουσίας</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>m, ουσίας</sub> (J/g)</b>
A-ρ-κουμαρικό	56.0	142.7	32.12	190.9	13.28
A-ρ-μεθοξυκινναμικό	57.4	136.4	46.46	-	-
B-ρ-μεθοξυκινναμικό	56.0	137.3	29.87	-	-

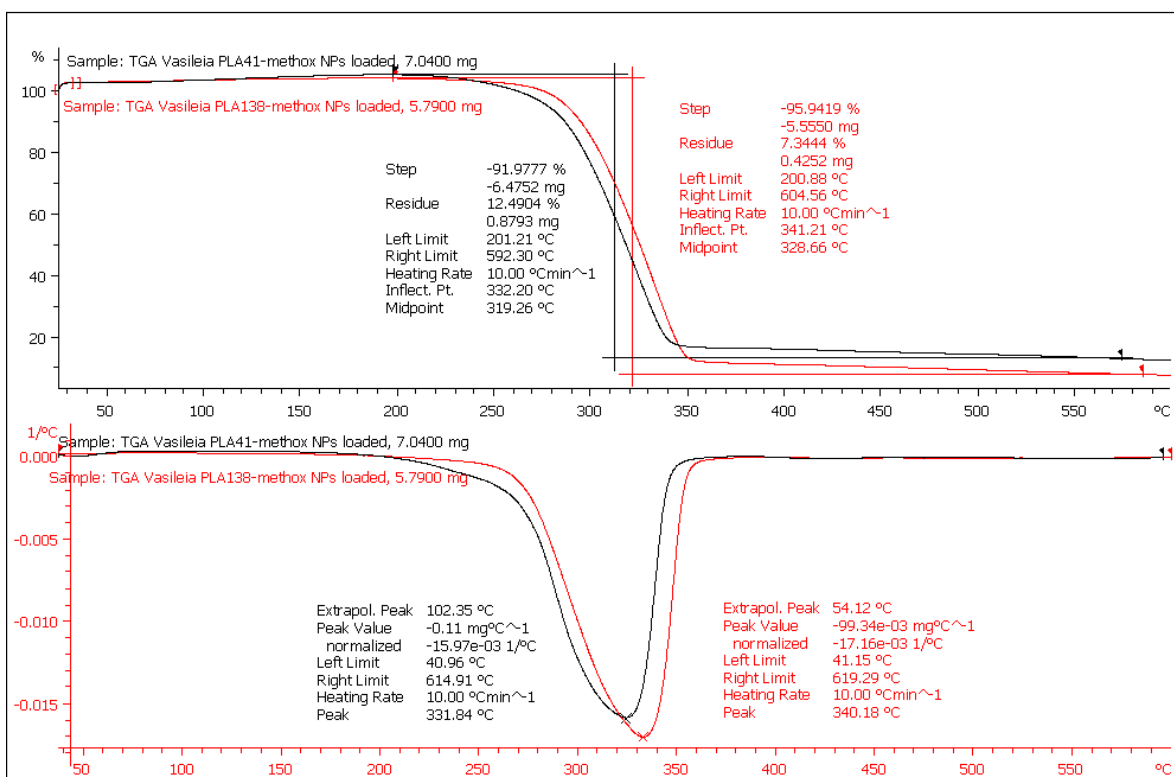
Από τα αποτελέσματα της Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης TGA παρατηρείται ότι η αποικοδόμηση των δραστικών ουσιών συμβαίνει ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του εκάστοτε πολυμερούς. Επίσης, παρατηρείται ότι η θερμοκρασία αποικοδόμησης T<sub>d</sub> είναι υψηλότερη στο Δείγμα πολυμερούς B από το Δείγμα πολυμερούς A, κάτι που δικαιολογείται λόγω του υψηλότερου μοριακού του βάρους.

**Πίνακας 38:** Αποτελέσματα TGA για τα νανοσωματίδια πολυμερών

<b>Νανοσωματίδια</b>	<b>T<sub>d</sub> (°C)</b>	<b>Απώλεια μάζας (%)</b>
A-ρ-κουμαρικό	322.9	10.1
A-ρ-μεθοξυκινναμικό	331.8	12.5
B-ρ-μεθοξυκινναμικό	340.2	7.34



Σχήμα 39: Καμπύλη TGA για τα νανοσωματίδια που περιέχουν ρ-κουμαρικό οξύ



Σχήμα 40: Καμπύλη TGA για τα νανοσωματίδια που περιέχουν ρ-μεθοξικιναμικό οξύ

## Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η παραγωγή προϊόντων με στοχευμένη δράση σε ιστούς και κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, οδηγώντας την επιστημονική κοινότητα σε αναζήτηση και βελτιστοποίηση της τεχνικής του εγκλεισμού δραστικών ουσιών/φαρμάκων σε νανοσωματίδια. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός δύο αντιοξειδωτικών ενώσεων, του p-κουμαρικού οξέος και του p-μεθοξικιναμικού οξέος σε ποσοστό 20 % (drug loading) σε νανοσφαίρες πολυ(γαλακτικού οξέος) δύο μοριακών βαρών (Δείγμα A,  $\overline{M}_v = 41000$  g/mol και Δείγμα B,  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol) και μελέτη της αναμειξιμότητας ουσίας-πολυμερούς μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Στόχος ήταν η χρήση του DSC ως ένα έγκυρο, γρήγορο και αξιόπιστο εργαλείο για την πρόβλεψη της απόδοσης εγκλεισμού των ουσιών στα διαφορετικά πολυμερή και τον σχεδιασμό της κατάλληλης διεργασίας παραγωγής συστήματος αποδέσμευσης φαρμάκου.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα φυσικά μείγματα των δραστικών ουσιών με τις δύο ποιότητες πολυ(γαλακτικού οξέος), με σκοπό τον προσδιορισμό της διαλυτότητας της εκάστοτε ουσίας στο πολυμερές στη θερμοκρασία τήξης μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC). Αυτό πραγματοποιήθηκε με τον γραμμικό συσχετισμό της περιεκτικότητας της ουσίας στα φυσικά μείγματα με την ενθαλπία τήξης της ουσίας. Έτσι, από την αποτέμνουσα της προκύπτουσας ευθείας βρέθηκε το σημείο μηδενικής ενθαλπίας τήξης και η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο σημείο αυτό, είναι η διαλυτότητα ή η μέγιστη αναμειξιμότητα της ουσίας και του πολυμερούς στη θερμοκρασία τήξης αυτού. Με άλλα λόγια, το πολυμερές κατά την τήξη του διαλυτοποιεί την ουσία και άρα δεν υφίσταται η έννοια της «τήξης» της δραστικής ουσίας. Με βάση τις αποτέμνουσες, και για τις δύο ουσίες μεγαλύτερη αναμειξιμότητα υπήρξε με το πολυ(γαλακτικό οξύ) μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Δείγμα B,  $\overline{M}_v = 138000$  g/mol), προφανώς λόγω του εντόνότερου υδρόφοβου χαρακτήρα. Αντίστοιχο συμπέρασμα, προέκυψε και συγκρίνοντας ανά πολυμερές τις δυο δραστικές ουσίες: μεγαλύτερη αναμειξιμότητα εμφάνισε το p-μεθοξικιναμικό οξύ λόγω της πιο υδρόφοβης φύσης του σε σχέση με το p-κουμαρικό οξύ,

καθώς το υδρογόνο του υδροξυλίου του ρ-κουμαρικού οξέος αντικαθίσταται από μία μεθυλομάδα στο ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε και πειραματικά ο εγκλεισμός των δύο ουσιών στα διαφορετικά πολυμερή με την μέθοδο της γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Οι δύο ουσίες εγκλείστηκαν με επιτυχία, και η μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency) και για τις δύο ουσίες παρουσιάστηκε στο πολυ(γαλακτικό οξύ) μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Δείγμα Β,  $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ ). Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίστηκε με δύο τρόπους, άμεσα και έμμεσα. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και οι δύο τρόποι υπολογισμού της απόδοσης εγκλεισμού, παρουσιάζοντας μικρή απόκλιση. Στην παρούσα εργασία, η άμεση απόδοση εγκλεισμού ήταν μεγαλύτερη από την έμμεση στα τρία από τα τέσσερα δείγματα. Τέλος, να αναφερθεί ότι το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού στα νανοσωματίδια από ότι το ρ-κουμαρικό οξύ.

Συγκρίνοντας τα DSC αποτελέσματα της αναμειξιμότητας με τις αποδόσεις εγκλεισμού των ουσιών, παρατηρείται ότι είναι σε συμφωνία, δηλαδή ακολουθείται η ίδια σειρά τόσο στην αναμειξιμότητα όσο και στην απόδοση εγκλεισμού. Μάλιστα αξίζει να τονιστεί ότι το DSC αποτελεί μία ακριβή μέθοδο προσδιορισμού της διαλυτότητας, καθώς μικρές διαφορές της μέγιστης αναμειξιμότητας (0.916% για το ρ-κουμαρικό οξύ και 1.336% για το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ) αντιστοιχούν σε σημαντικές διαφορές στην απόδοση εγκλεισμού (encapsulation efficiency) στο πείραμα. Το ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη αναμειξιμότητα με το Δείγμα πολυμερούς Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ ) και μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού σε αυτό. Ακολουθεί, ρ-μεθοξυκιναμικό οξύ με το Δείγμα πολυμερούς Α ( $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ ), το ρ-κουμαρικό οξύ με το Δείγμα πολυμερούς Β ( $\overline{M}_v = 138000 \text{ g/mol}$ ) και τέλος το ρ-κουμαρικό οξύ με το Δείγμα πολυμερούς Α ( $\overline{M}_v = 41000 \text{ g/mol}$ ). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πολυμερές-Ουσία	Μοριακό βάρος (g/mol) PLA	DSC μέγιστη Αναμειξιμότητα (%)	Έμμεση απόδοση εγκλεισμού (%)	Άμεση απόδοση εγκλεισμού (%)
A-ρ-κουμαρικό	41000	3.847	9.22	10.70
B- ρ-κουμαρικό	138000	4.763	17.95	13.71
A- ρ-μεθοξυκιναμικό	41000	9.63	35.01	41.29
B- ρ-μεθοξυκιναμικό	138000	10.966	56.28	63.23

Πρέπει να αναφερθεί ωστόσο ότι η μελέτη διαλυτότητας με την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης περιορίζεται από μία αναγκαία συνθήκη. Η θερμοκρασία τήξης της δραστικής ουσίας πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το υλικό που πρόκειται να αποτελέσει την μήτρα. Αυτή η συνθήκη αποτελεί περιορισμό για την ανάλυση διαλυτότητας καθώς πρέπει να γίνει πρώτα η τήξη της μήτρας όπου σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται και η μερική ή ολική διάλυση της δραστικής ουσίας σε αυτήν. Ένα επιπλέον συμπέρασμα, που προκύπτει από τα αποτελέσματα, είναι ότι η μελέτη διαλυτότητας θεωρείται πιο ακριβής για υδρόφοβες ουσίες, καθώς σε χαμηλές τιμές μέγιστης αναμειξιμότητας, όπως είναι η περίπτωση του ρ-κουμαρικού οξέος ή και από τη βιβλιογραφία (Bragagni, 2013) για υδρόφιλες ενώσεις όπου η μέγιστη αναμειξιμότητα είναι κάτω από 1%, το αποτέλεσμα μπορεί να εμπεριέχει το σφάλμα της ολοκλήρωσης των αναλύσεων DSC.

Ως προς τον υπόλοιπο χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων, το σύστημα διαλυτών ακετόνης-νερού οδήγησε σε ικανοποιητικό μέγεθος νανοσωματιδίων από 216.0 nm έως 336.9 nm με δείκτη πολυδιασποράς PDI αρκετά χαμηλό, από 0.039 έως 0.205 και ζ-δυναμικό από -2.9 mV έως -13.7 mV. Τέλος, η απόδοση της διεργασίας (yield) των εγκλεισμών ουσιών σε νανοσωματίδια PLA κυμάνθηκε από 5.0 % έως 56.7 %.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) μπορεί να θεωρηθεί ένα αξιόπιστο και γρήγορο εργαλείο για τον σχεδιασμό συστημάτων νανοσωματιδίων για την ελεγχόμενη και στοχευμένη αποδέσμευση δραστικών ουσιών. Ωστόσο, η διαλυτότητα-αναμειξιμότητα της δραστικής ουσίας από την ανάλυση DSC δεν μπορεί να είναι ο μοναδικός παράγοντας για την ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων.

Με γνώμονα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν προτείνονται οι εξής προτάσεις για μελλοντικές έρευνες:

❖ Χρήση άλλης πολυμερικής μήτρας

Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον οι ίδιες ενώσεις να εγκλειστούν σε διαφορετικό υλικό πολυμερούς ή σε κάποιο συμπολυμερές του πολυ(γαλακτικού οξέος), όπως είναι το πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (PLGA) ή ακόμη αν γινόταν επικάλυψη των νανοσωματιδίων με πολυ-αιθυλενογλυκόλη (PEG), ώστε να εξετασθεί κατά πόσο μεταβάλλεται το μέγεθος και η σταθερότητα των νανοσωματιδίων, και τέλος η απόδοση εγκλεισμού αυτών. Επίσης, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και ο εγκλεισμός των δύο ουσιών σε ακόμα ένα μοριακό βάρος πολυ(γαλακτικού οξέος), έτσι ώστε η μελέτη διαλυτότητας να πραγματοποιηθεί συνολικά σε τρία δείγματα PLA.

❖ Μελέτη διαλυτότητας υδρόφοβων ενώσεων

Παρουσιάζεται ενδιαφέρον να εφαρμοσθεί η μελέτη διαλυτότητας μέσω της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε μη-υδατοδιαλυτές ουσίες και ο συσχετισμός της με την απόδοση εγκλεισμού αυτών σε πολυμερική ή άλλη μήτρα.

❖ Χρήση άλλης μεθόδου σύνθεσης νανοσωματιδίων

Έχοντας υπόψιν ότι και οι δύο ουσίες που εγκλείστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι υδρόφιλες, θα μπορούσε να εξεταστεί ο εγκλεισμός τους με την μέθοδο διπλού γαλακτώματος με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη και ο συσχετισμός τους με τα αποτελέσματα διαλυτότητας από το DSC, που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί. Η τεχνική του διπλού γαλακτώματος πιθανότατα να επηρέαζε τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και την απόδοση εγκλεισμού.

❖ Μελέτη της αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ουσιών

Η ολοκλήρωση της μελέτης του εγκλεισμού απαιτεί την κατάστρωση του μηχανισμού αποδέσμευσης των εγκλεισμένων ουσιών από τα πολυμερικά νανοσωματίδια. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η μελέτη της αποδέσμευσης και συσχετισμός της με την μελέτη αναμειξιμότητας από το DSC με στόχο την καλύτερη πολυμερική μήτρα όσον αφορά την αποδέσμευση ουσιών.

❖ Μελέτη της δράσης των ουσιών

Γνωρίζοντας ότι οι δύο ουσίες έχουν αντιοξειδωτική δράση, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η δράση αυτή, παραδείγματος χάριν με ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε καλλυντική κρέμα ή με την μελέτη αλληλεπίδρασης των ουσιών με την ελεύθερη ρίζα DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο).

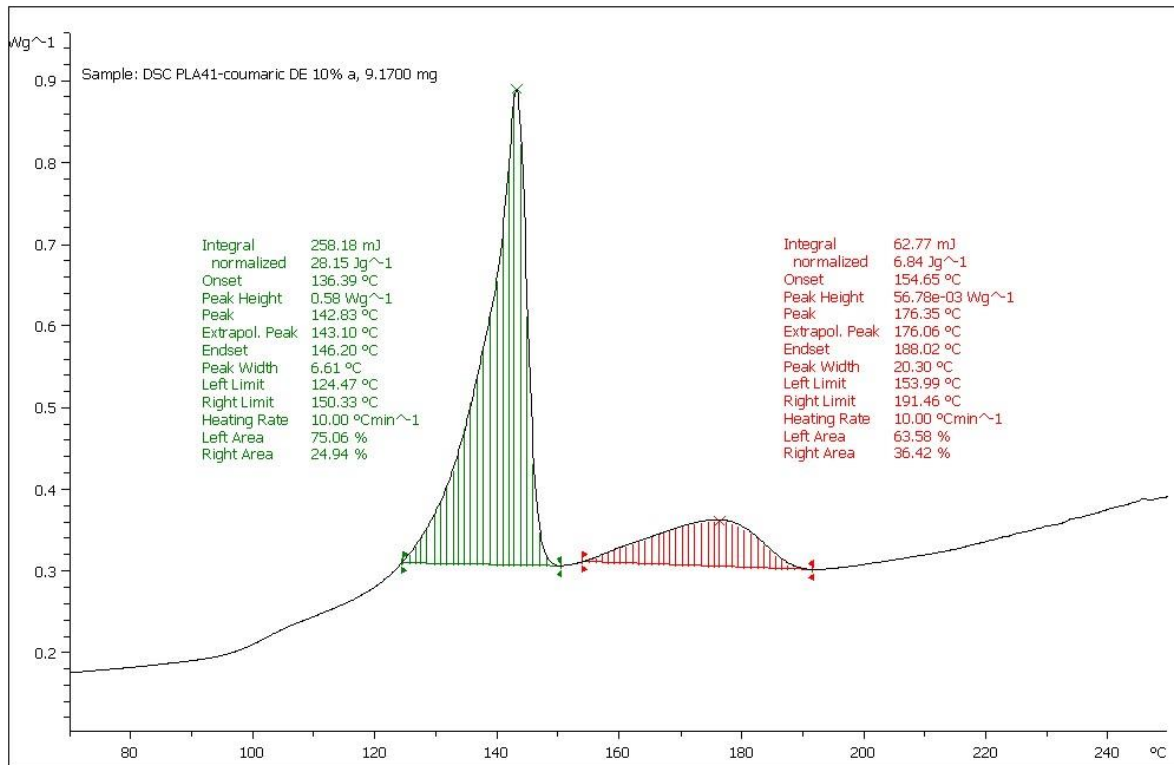
❖ Μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων

Στην παρούσα εργασία δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Προτείνεται λοιπόν, να πραγματοποιηθούν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης και σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, ώστε να είναι ολοκληρωμένη η μελέτη σταθερότητας του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

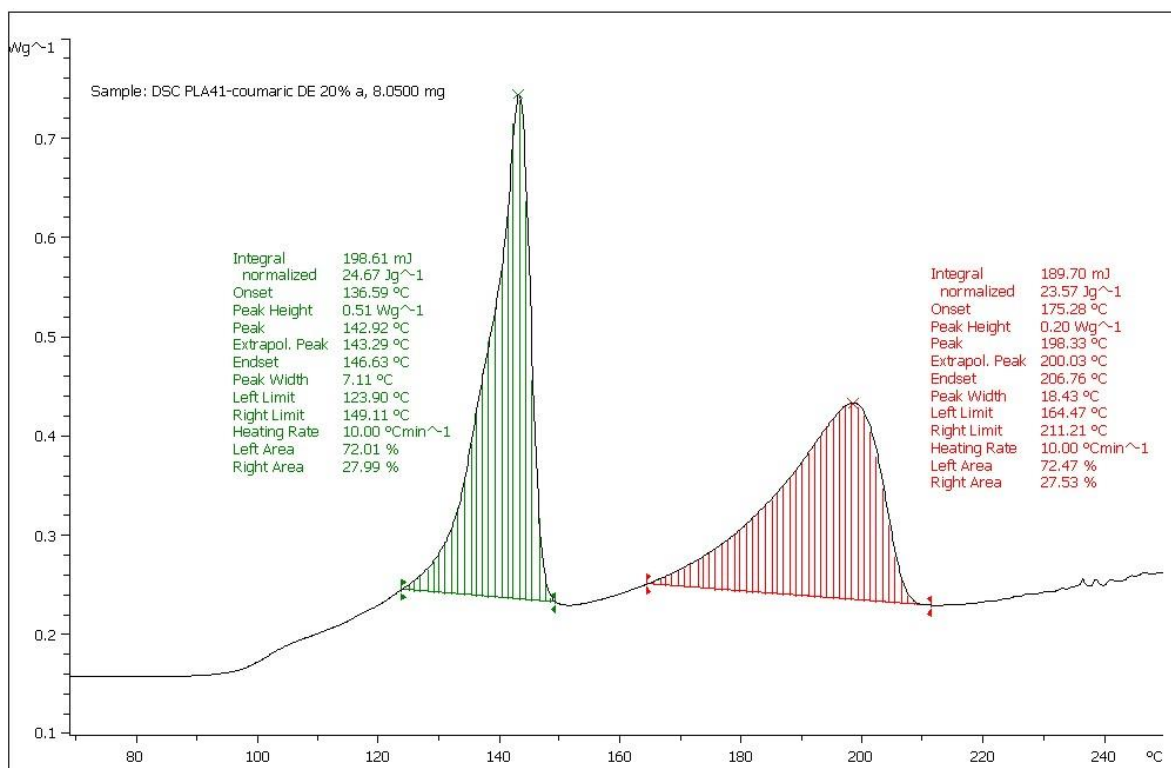


## Παράρτημα Α

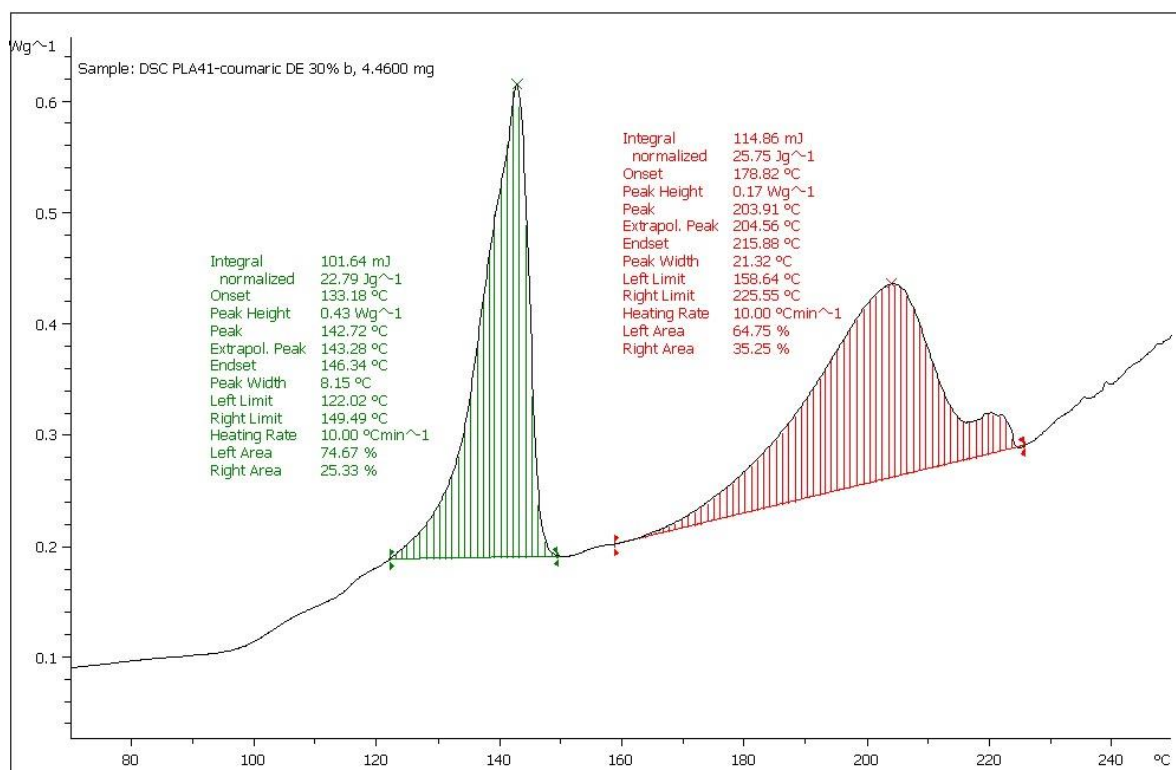
Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται τα γραφήματα των αναλύσεων DSC για τα φυσικά μείγματα του ρ-κουμαρικού οξέος.



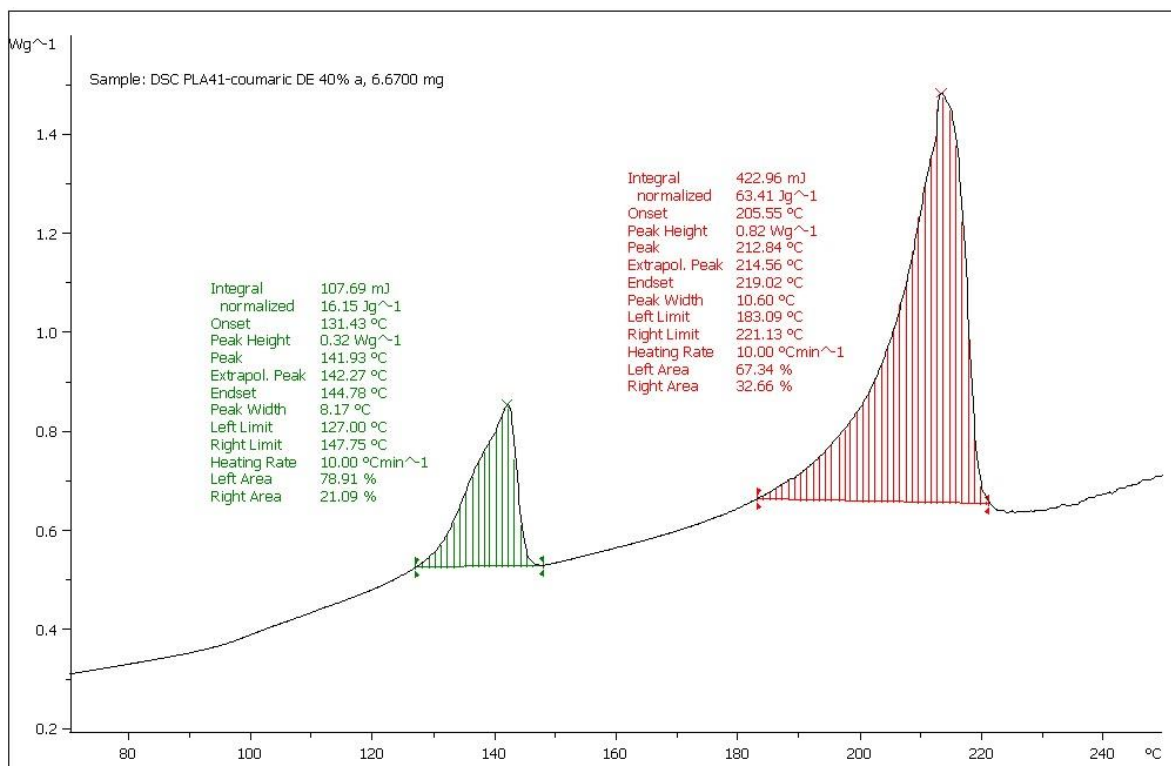
Σχήμα 41: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 10%



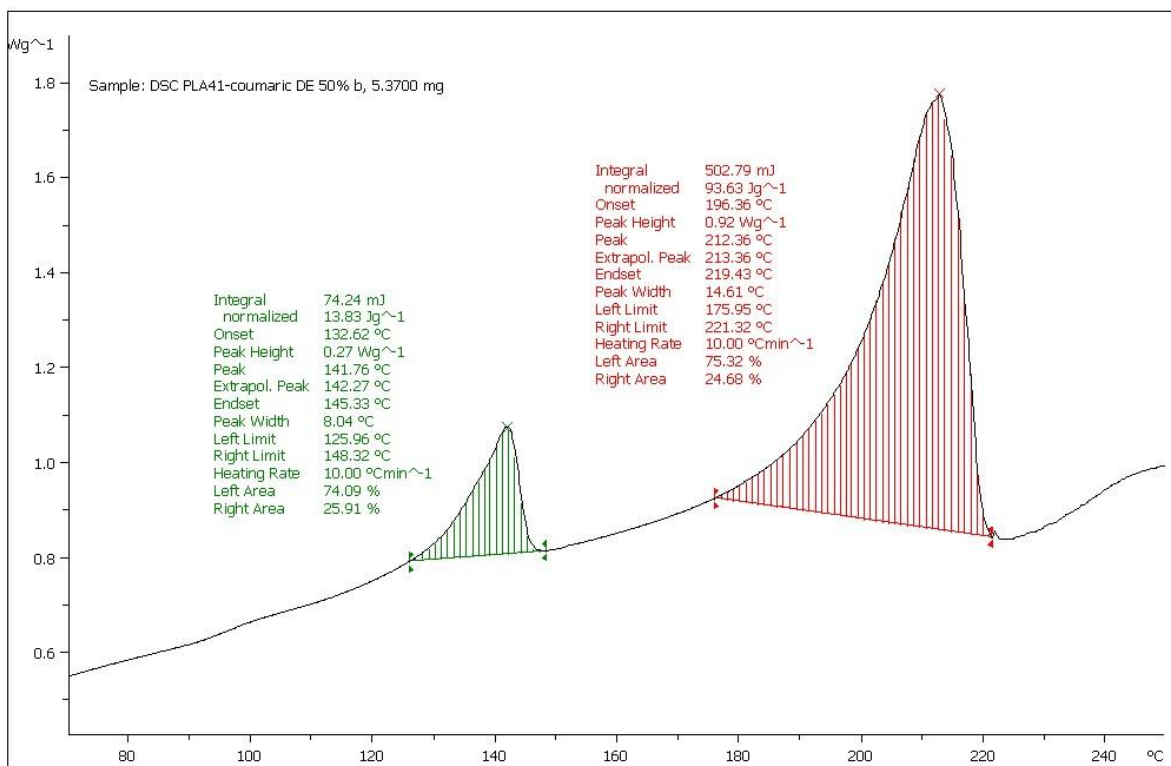
Σχήμα 42: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα A περιεκτικότητας 20%



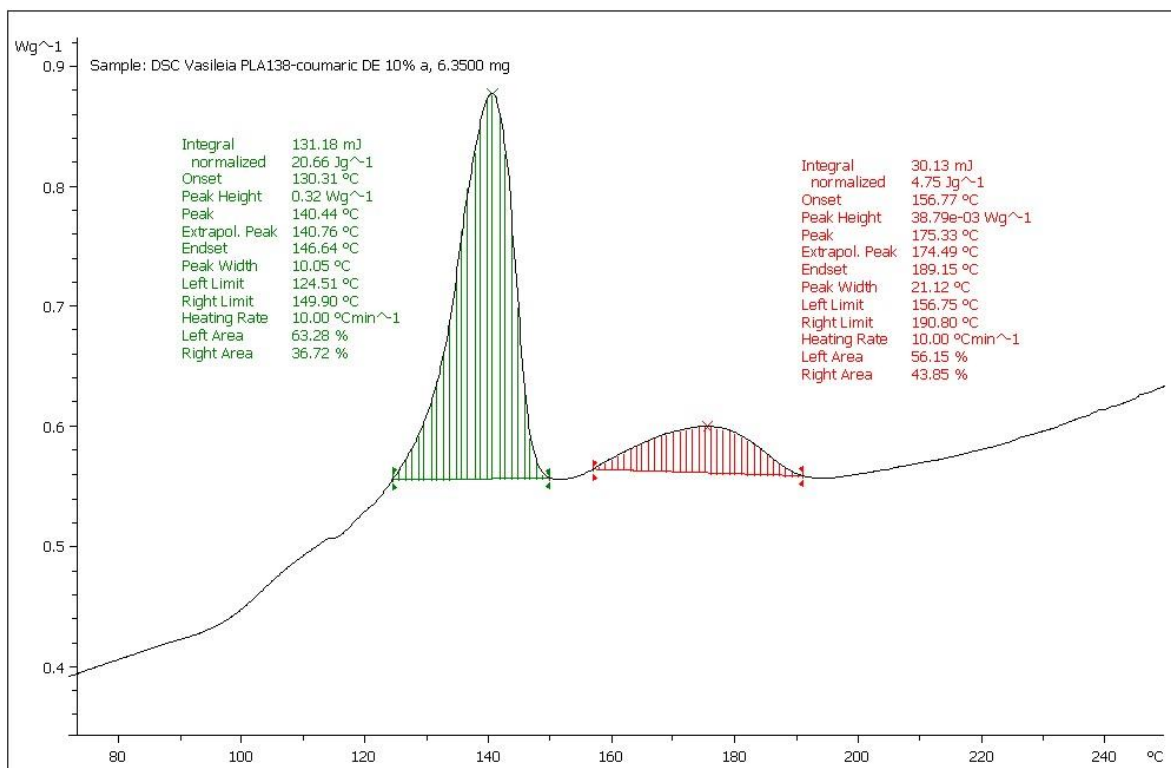
Σχήμα 43: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα A περιεκτικότητας 30%



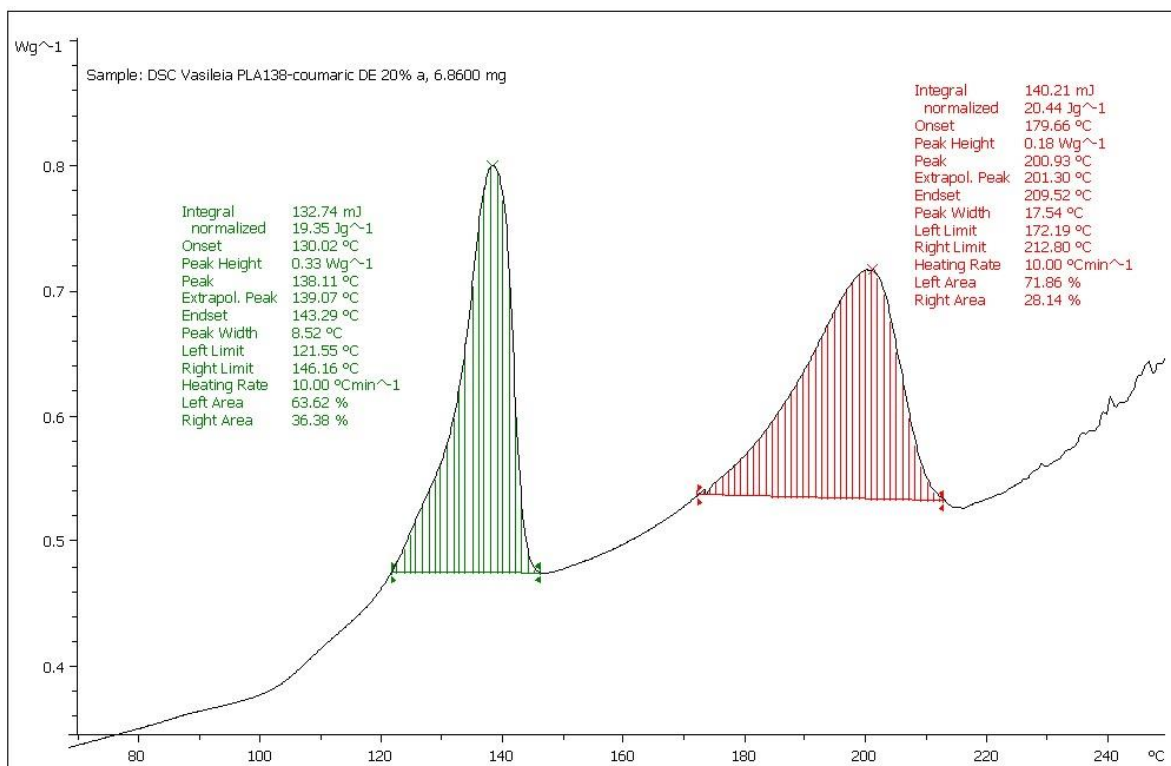
Σχήμα 44: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα A περιεκτικότητας 40%



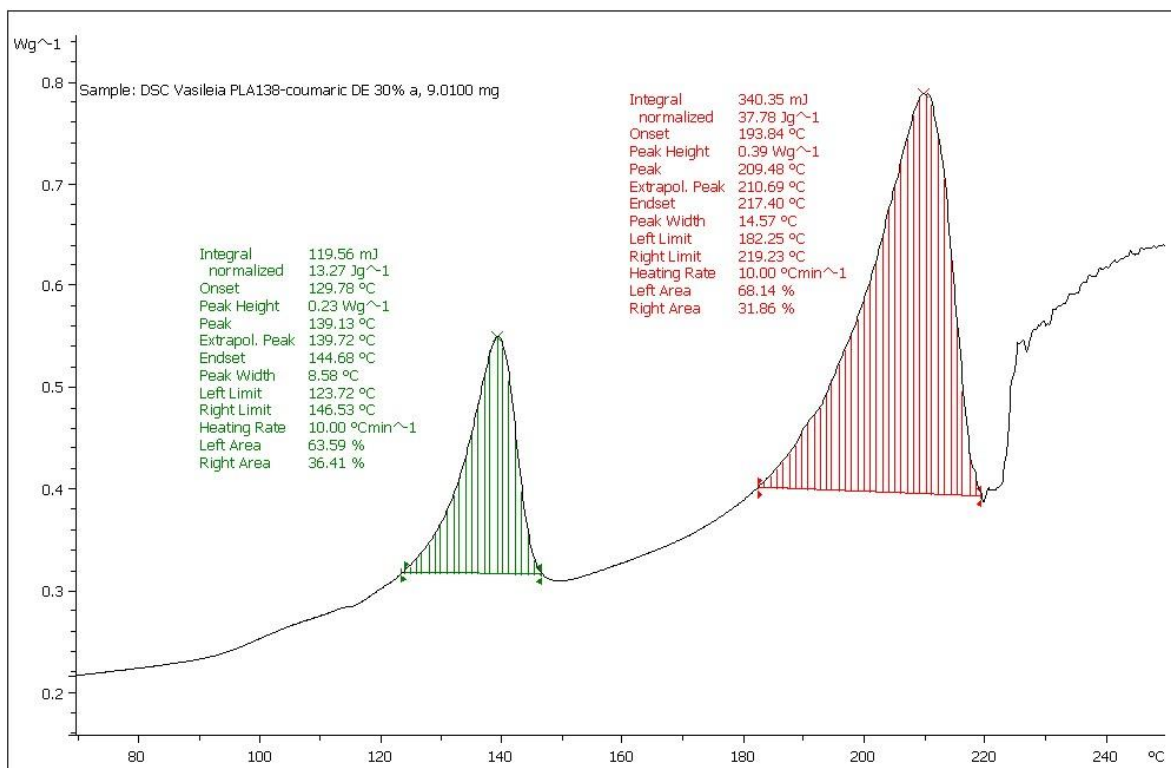
Σχήμα 45: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα A περιεκτικότητας 50%



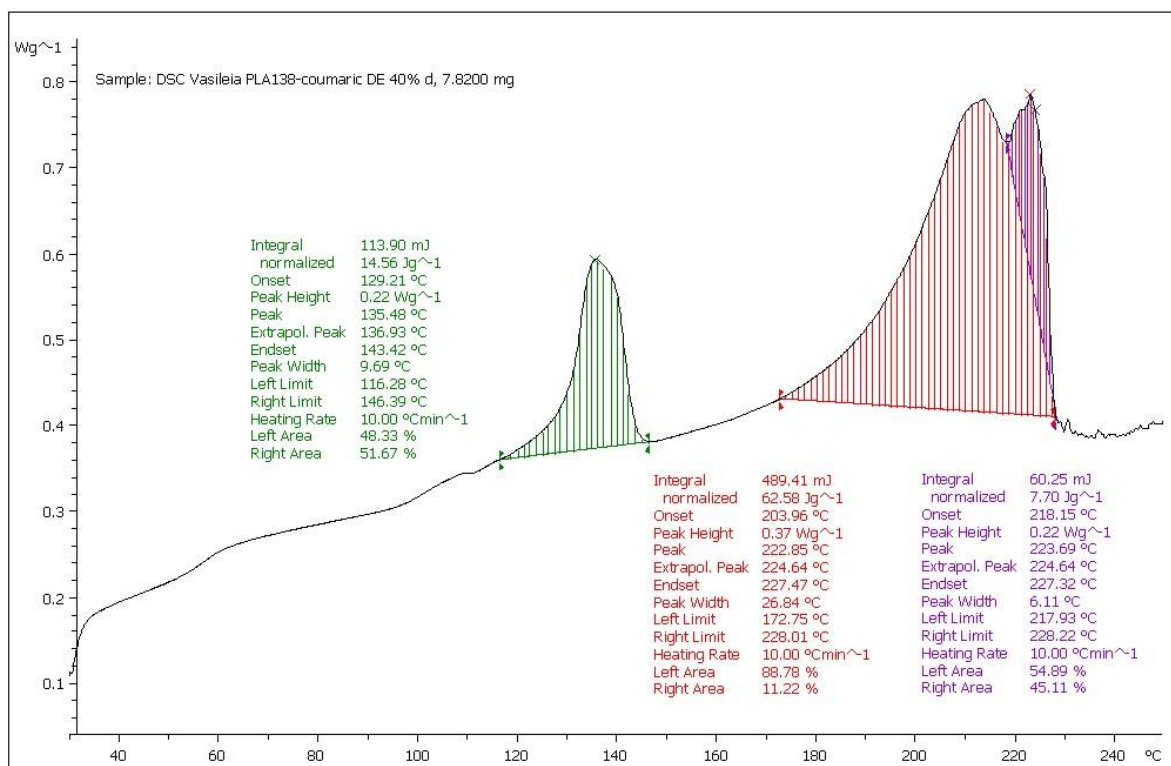
Σχήμα 46: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 10%



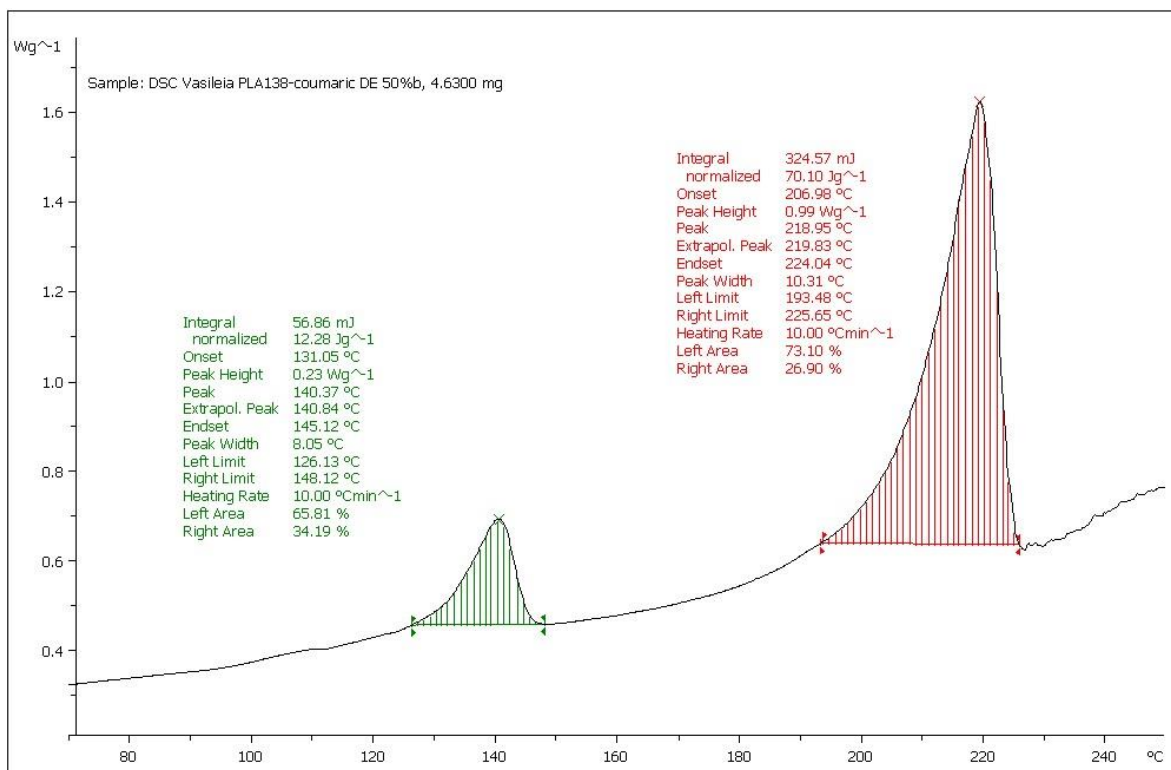
Σχήμα 47: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 20%



Σχήμα 48: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 30%



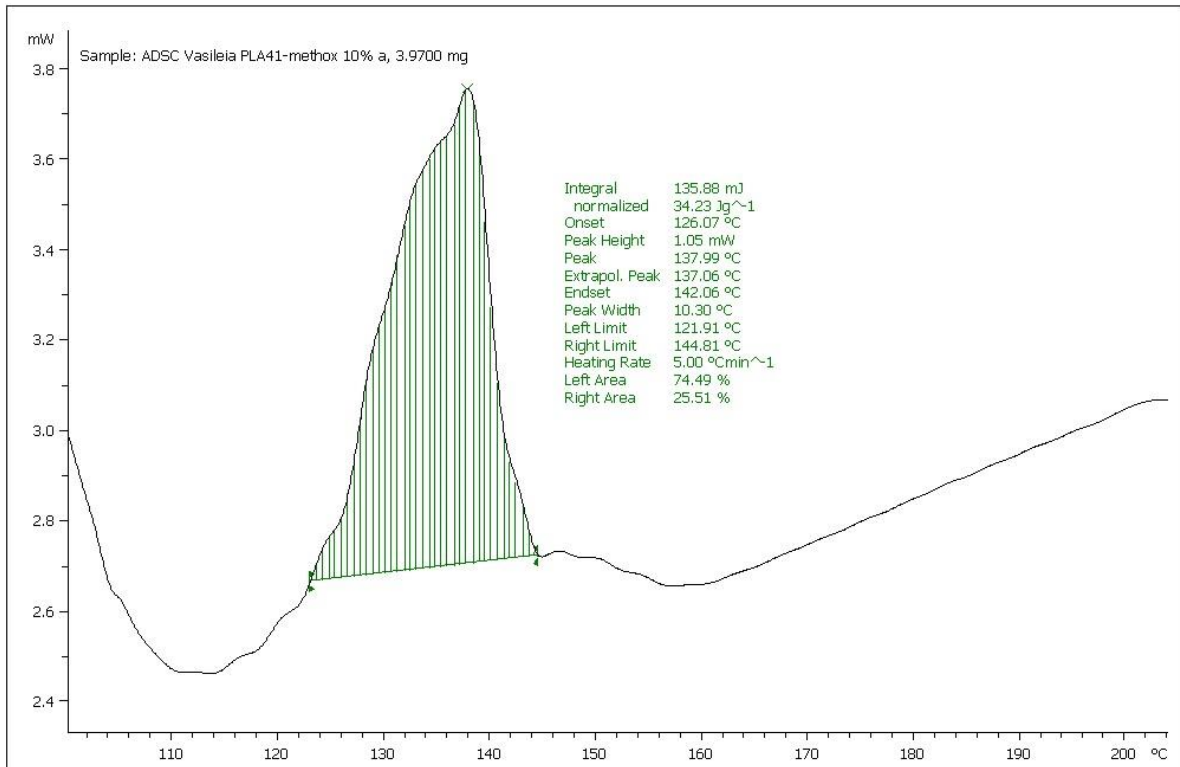
Σχήμα 49: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 40%



Σχήμα 50: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-κουμαρικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 50%

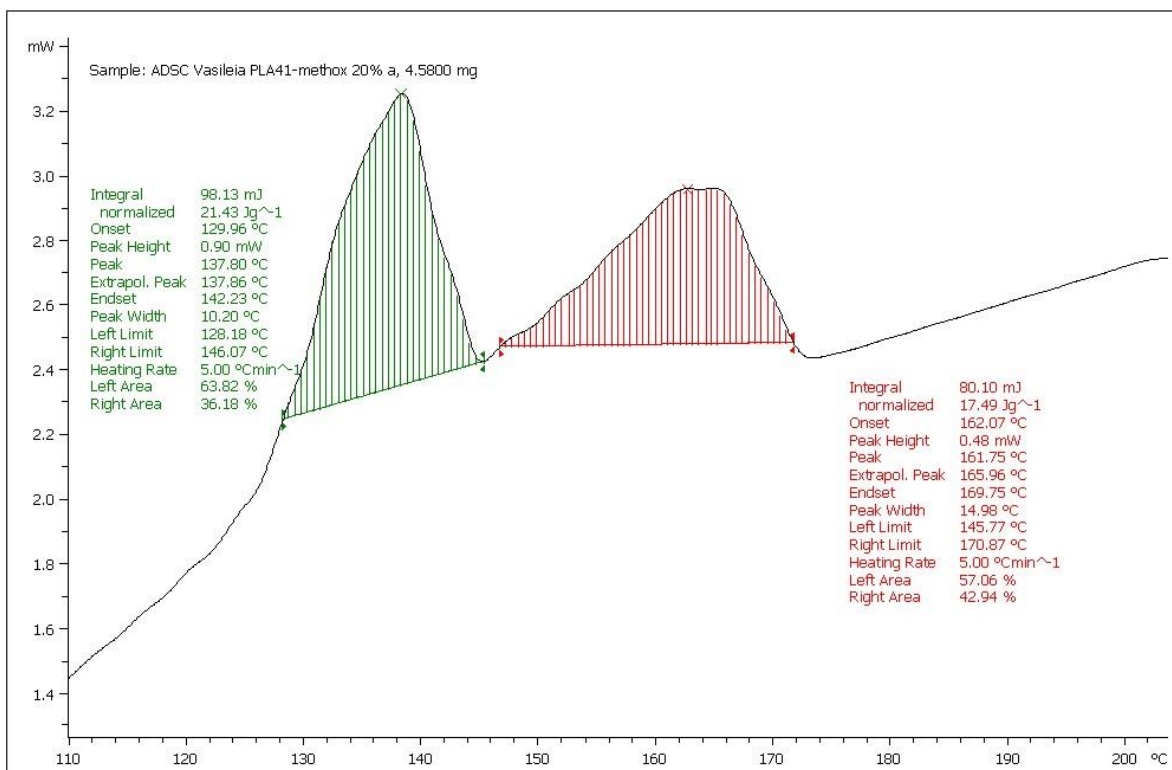
## Παράρτημα Β

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται τα γραφήματα των αναλύσεων DSC για τα φυσικά μείγματα του ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος.

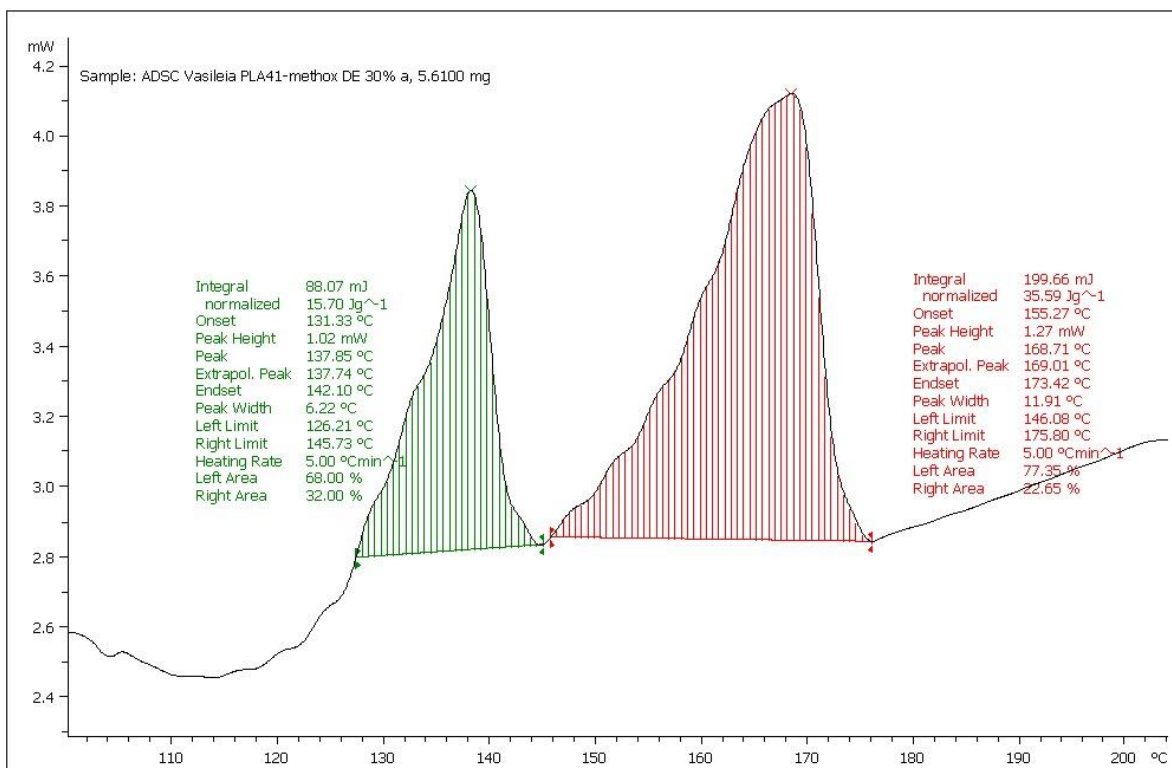


**Σχήμα 51:** Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 10%



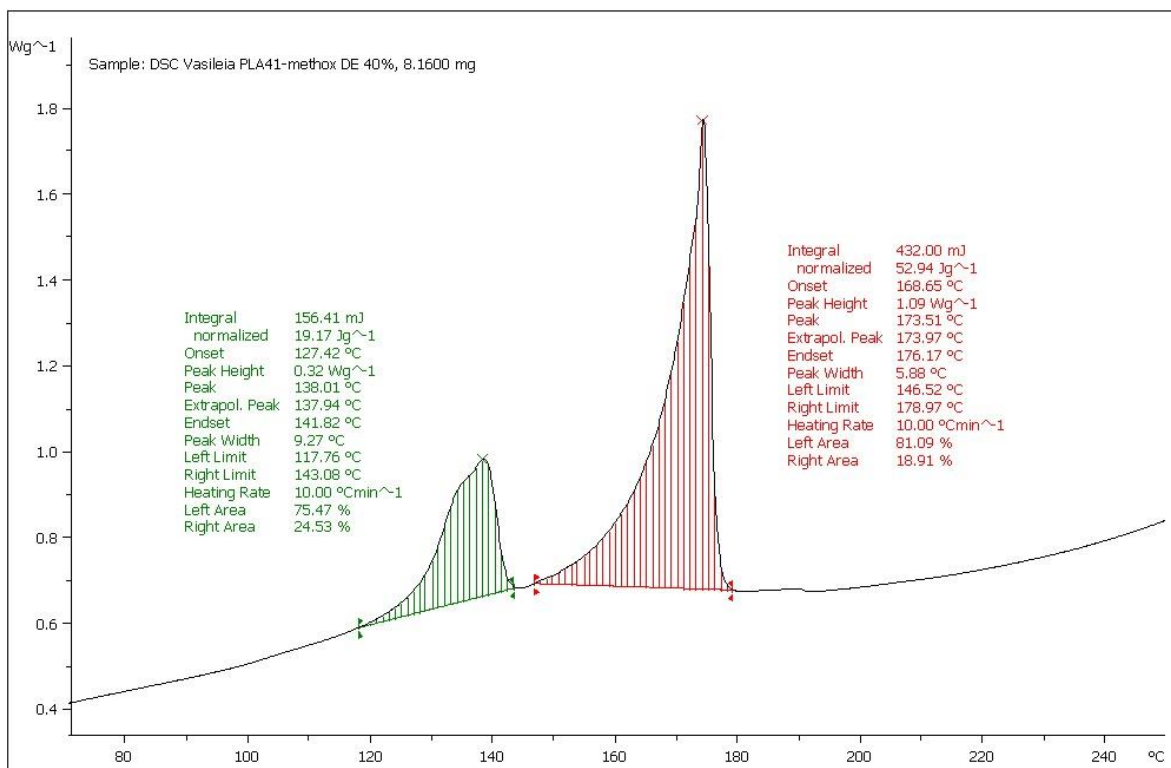


Σχήμα 52: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 20%

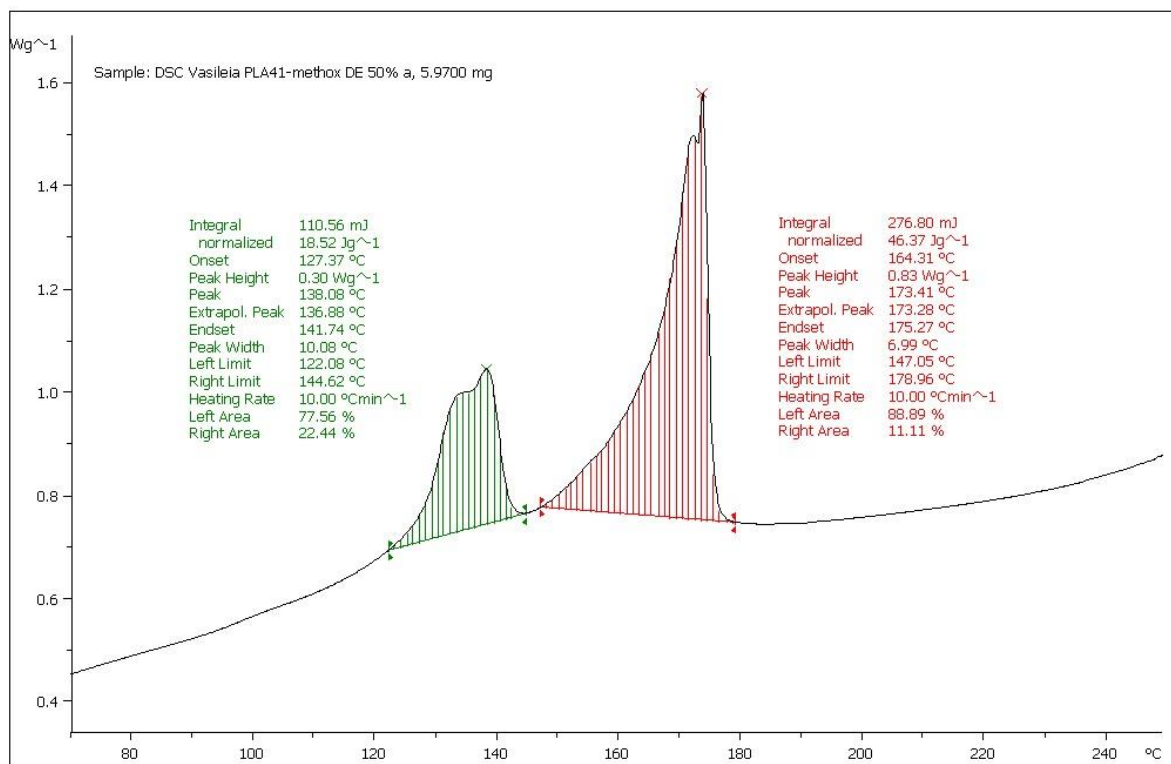


Σχήμα 53: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 30%

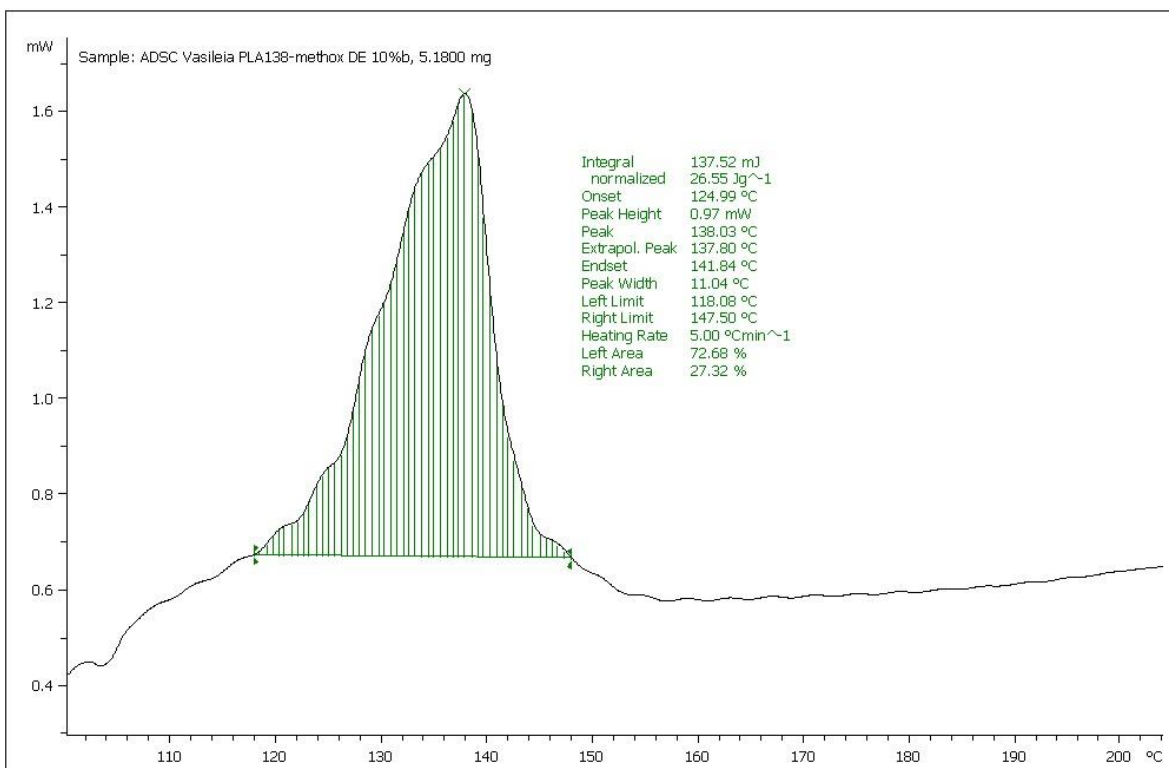




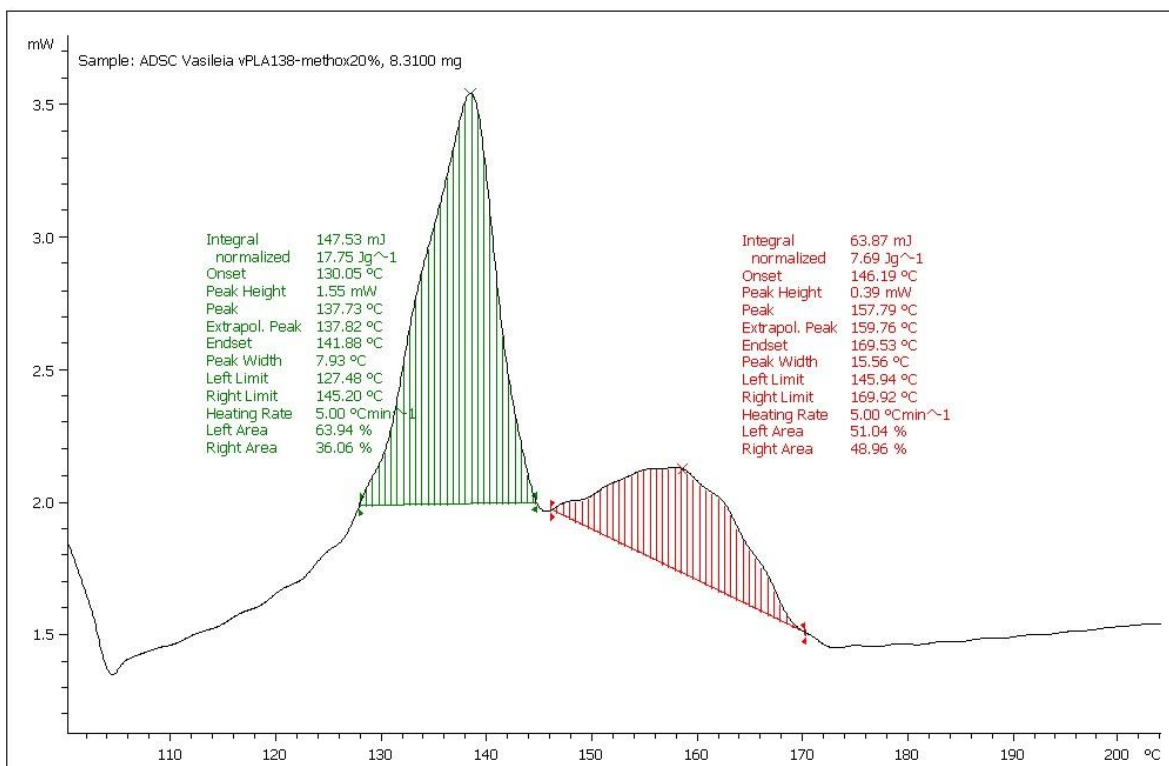
Σχήμα 54: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 40%



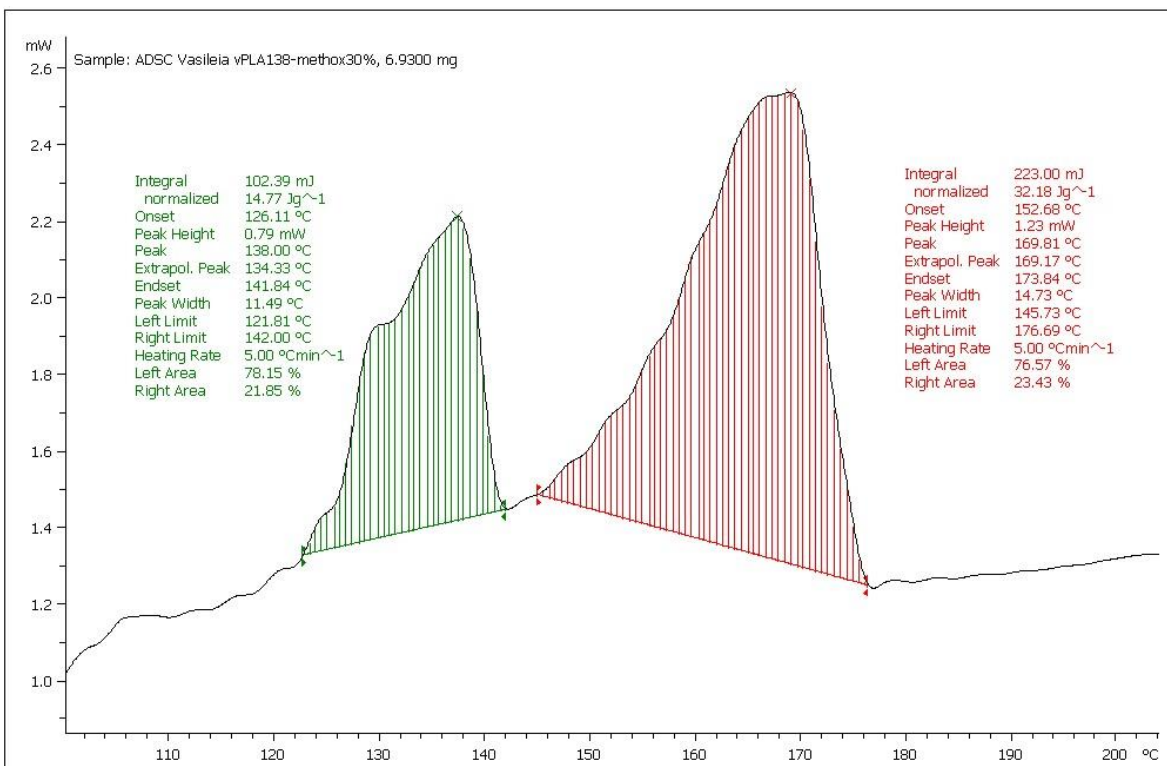
Σχήμα 55: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Α περιεκτικότητας 50%



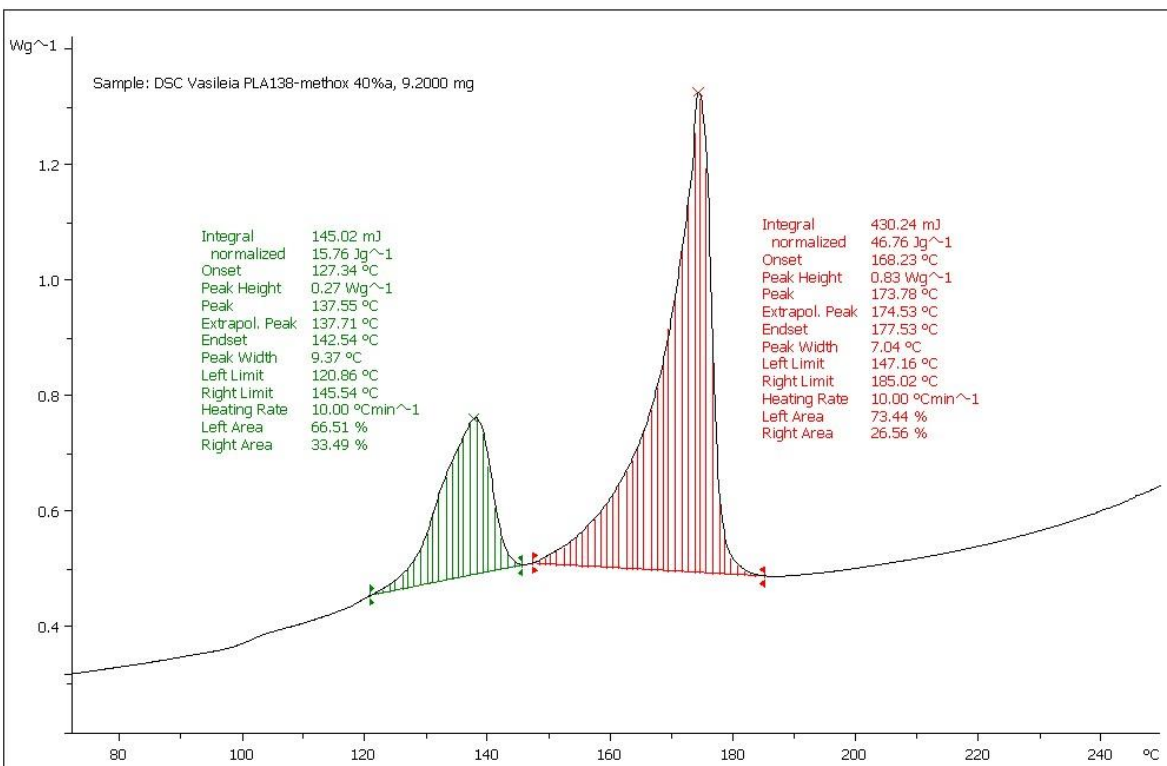
Σχήμα 56: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 10%



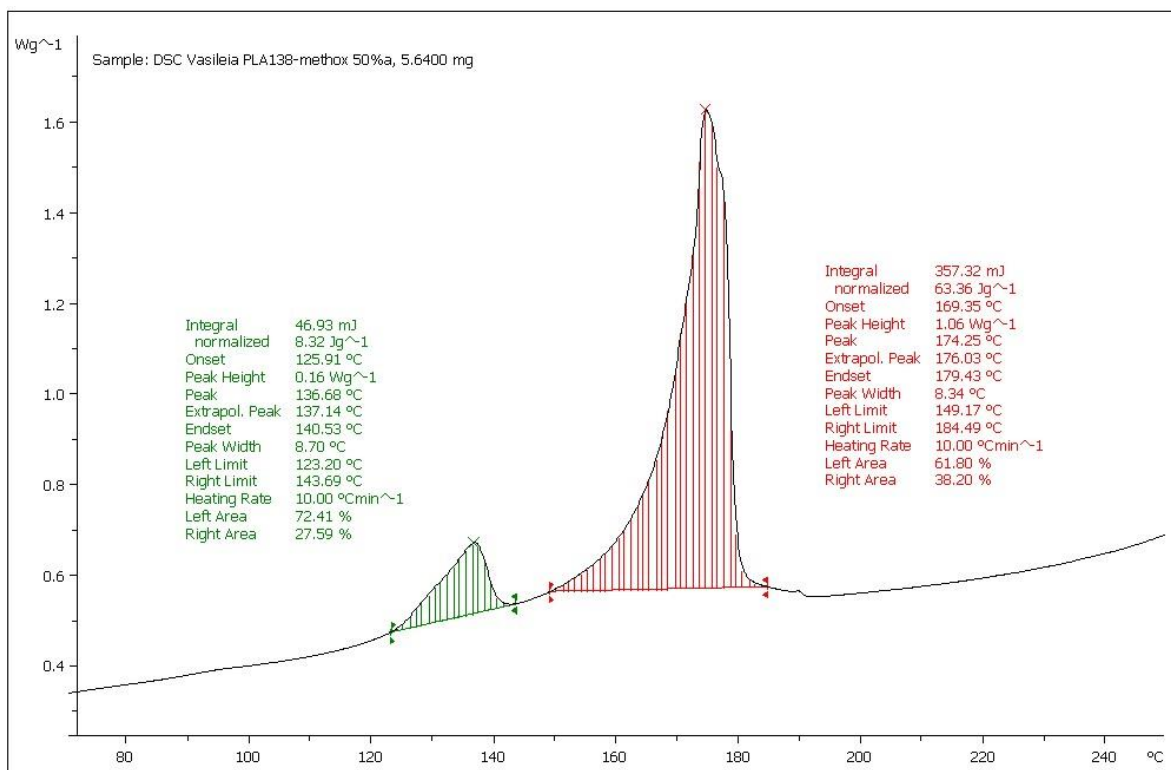
Σχήμα 57: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 20%



Σχήμα 58: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 30%



Σχήμα 59: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος ρ-μεθοξυκιναμικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 40%



Σχήμα 60: Καμπύλη DSC φυσικού μείγματος p-μεθοξικιναμικού οξέος με το Δείγμα Β περιεκτικότητας 50%