

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ (Ι) ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Μελέτη εγκλεισμού του φλαβονοειδούς χρυσίνη σε σωματίδια αλγινικού και επικάλυψη τους με χιτοζάνη

Διπλωματική εργασία

ΣΠΑΝΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ-ΡΑΦΑΕΛΛΑ

Επιβλέπουσα

ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π κα. Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, αλλά κατά κύριο λόγο για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική εργασία. Οι πολύτιμες συμβουλές και η εμπιστοσύνη που υπέδειξε προς το πρόσωπό μου με έκαναν να αγαπήσω πολύ το αντικείμενο της μελέτης μου και να προσπαθήσω για το καλύτερο αποτέλεσμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή επιτροπή για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τις υποψήφιες διδάκτορες Κατωπόδη Αννίτα και Ποντίλλο Νεφέλη για την απεριόριστη στήριξη και βοήθεια καθ'όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Η επιστημονική τους κατάρτιση, η εμπειρία τους στην διαχείριση οποιαδήποτε προβλήματος κι αν προέκυψε και κυρίως η προθυμία τους συντέλεσαν καθοριστικά στην ομαλή διεξαγωγή της εργασίας και το άψογο κλίμα συνεργασίας.

Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το πολύ ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθώς και για το ομαδικό πνεύμα.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την άενη συμπαράσταση όλα αυτά τα πέντε χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νανοτεχνολογία εφαρμόζεται ευρέως στον τομέα της Φαρμακευτικής τεχνολογίας καθώς επιτυγχάνει τον εγκλεισμό φαρμάκων σε διάφορους φορείς προσδίδοντας σημαντικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες. Η επιλογή του φορέα εγκλεισμού ενός φαρμάκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το προφίλ απελευθέρωσής του και σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την επιθυμητή εφαρμογή.

Το αλγινικό οξύ αποτελεί έναν από τους κυριότερους φορείς φαρμάκων καθώς είναι βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό με τον ανθρώπινο οργανισμό και κυρίως μη τοξικό. Πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από μονάδες α-Ι γουλουρονικού οξέος και β-d μαννουρονικού οξέος συνδεδεμένες με 1-4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα νανοσωματίδια αλγινικού διαθέτουν πληθώρα εφαρμογών σε πολλούς τομείς με τους κυριότερους να αποτελούν τα φάρμακα, τα καλλυντικά και τα τρόφιμα.

Άλλο ένα σημαντικό φυσικό πολυμερές με ευρεία χρήση στον τομέα της Φαρμακευτικής τεχνολογίας συνιστά η χιτοζάνη η οποία είναι μη τοξική και βιοαποικοδομήσιμη. Η χιτοζάνη λόγω της παρουσίας της αμινομάδας στο μόριό της είναι ιδιαιτέρως κατιονική και επομένως μόλις συνδέεται με το ανιονικό τμήμα του αλγινικού συμβάλλει στην δημιουργία νανοσωματιδίων που διαθέτουν σημαντικά βελτιωμένες ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη εγκλεισμού του φλαβονοειδούς χρυσίνη σε σωματίδια αλγινικού και η επικάλυψη τους με χιτοζάνη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε παρασκευή νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης μέσω σταυροσύνδεσης του αλγινικού με ιόντα χλωριούχου ασβεστίου. Έπειτα από δοκιμές προέκυψε ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας Tween80 συνέβαλε στην παρασκευή νανοσωματιδίων με καλύτερη ομοιομορφία και μεγαλύτερη σταθερότητα. Ειδικότερα, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού σε συγκεντρώσεις αλγινικού 0.06% w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v και αναλογίες χρυσίνης-αλγινικού 1:1, 1:2 και 3:4. Επομένως, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη διερεύνηση προκειμένου να προκύψουν οι βέλτιστες συνθήκες.

Συγκεκριμένα, από τις τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν (DLS, FT-IR) προέκυψε ότι καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισαν τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v και ειδικότερα τα νανοσωματίδια με αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 με μέγεθος 191 ± 7.8 nm, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) 0.3 ± 0.02 και ζ- δυναμικό -37 ± 4.65mV .

Ακολούθησε, παρασκευή νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων. Παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης-αλγινικού εμφάνισαν σημαντικά

μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με τα νανοσωματίδια αλγινικού. Τα νανοσωματίδια αλγινικού με επικάλυψη χιτοζάνης παρουσίασαν το μικρότερο μέγεθος για συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 με μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 131.7 ± 13.5 nm, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) 0.39 ± 0.05 και ζ-δυναμικό 33.93 ± 0.75 mV.

Τέλος, μελετήθηκε η σταθερότητα των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v με αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 μετά από διάστημα τριών μηνών. Τα αποτελέσματα όπως προέκυψαν από την μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια αλγινικού εμφανίζουν σημαντική σταθερότητα έχοντας μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 191.1 ± 11.20 nm, δείκτη πολυδιασποράς 0.429 ± 0.005 και ζ-δυναμικό -29.2 ± 3.7 mV.

Επιστημονική περιοχή: Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία

Λέξεις-κλειδιά: νανοσωματίδια, αλγινικό, χιτοζάνη, χρυσίνη, αντιοξειδωτική δράση.

ABSTRACT

Nanotechnology is widely applied in the field of Pharmaceutical technology as it achieves the encapsulation of drugs in various carriers giving important physicochemical and biological properties. The choice of the appropriate drug carrier, depends on many factors, such as its release profile, and it is closely related to the desired application.

Alginate is one of the main drug carriers as it is biodegradable, biocompatible and non-toxic. It is a polysaccharide that consists of units of a-l glucuronic acid and b-d mannuronic acid linked by 1-4 glycosidic bonds. Alginate nanoparticles have a variety of applications in a lot of fields, with the major being pharmaceuticals, cosmetics and food.

Another important physical polymer widely used in the pharmaceutical field is chitosan, which is non-toxic and biodegradable as well. Chitosan due to the amino group in its molecule, is able to be linked with the negative part of alginate, resulting in the creation of nanoparticles with significantly improved properties.

The purpose of this diploma thesis is to study the encapsulation of the flavonoid chrysin in alginate nanoparticles and their coating with chitosan.

Initially, alginate-chrysin nanoparticles were prepared by crosslinking of alginate with the ions of calcium chloride. It was determined that the use of Tween80 which acts as a surfactant led to nanoparticles with better uniformity and higher stability. Particularly, alginate nanoparticles were prepared at alginate concentrations 0.06%w/v, 0.04%w/v, 0.02%w/v and alginate-chrysin ratios 1:1, 1:2 and 3:4. It is worth emphasizing that an in - depth investigation was carried out in order to achieve the optimum conditions for the alginate nanoparticles synthesis.

Particularly, all the characterization techniques of alginate nanoparticles (DLS, FT-IR) showed that the nanoparticles prepared at alginate concentration 0.06%w/v had the best results. Particularly, the alginate nanoparticles prepared at 0.06%w/v and in chrysin-alginate ratio 3:4 had the better values with size 191 ± 7.8 nm, polydispersity index (PDI) 0.3 ± 0.02 and zeta potential -29.2 ± 3.7 mV.

Subsequently, preparation of alginate-chitosan nanoparticles was performed using two different methods. It was observed that alginate-chitosan nanoparticles showed a significantly reduced size in comparison with the alginate nanoparticles. Chitosan-coated alginate nanoparticles exhibited the smallest size for alginate concentration 0.06%w/v and chrysin-alginate ratio 3:4 with average hydrodynamic value 131.7 ± 13.5 nm, polydispersity index (PDI) 0.39 ± 0.05 and zeta potential 33.93 ± 0.75 mV.

Finally, the stability of nanoparticles prepared at alginate concentration 0.02%w/v and chrysin-alginate ratio 3:4 was studied after three months. The results which were conducted from DLS showed that alginate nanoparticles exhibited an important stability with average hydrodynamic diameter 191.1 ± 11.20 nm, polydispersity index (PDI) 0.429 ± 0.005 and zeta potential -29.2 ± 3.7 mV.

Scientific area: Medicinal chemistry, Nanotechnology,

Keywords: nanoparticles, alginate, chitosan, chrysin, antioxidant activity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1. Νανοτεχνολογία.....	11
1.1 Νανοσωματίδια	11
1.2 Πλεονεκτήματα νανοσωματιδίων.....	11
1.3 Επίδραση στον τομέα της Ιατρικής-Φαρμακευτικής.....	12
1.1.1 Σύγκριση μεθόδων χορήγησης φαρμάκου	12
1.1.2 Επιλογή φορέα ενθυλάκωσης φαρμάκου	12
2. Φυσικά πολυμερή.....	13
2.1 Αλγινικό.....	13
2.1.1.1 Προέλευση αλγινικού	13
2.1.1.2 Χημική δομή αλγινικού	14
2.1.1.3 Ιδιότητες αλγινικού άλατος.....	15
2.1.1.4 Εφαρμογές αλγινικού.....	16
2.1.1.5 Σχηματισμός νανοσωματιδίων αλγινικού.....	16
2.1.1.5.1 Μέθοδος συμπλοκοποίησης	16
2.1.1.5.2 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης αλγινικού σε έλαιο	17
2.1.1.6 Μέθοδοι παραγωγής πηκτώματος αλγινικού.....	18
2.1.1.6.1 Φαρμακευτικές εφαρμογές νανοσωματιδίων αλγινικού	20
2.1.1.6.2 Εφαρμογές αλγινικού σε καλλυντικά.....	22
2.1.1.6.3 Εφαρμογές αλγινικού στον τομέα Τροφίμων	22
2.2 Χιτοζάνη.....	22
2.2.1.1 Προέλευση και παραγωγή χιτοζάνης	22

2.2.1.2	Ιδιότητες χιτοζάνης.....	23
2.2.1.3	Εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης.....	23
2.3	Σύστημα αλγινικού –χιτοζάνης.....	24
2.2.2	Παρασκευή νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης.....	24
2.2.2.1	Ιονοτροπική ζελατινοποίηση (Ionotropic gelation).....	24
2.2.2.2	Πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση (Polyelectrolyte complexation)	25
2.2.2.3	Μέθοδος Layer by layer	25
3.	Φλαβονοειδή.....	25
3.1	Γενικά στοιχεία	25
2.2.3	Χημική δομή.....	25
2.2.4	Αντιοξειδωτική δράση.....	26
2.2.4.1	Φλαβόνες.....	27
2.2.4.1.1	Χρυσίνη	27
2.2.4.1.1.1	Γενικά στοιχεία	27
2.2.4.1.1.2	Χημική δομή.....	27
2.2.4.1.1.3	Εγκλεισμός χρυσίνης σε διάφορους φορείς.....	28
2.3	Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	29
2.3.1	Προσδιορισμός αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH	29
2.3.2	Μέθοδος ABTS	31
2.4	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	31
2.4.1	Αρχή λειτουργίας για προσδιορισμό μεγέθους και κατανομής μεγέθους	31
2.4.2	Αρχή λειτουργίας για προσδιορισμό ζ-δυναμικού	32
2.4.3	Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	34
2.4.3.1	Μέγεθος (Size)	34
2.4.3.2	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI).....	34
2.4.3.3	ζ-δυναμικό.....	35
	ΣΚΟΠΟΣ.....	36
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
3.1.1	Υλικά.....	37
3.1.2	Όργανα και Συσκευές.....	37
3.2	Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού	38
3.2.1	Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων(Blank).....	38
3.2.2	Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού με χρυσίνη (Chr-Alg)	39

3.3 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης	40
3.3.1 Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο Ιονοτροπικής ηηκτωμάτωσης (Μέθοδος Α)	40
3.3.2 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης-χρυσίνης με την Μέθοδο Α	41
3.3.3 Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την Μέθοδο Β	42
3.3.4 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο Β	43
3.4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	43
3.4.1 Απόδοση διεργασίας.....	43
3.4.2 Απόδοση εγκλεισμού.....	43
3.4.2.1 Έμμεσος τρόπος υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού	44
3.4.2.2 Άμεσος τρόπος υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού	44
3.4.3 Χαρακτηρισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού.....	45
3.4.4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	46
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση	46
4.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων.....	46
4.1.1 Υπολογισμός απόδοσης διεργασίας	46
4.1.2 Υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού	48
4.1.2.1 Έμμεσος υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού	49
4.1.2.2 Άμεσος υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού.....	51
4.1.3 Υπολογισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων	52
4.1.3.2 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού χρυσίνης.....	54
4.1.3.3 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που παρασκευάστηκαν με την Μέθοδος Α.....	56
4.1.3.4 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που παρασκευάστηκαν με την δεύτερη μέθοδο (Μέθοδος Β).....	57
Σταθερότητα νανοσωματιδίων έπειτα από τρεις μήνες.....	58
4.1.4 Μελέτη δομής νανοσωματιδίων μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)	60
4.1.5 Εφαρμογή μεθόδου DPPH για μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης της χρυσίνης.....	71
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	79

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	Error! Bookmark not defined.
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	88

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Νανοτεχνολογία

1.1 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια αποτελούν μικρού μεγέθους στερεά σωματίδια, βιοαποικοδομήσιμα ή μη που χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων. Ο όρος νανοσωματίδιο είναι κοινός για τις νανοσφαίρες και τις νανοκάψουλες. Οι νανοσφαίρες είναι σφαιρικά σωματίδια όπου το εγκλεισμένο συστατικό διαχέεται με φυσικό τρόπο. Το φάρμακο μπορεί να απορροφηθεί στην επιφάνεια της σφαίρας ή να ενθυλακωθεί στο σωματίδιο. Οι νανοκάψουλες είναι φυσαλώδη συστήματα όπου το φάρμακο παγιδεύεται σε μία κοιλότητα που αποτελείται από ένα εσωτερικό υγρό πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από μία πολυμερική μεμβράνη.

Όταν το μέγεθος ενός υλικού μειώνεται στην νανοκλίμακα οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητές του είναι εντελώς διαφορετικές συγκριτικά με αυτές των μεμονομένων ατόμων και μορίων από τα οποία αποτελείται. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στην αύξηση της επιφάνειας ως προς τον όγκο, στην μείωση του διαθέσιμου χώρου και στην αύξηση της επιφανειακής ενέργειας. Οι βελτιωμένες ιδιότητες των νανοσωματιδίων εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή στην οξείδωση, την διάβρωση και την υψηλή θερμοκρασία.[1]

1.2 Πλεονεκτήματα νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται στον εγκλεισμό φαρμάκων καθώς παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα. Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν υψηλή ευελιξία και εξειδίκευση στους ιστούς στόχους με αποτέλεσμα την ειδική δράση του φαρμάκου σε θεραπευτικά βέλτιστο ρυθμό. Ακόμα ένα πλεονέκτημα των νανοσωματιδίων είναι ο πλήρης έλεγχος κατά την απελευθέρωση του φαρμάκου που επιτυγχάνεται τόσο με τον εύκολο χειρισμό του μεγέθους των σωματιδίων όσο και με τον έλεγχο των επιφανειακών ιδιοτήτων. Άλλο ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της χρήσης νανοσωματιδίων είναι η ελεγχόμενη και παρατεταμένη χορήγηση φαρμάκου κατά την μεταφορά με σκοπό να περιορίζεται η διαρροή του φαρμάκου κατά την διάρκεια της κινητικότητας των μορίων. Επίσης κάποια νανοσωματίδια διαθέτουν σύστημα ανίχνευσης της θέσης απελευθέρωσης του φαρμάκου καθώς και σύστημα παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας του θεραπευτικού παράγοντα in vivo. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια που προέρχονται από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή είναι μη τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα, μη ανοσογόνα, μη θρομβογόνα, μη φλεγμονώδη και με χαμηλό κόστος.[1,2]

1.3 Επίδραση στον τομέα της Ιατρικής-Φαρμακευτικής

Η ανάπτυξη στον τομέα της νανοεπιστήμης και της νανοτεχνολογίας έχει επιφέρει σημαντική πρόοδο στον τομέα της ιατρικής σε ότι αφορά την *in vivo* και *in vitro* διαγνωση, την παραγωγή ανώτερων βιοσυμβατών υλικών και την παράδοση φαρμάκων. Το μεγάλο ενδιαφέρον για τα νανοσωματίδια στις ιατρικές εφαρμογές οφείλεται στις καλές ιδιότητές τους όπως ο μεγάλος λόγος επιφάνειας προς μάζα, οι κβαντικές ιδιότητες καθώς και η ικανότητά τους να προσροφούν ή να ενεργούν ως φορείς άλλων ουσιών. Αν και τα νανοσωματίδια γενικά ορίζονται σαν σωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 100nm, όταν προορίζονται για χορήγηση φαρμάκου επιτρέπεται να έχουν μέγεθος από 100-1000nm. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια αποτελούνται από δύο στοιχεία δηλαδή από το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό και από τον φορέα. Οσον αφορά τα πολυμερή νανοσωματίδια που προορίζονται για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύουν την θεραπευτική αξία των υδατοδιαλυτών και αδιάλυτων φαρμάκων και μειώνουν την τοξικότητά τους. Το σύστημα χορήγησης νανο-φαρμάκου εξαρτάται από το όργανο-στόχο, το επιθυμητό φάρμακο και τη συμβατότητά του με το βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές.[2]

1.1.1 Σύγκριση μεθόδων χορήγησης φαρμάκου

Η συμβατική χορήγηση φαρμάκων εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα όπως τοξικότητα, περιορισμένη αποτελεσματικότητα, μειωμένη βιοδιανομή και έλλειψη ευαισθησίας. Προκειμένου να περιοριστούν τα προβλήματα αυτά, γίνεται στροφή στο ελεγχόμενο σύστημα χορήγησης φαρμάκων, σύμφωνα με το οποίο το φάρμακο μεταφέρεται άμεσα στον τόπο δράσης με αύξηση της επίδρασής του στους ιστούς και ταυτόχρονα μείωση τυχόν παρενεργειών. Η βελτίωση της αποτελεσματικότητας οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στον στοχευμένο σε κάθε περίπτωση ιστό. Σαν αποτέλεσμα απαιτείται μικρότερη δοσολογία και ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος αποικοδόμησης του φαρμάκου. Η εξειδίκευση του κυττάρου επιτυγχάνεται με την προσκόλληση του εκάστοτε φαρμάκου σε διαφορετικά σχεδιασμένους φορείς.

1.1.2 Επιλογή φορέα ενθυλάκωσης φαρμάκου

Η χρήση φορέων νανοτεχνολογίας για την ενθυλάκωση βιοενεργών προϊόντων παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα

- στην προστασία από οποιαδήποτε μορφή πρόωρης υποβάθμισης
- στην αλληλεπίδραση με το βιολογικό περιβάλλον χωρίς να προκαλεί ανοσολογική απόκριση ή παράλειψη

- στην ενίσχυση της απορρόφησης, της βιοδιαθεσιμότητας και του χρόνου επαναφοράς
- στην βελτίωση της ενδοκυτταρικής διείσδυσης

Κατά τον σχεδιασμό ενός φορέα πρέπει να ελέγχονται διάφορες παράμετροι όπως η σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα, η βιοδιανομή, η διάρκεια ζωής, η ενσωμάτωση και η απελευθέρωσή του.

Η παραγωγή νανοσωματιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί από υλικά όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και συνθετικά πολυμερή. Η επιλογή του υλικού βασίζεται σε ποικίλους παράγοντες με κυριότερους το προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου και την αντιγονικότητα του τελικού προϊόντος.[1,2,47]

2. Φυσικά πολυμερή

Τα φυσικά βιοδιασπώμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται συχνά στην παροχή φαρμάκων λόγω της αφθονίας που έχουν στη φύση, της βιοσυμβατότητας και της χαμηλής τοξικότητάς τους. Μία κατηγορία είναι τα πολυμερή με βάση την πρωτεΐνη όπως αλβουμίνη, ζελατίνη, σόγια και κολλαγόνο. Άλλη κατηγορία αποτελούν τα πολυμερή με βάση τους πολυσακχαρίτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής είναι η χιτοζάνη, η αγαρόζη, η δεξτράνη, το αλγινικό άλας, το υαλουρονικό οξύ και οι κυκλοδεξτρίνες. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φυσικό πολυμερές για την απελευθέρωση φαρμάκου είναι η χιτοζάνη. Βασικό πλεονέκτημα της χιτοζάνης είναι η ικανότητά της να αναμιγνύεται με πολλών ειδών πολυμερή. Επίσης παρουσιάζει μειωμένη τοξικότητα, εύκολη τροποποίηση της επιφανειακής της συμπεριφοράς και μειωμένη ανοσογόνο δράση γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη βιοσυμβατότητα με πολλούς ιστούς και κύτταρα. Άλλο ένα σημαντικό φυσικό πολυμερές αποτελεί το αλγινικό οξύ το οποίο είναι ανθεκτικό στα οξέα, μη τοξικό και βιοσυμβατό με βλεννοσυγκολλητικές ιδιότητες. Ωστόσο ο συνδυασμός αλγινικού-χιτοζάνης εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ευελιξίας της χιτοζάνης αλλά και της ανθεκτικότητας του αλγινικού στα οξέα. [2]

2.1 Αλγινικό

2.1.1.1 Προέλευση αλγινικού

Το αλγινικό είναι ένα φυσικά ανιονικό πολυμερές που παράγεται από δύο πηγές, φύκια και βακτήρια. Το αλγινικό πολλές φορές είναι με την μορφή πηκτώματος που περιέχει ιόντα νατρίου, ασβεστίου, μαγνησίου και βαρίου. Το αλγινικό είναι ένας υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης που είναι εμπορικά διαθέσιμος ως άλας νατρίου καθώς είναι περισσότερο

διαλυτό από το αλγινικό οξύ και έχει την ικανότητα να διατηρεί μεγάλες ποσότητες νερού με μικρές ποσότητες οργανικής ύλης. [3,14]

❖ Καφέ Φύκια

Το αλγινικό που είναι εμπορικά διαθέσιμο προέρχεται κυρίως από καφέ φύκια (Phaeophyceae). Τα φύκια ξηραίνονται και υποβάλλονται σε διάφορες χημικές μεθόδους επεξεργασίας προκειμένου να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες όπως πολυφαινόλες, βαρέα μέταλλα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και ενδοτοξίνες. Τα φύκια επεξεργάζονται με υδατικά αλκαλικά διαλύματα όπως καυστικό νάτριο. Η παραγωγή αλγινικού προέρχεται δηλαδή από την μέθοδο της αλκαλικής εκχύλισης. Το εκχύλισμα διηθείται με χλωριούχο νάτριο ή ασβέστιο και προστίθεται στο διήθημα με σκοπό να καθιζάνει το αλγινικό. Το αλγινικό άλας που παράγεται με προσθήκη HCl μετατρέπεται σε αλγινικό οξύ.[3]

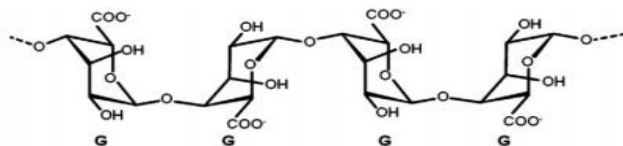
❖ Βακτήρια

Το αλγινικό που παράγεται από βακτηριακή σύνθεση διαθέτει πιο καθορισμένες χημικές δομές και φυσικές ιδιότητες συγκριτικά με το αλγινικό που παράγεται από θαλάσσια φύκια. Όμως τα αλγινικά που απομονώνονται από βακτήρια συνήθως δεν είναι οικονομικά βιώσιμα για εμπορική κλίμακα οπότε περιορίζονται σε μικρής κλίμακας ερευνητικές μελέτες. Βακτήρια που αποτελούν πηγή παραγωγής αλγινικού είναι το *Azotobacter* και το *Pseudomonas aeruginosa*. Ο τρόπος βιοσύνθεσης αλγινικού άλατος μέσω βακτηρίων μπορεί να γίνει με τις ακόλουθες μεθόδους.

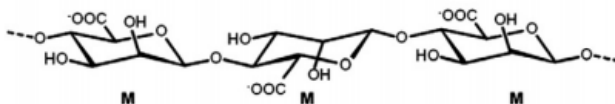
- ❖ Σύνθεση προδρομικού υποκατάστατου
- ❖ Μεταφορά πολυμερισμού και κυτταροπλασματικής μεμβράνης
- ❖ Περιπλασμική μεταφορά και τροποποίηση
- ❖ Εξαγωγή μέσω της εξωτερικής μεμβράνης [3]

2.1.1.2 Χημική δομή αλγινικού

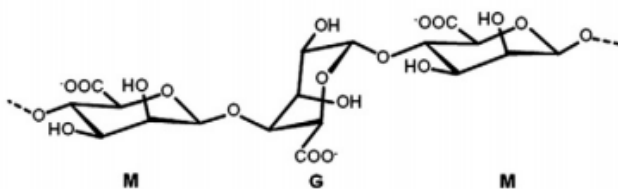
Το αλγινικό αποτελείται από δύο δομικά συστατικά, υπολείμματα α -l γουλουρονικού οξέος(G) και β -d μανουρονικού οξέος(M) ,γραμμικά συνδεδεμένα μεταξύ τους με 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η δομή των επιμέρους συστατικών φαίνεται παρακάτω



Εικόνα 1: Χημική δομή συμπλέγματος α-Ι γουλουρονικού οξέος(G)[3]



Εικόνα 2: Χημική δομή συμπλέγματος β-d μαννουρονικού οξέος(M)[3]



Εικόνα 3: Χημική δομή αλγινικού οξέος[3]

2.1.1.3 Ιδιότητες αλγινικού άλατος

Το αλγινικό άλας παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά

- μη τοξικό
- βιοαποικοδομήσιμο
- βιοσυμβατό
- μη ανοσογόνος ουσία
- βλεννοπροσκολλητική
- χαμηλό κόστος
- εύκολα εμπορικά διαθέσιμο[3]

2.1.1.4 Εφαρμογές αλγινικού

- ❖ Το αλγινικό χρησιμοποιείται ως έκδοχο στην μεταφορά φαρμάκων.
- ❖ Η προθρομβωτική δραστηριότητα του αλγινικού έχει σαν αποτέλεσμα την χρήση του ως αιμοστάτη.
- ❖ Το αλγινικό δρα ως βλεννοσυγκολλητικό και επομένως παρατείνει τον χρόνο παραμονής και την απελευθέρωση σε διάφορους ιστούς όπως έντερο, πνεύμονα, μύτη και μάτια.
- ❖ Το αλγινικό χρησιμοποιείται για αναγέννηση διαφόρων ιστών με πρωτεΐνες όπως έντερο, συκώτι, πνεύμονες και πάγκρεας.
- ❖ Το αλγινικό χρησιμοποιείται ως υλικό στον τομέα της Οδοντιατρικής.[15]

2.1.1.5 Σχηματισμός νανοσωματιδίων αλγινικού

Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος παρασκευής των νανοσωματιδίων αλγινικού οξέος καθώς και ο πιθανός συνδυασμός του πουλυμερούς με άλλα βιοπολυμερή προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματικότερη αποδέσμευσή του.

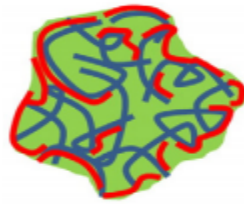
Σωματίδια αλγινικού μπορούν να παρασκευαστούν με δύο βασικές μεθόδους, την συμπλοκοποίηση και την γαλακτωματοποίηση αλγινικού σε έλαιο.

2.1.1.5.1 Μέθοδος συμπλοκοποίησης

Με την μέθοδο της συμπλοκοποίησης μπορεί να δημιουργηθούν νανοσυσσωματώματα ή νανοκάψουλες. Αν ο σχηματισμός συμπλόκου πραγματοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα σχηματίζονται νανοσυσσωματώματα, ενώ αν πραγματοποιηθεί στην διεπαφή ενός ελαίου σχηματίζονται νανοκάψουλες. Στην περίπτωση του αλγινικού η συμπλοκοποίηση γίνεται με την σταυροσύνδεση του αλγινικού με κατιόντα χλωριούχου ασβεστίου. Άλλος ένας τρόπος συμπλοκοποίησης του αλγινικού είναι ο συνδυασμός του με ένα εντελώς αντίθετα φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη όπως είναι η χιτοζάνη. [3]

❖ Παρασκευή νανοσυσσωμάτων αλγινικού με αυτοσύνθεση

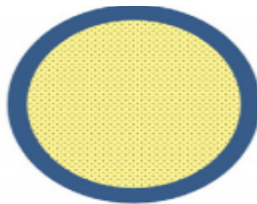
Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή δεν πραγματοποιείται συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων αλγινικού μέσω της παρουσίας χλωριούχου ασβεστίου ή ενός κατιονικού πολυμερούς προκειμένου να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο πολυηλεκτρολύτη με το αλγινικό άλας. Αντιθέτως, συντίθεται ένα αμφιφιλικό θειωμένο αλγινικό άλας νατρίου και μέσω υπερήχησης διευκολύνεται η οξείδωση των ομάδων θειόλης. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αυτοσύνθεση του αλγινικού νατρίου σε νανο-συσσωματώματα. [14]



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση νανο-συσσωματώματος[3]

- ❖ Παρασκευή νανοκάψουλας αλγινικού με σχηματισμό συμπλόκου στη διεπαφή των σταγονιδίων γαλακτώματος

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την παρασκευή νανοκάψουλας αλγινικού που προορίζεται για ενθυλάκωση διάφορων ουσιών όπως τεστοστερόνη, αιθέρια έλαια (π.χ.κουρκουμέλαιο) καθώς και παράγωγα ακυλίου. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, το αλγινικό εναποτίθεται στη διεπαφή των σταγονιδίων γαλακτώματος και σταθεροποιείται με φυσική ή ομοιοπολική διαμοριακή σύνδεση.[14]



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση νανοκάψουλας[3]

2.1.1.5.2 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης αλγινικού σε έλαιο

Νανοςφαίρες αλγινικού μπορούν να σχηματιστούν με τη γαλακτωματοποίηση αλγινικού σε έλαιο η οποία γίνεται σε συνδυασμό με εξωτερική ή εσωτερική πηκτωματοποίηση σταγονιδίων γαλακτώματος αλγινικού.

- ❖ Σχηματισμός νανοςφαίρας αλγινικού άλατος από γαλάκτωμα νερού σε έλαιο

Νανόσφαιρες αλγινικού άλατος παρασκευάζονται από τον συνδυασμό δύο μεθόδων, της γαλακτωματοποίησης και της ζελατινοποίησης. Το διάλυμα αλγινικού που περιέχει κάποιο φάρμακο ή ένζυμο, γαλακτωματοποιείται σε μία ελαιώδη φάση, σχηματίζοντας ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Ακολουθεί η προσθήκη ενός παράγοντα διασύνδεσης όπως το χλωριούχο ασβέστιο, με αποτέλεσμα την ζελατινοποίηση των σταγονιδίων γαλακτώματος αλγινικού. [3]



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση νανοσφαίρας[3]

2.1.1.6 Μέθοδοι παραγωγής ηκτώματος αλγινικού

Συνήθως τα νανοσωματίδια αλγινικού ηκτώματος έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 100nm. Παρ'όλα αυτά, τα σωματίδια μεγέθους μικρότερου από 1 μm εμφανίζουν σημαντικές ιδιότητες όπως υψηλή μηχανική αντοχή και μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια. [3]

Στον τομέα της Βιοϊατρικής ο οποίος συμπεριλαμβάνει χορήγηση φαρμάκων, επούλωση πληγών και μηχανικές εφαρμογές ιστών, το αλγινικό χρησιμοποιείται υπο την μορφή υδρογέλης. Η υδρογέλη συνιστά ένα τρισδιάστατα διασταυρωμένο δίκτυο που αποτελείται από υδρόφιλα πολυμερή με πλούσια περιεκτικότητα σε νερό. Παρουσιάζει σημαντική βιοσυμβατότητα καθώς η χημική της δομή είναι παρόμοια με εκείνη των μακρομορίων που απαρτίζουν το ανθρώπινο σώμα, επομένως είναι δυνατή η ενσωμάτωσή της με ελάχιστη επεμβατική χορήγηση. [4]

❖ Μέθοδος ιοντικής σταυροσύνδεσης

Οι υδρογέλες αλγινικού παρασκευάζονται μέσω φυσικής ή χημικής σύνδεσης των πολυμερικών αλυσίδων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υδρογέλης αλγινικού είναι ο τρόπος σύνδεσης των πολυμερικών αλυσίδων, η πυκνότητα διασύνδεσης, η σύνθεση του αλγινικού καθώς και το μοριακό του βάρος. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος

παρασκευής πηκτώματος αλγινικού άλατος είναι η ιοντική σταυροσύνθεση με πολυσθενή κατιόντα. Στην μέθοδο αυτή, συμμετέχει μόνο το γουλουρονικό μπλόκ των αλυσίδων αλγινικού το οποίο δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα. Επομένως, πραγματοποιείται ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του συστήματος γουλουρονικού οξέος με τα αντίστοιχα πολυσθενή κατιόντα. Η νέα σύνθεση του γουλουρονικού οξέος με τα πολυσθενή κατιόντα στοιβάζεται εκ νέου και δημιουργεί την λεγόμενη "egg box" δομή. Δεδομένου ότι η κάθε αλυσίδα συνδέεται με πολλές αλυσίδες, σαν αποτέλεσμα δημιουργείται ένα τρισδιάστατο δίκτυο πηκτώματος αλγινικού. Η μέθοδος πραγματοποιείται κάτω από ήπιες συνθήκες. Βασικό της πλεονέκτημα επομένως είναι η ικανότητά της να δεσμεύει πολύ ευαίσθητα υλικά που είναι αδύνατον να συγκρατηθούν από άλλες μεθόδους. Σε κάθε περίπτωση τα πηκτώματα αλγινικού που παρασκευάζονται με την μέθοδο της ιοντικής σταυροσύνδεσης είναι πλούσια σε νερό, με περιεκτικότητα που μπορεί να ξεπεράσει το 95%. [3] Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η έλλειψη μακροχρόνιας σταθερότητας καθώς συνηθίζεται το πήκτωμα του αλγινικού να επαναδιαλύεται λόγω της αντίδρασής του με μονοσθενή κατιόντα. Η απελευθέρωση των κατιόντων ασβεστίου μπορεί να προκαλέσει αιμόσταση καθώς η γέλη λειτουργεί σαν μήτρα συσσωμάτωσης ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων.

Παράγοντες ιοντικής σταυροσύνδεσης

i. Επιλογή κατιόντων

Για την ζελατινοποίηση του αλγινικού συνήθως επιλέγονται τα δισθενή κατιόντα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) παρά το γεγονός ότι δεν σχηματίζουν πάρα πολύ ισχυρούς δεσμούς με το αλγινικό άλας. Αυτό οφείλεται στην υψηλή διαλυτότητα του χλωριούχου ασβεστίου σε υδατικά διαλύματα που οδηγεί σε ταχεία και καλώς ελεγχόμενη πήξη. Ένας τρόπος για την επίτευξη μίας πιο ελεγχόμενης πήξης είναι η χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος που να περιέχει φωσφορικά, όπως το εξαμεταφωσφορικό νάτριο. Στην περίπτωση αυτή, οι φωσφορικές ομάδες του ρυθμιστικού θα ανταγωνιστούν τις καρβοξυλικές ομάδες του αλγινικού όσον αφορά στην αντίδραση με τα δισθενή κατιόντα και ως αποτέλεσμα θα επιβραδυνθεί η πήξη. Άλλος τρόπος είναι η χρησιμοποίηση διαλύματος ανθρακικού ή θεικού ασβεστίου λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους σε υδατικά διαλύματα όπως αυτό του αλγινικού. Ο λόγος που προτιμάται είναι γιατί τα μονοσθενή κατιόντα όπως επίσης και τα πολυσθενή κατιόντα μαγνησίου δεν έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο πηκτώματος. Η ζελατινοποίηση του αλγινικού επιτυγχάνεται με τρεις μεθόδους: την εσωτερική ζελατινοποίηση, την εξωτερική ζελατινοποίηση και την ζελατινοποίηση με ψύξη.

ii. Χημική δομή αλγινικού άλατος

Το πήκτωμα αλγινικού άλατος ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε περισσότερο γουλουρονικό ή μαννουρονικό οξύ αντίστοιχα, παρουσιάζει εμφανώς τροποποιημένες

ιδιότητες. Συγκεκριμένα στην περίπτωση που η περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ είναι μεγαλύτερη σχηματίζονται περισσότερο σκληρά, εύθραστα και πορώδη πηκτώματα αλγινικού. Επίσης υψηλό περιεχόμενο σε γουλουρονικό οξύ συνεπάγεται μεγαλύτερη δυσκολία διάλυσης. Αντίθετα, όταν είναι μεγαλύτερη η περιεκτικότητα σε μανουρονικό οξύ, τα πηκτώματα γέλης αλγινικού είναι πιο ελαστικά και αδύναμα.[3,4]

❖ Μέθοδος ομοιοπολικής σταυροσύνδεσης

Η μέθοδος της ομοιοπολικής σταυροσύνδεσης έχει μελετηθεί για την βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων των πηκτωμάτων αλγινικού προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές μηχανικής ιστών. Στην ιοντική σταυροσύνδεση, όταν η πίεση του πηκτώματος αλγινικού χαλαρώσει, οι διασυνδέσεις αποσυνδέονται. Σαν αποτέλεσμα, το σύστημα αποβάλλει νερό οδηγώντας σε πλαστική παραμόρφωση. Σε αντίθετη περίπτωση, κατά την ομοιοπολική σταυροσύνδεση, παρα το γεγονός ότι χάνεται νερό από το σύστημα, οι διασυνδέσεις δεν σπάνε, επομένως προκύπτει ελαστική παραμόρφωση. [4]

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι σημαντικότερες εφαρμογές του αλγινικού στον τομέα της Βιοϊατρικής και Φαρμακευτικής.

2.1.1.6.1 Φαρμακευτικές εφαρμογές νανοσωματιδίων αλγινικού

❖ Μεταφορά μικρών χημικών φαρμάκων

Τα νανοσωματίδια αλγινικού χρησιμοποιούνται για την μεταφορά μιας μεγάλης ποικιλίας φαρμάκων μικρού μοριακού βάρους και μάλιστα μέσω ενός πρωτεύοντα ή δευτερεύοντα δεσμού ανάμεσα στο αλγινικό και το φάρμακο μπορεί να μελετηθεί η κινητική απελευθέρωσης του φαρμάκου. Οι πηκτές αλγινικού έχουν μέγεθος πόρων περίπου 5nm οπότε είναι γρήγορη η διάχυση των μικρών πόρων μέσω του πηκτώματος. Ωστόσο ο σχηματισμός νανοσωματιδίων από οξειδωμένα αλγινικά άλατα με κατιόντα ασβεστίου οδηγεί σε μία παρατεταμένη απελευθέρωση η οποία οφείλεται στον αυξημένο αριθμό σταυροδεσμών και κατ'επέκταση στην μειωμένη διόγκωση. Επίσης τα νανοσωματίδια αλγινικού χρησιμοποιούνται για ελεγχόμενη απελευθέρωση αντινεοπλασματικών παραγόντων. Διαφορετικά είδη φαρμάκου μπορούν να μεταφερθούν μέσω πηκτωμάτων αλγινικού με σκοπό να επιτευχθεί ταυτόχρονη ή διαδοχική απελευθέρωσή τους καθώς η χημική δομή του φαρμάκου και ο τρόπος χορήγησης επηρεάζει την κινητική απελευθέρωσης.

❖ Χορήγηση πρωτεϊνικών φαρμάκων

Τα σωματίδια αλγινικού χρησιμοποιούνται για την χορήγηση πρωτεϊνικών φαρμάκων δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται σε σωματίδια αλγινικού άλατος κάτω υπό ήπιες συνθήκες με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η μετουσίωσή τους. Τα σωματίδια αλγινικού μπορούν να προστατεύσουν τα πρωτεϊνικά μόρια από την υποβάθμιση έως ότου ολοκληρωθεί η απελευθέρωσή τους. Γενικά, ο ρυθμός απελευθέρωσης των πρωτεϊνών είναι ταχύς καθώς το αλγινικό έχει εγγενές πορώδες με τις πρωτεΐνες και επίσης είναι ιδιαίτερος υδρόφιλο.

❖ Στοματική χορήγηση φαρμάκων

Το αλγινικό παρουσιάζει βιοσυγκολλητική, βλεννοσυγκολλητική, βιοσυμβατή και μη ερεθιστική δραστηριότητα γεγονός που το καθιστά ιδανικό για δημιουργία δισκίων προορισμένων για στοματική χορήγηση φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα του αλγινικού να διατηρείται ακόμα και παρουσία όξινων συνθηκών όπως αυτές του γαστρικού υγρού του στομάχου σε στερεή μορφή πηκτώματος (gel). Η ικανότητα αυτή είναι σε θέση να προστατεύσει τις ευαίσθητες σε όξινο pH ενώσεις καθώς στα δισκία που παρασκευάζονται από αλγινικό νάτριο ή ασβέστιο, το αλγινικό δρά ως ρυθμιστικό μέσο στο στομάχι. Με αυτόν τον τρόπο, αποτρέπεται το φαινόμενο της γαστρικής αναρροής.

❖ «Δέσμευση» θεραπευτικών κυττάρων για μεταμοσχεύσεις

Η «παγίδευση» ενεργών κυττάρων σε σωματίδια αλγινικού είναι μία τεχνική που πραγματοποιείται κάτω από ήπιες συνθήκες. Ειδικότερα, τα νανοσωματίδια αλγινικού σε μορφή πηκτώματος (gel) παγιδεύουν στο εσωτερικό τους τα κύτταρα σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο. Τα ακινητοποιημένα-παγιδευμένα κύτταρα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης κυττάρων, όπου το πήκτωμα δρα σαν εμπόδιο ανάμεσα στο όργανο μεταμόσχευσης και το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Το αλγινικό προκειμένου να αποτελέσει κατάλληλη μήτρα για την ακινητοποίηση και μεταμόσχευση ζωτικών κυττάρων θα πρέπει να διαθέτει κάποιες συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως υψηλή μηχανική και χημική σταθερότητα, ελεγχόμενες ιδιότητες διόγκωσης, χαμηλή περιεκτικότητα σε τοξικές, ανοσογόνες μολυσματικές ουσίες και περιορισμένη κατανομή μεγέθους πόρων.

❖ Παρασκευή επιδέσμων για επούλωση τραυμάτων

Το αλγινικό χρησιμοποιείται για παρασκευή επιδέσμων με διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως η απορρόφηση εξιδρώματος, η διατήρηση της υγρασίας και η επούλωση των πληγών. Ειδικότερα, η εφαρμογή επιδέσμων αλγινικού ασβεστίου είναι κατάλληλη για την θεραπεία διαβητικών βλαβών που εμφανίζονται σε διάφορα μέρη του σώματος. Επίσης, τα ιόντα ασβεστίου που

χρησιμοποιούνται για την παρασκευή νανοσωματιδίων αλγινικού κατέχουν ενεργό ρόλο στην φυσιολογική ομοιόσταση του δέρματος με αποτέλεσμα την γρήγορη επούλωση πληγών.[4,27]

2.1.1.6.2 Εφαρμογές αλγινικού σε καλλυντικά

- ❖ Ενίσχυση ενυδάτωσης του δέρματος
- ❖ Το αλγινικό θεωρείται καλό υδροκολλοειδές και λειτουργεί ως παράγοντας πάχυνσης και σταθεροποίησης γαλακτωμάτων σε καλλυντικά
- ❖ Εφαρμογή αλγινικού σαν χρωστική ουσία [28]

2.1.1.6.3 Εφαρμογές αλγινικού στον τομέα Τροφίμων

Το αλγινικό χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο τροφίμων καθώς έχει την ικανότητα να βελτιώνει και να σταθεροποιεί την υφή των τροφίμων. Συγκεκριμένα λειτουργεί σαν βελτιωτικό του ιξώδους, σαν παράγοντας πήξης και σταθεροποιητής υδατικών μιγμάτων και γαλακτωμάτων. Επίσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της τήξης του παγωτού. Οι εφαρμογές του αλγινικού στον τομέα τροφίμων οφείλεται τόσο στις φυσικοχημικές του ιδιότητες όσο και στην αλληλεπίδρασή του με άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες και ίνες. Η συνεργιστική δράση του αλγινικού άλατος που περιέχει υψηλό περιεχόμενο σε γουλουρονικό οξύ μαζί με εστεροποιημένες πηκτίνες χρησιμοποιείται σε μαρμελάδες και ζελέδες. [29]

2.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικά απαντούμενος κατιονικός πολυσακχαρίτης, εξαιρετικά βασικός με σημαντικές βλεννοσυγκολλητικές και βιοσυμβατές ιδιότητες. Θεωρείται το μεγαλύτερο βιολογικό μετά την κυτταρίνη όσον αφορά στην χρήση και την διανομή. Παρά το γεγονός ότι η χιτοζάνη έχει παρόμοια χημική δομή με αυτή της κυτταρίνης, διαθέτει επιπλέον ακετυλαμίνη ή αλλιώς ελεύθερες αμινομάδες, γεγονός που της προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες. Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός δυαδικός ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται από β,1-4 συνδεδεμένη D-γλυκοζαμίνη με διάφορους βαθμούς N-ακετυλίωσης καταλοίπων γλυκοζαμίνης.

2.2.1.1 Προέλευση και παραγωγή χιτοζάνης

Η χιτοζάνη αποτελεί το σημαντικότερο παράγωγο της χιτίνης. Η χιτίνη συνιστά το βασικό συστατικό του εξωσκελετού των καρκινοειδών όπως γαρίδες, αστακοί και καβούρια και επίσης απαντάται φυσικά σε μικροοργανισμούς όπως ζύμες και μύκητες. Όσον αφορά την χιτίνη που

προέρχεται από φυσικές πηγές είναι γνωστό ότι βρίσκεται δεσμευμένη σε πρωτεΐνες και μέταλλα. Η χιτοζάνη παράγεται μέσω της N-αποακετυλίωσης της χιτίνης με συμπυκνωμένα διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλος ένας τρόπος παραγωγής χιτοζάνης είναι η μέθοδος την N-απακετυλίωσης με ένζυμα σε ήπιες συνθήκες. Η εμπορικά διαθέσιμη χιτοζάνη προέρχεται κατά κύριο λόγο από τον πρώτο τρόπο καθώς είναι πιο εύκολο να ληφθεί.

Η διαδικασία παραγωγή της χιτοζάνης αποτελείται από δύο στάδια.

- Κατα το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η εκχύλιση της χιτίνης και η απομάκρυνση του ανθρακικού ασβεστίου από τα κύτταρα των καρκινοειδών με αραιό υδροχλωρικό οξύ και αποπρωτεΐνωση με αραιό διάλυμα καυστικού νατρίου.
- Κατα το δεύτερο στάδιο το 40-50% του υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου χρησιμοποιείται στους 110-115°C για την αποακετυλίωση της χιτίνης για αρκετές ώρες χωρίς παρουσία οξυγόνου. Η χιτοζάνη παράγεται όταν ο βαθμός αποακετυλίωσης ξεπερνάει το 50%. [10,11,12,32]

2.2.1.2 Ιδιότητες χιτοζάνης

Η χιτοζάνη λόγω της παρουσίας δύο ενεργών ομάδων στο μόριό της, της αμινομάδας NH_2 και της υδοξυλομάδας OH εμφανίζει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η χιτοζάνη διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- ❖ Μη τοξικότητα
- ❖ Σταθερότητα
- ❖ Βιοαποικοδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα και βλεννοσυγκολλητικότητα
- ❖ Ευκολία στην αποστείρωση
- ❖ Διαλυτότητα σε νερό και οργανικούς διαλύτες
- ❖ Κατάλληλο ιζώδες
- ❖ Ευαισθησία σε pH

Οι δύο βασικοί παράμετροι που επηρεάζουν τις ιδιότητες και την λειτουργικότητα της χιτοζάνης είναι το μοριακό βάρος και ο βαθμός ακετυλίωσης. [30,31]

2.2.1.3 Εφαρμογές νανοσωματιδίων χιτοζάνης

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης θεωρούνται ένας από τους καλύτερους φορείς φαρμάκων λόγω της ικανότητας που διαθέτουν να πραγματοποιούν αργή και ελεγχόμενη απελευθέρωση. Η ικανότητά τους αυτή οφείλεται στο μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων χιτοζάνης που τα καθιστά ικανά να διέρχονται μέσα από βιολογικά εμπόδια *in vivo* όπως το φράγμα αίματος-εγκεφάλου με αποτέλεσμα την έγκαιρη παράδοση του φαρμάκου στην θέση της βλάβης. Με

αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Επίσης, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στην τεχνική ιστών και στον σχηματισμό οστεοβλαστών. Τέλος, παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιοϊατρικών εφαρμογών όπως στοματική και ρινική χορήγηση φαρμάκων. [30,31,32]

2.3 Σύστημα αλγινικού –χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένα βιοπολυμερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή διαφόρων πολυηλεκτρονιακά σύνθετων προϊόντων με φυσικά πολυανιόντα όπως το αλγινικό. Όπως οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες, έτσι και η χιτοζάνη σε βασικό περιβάλλον βρίσκεται υπό μορφή ουδέτερου ή αρνητικά φορτισμένου μορίου. Μόλις διαλυθεί σε όξινο περιβάλλον, οι αμινομάδες της γλυκοζαμίνης πρωτονιώνονται και η χιτοζάνη μετατρέπεται σε έναν κατιονικό πολυηλεκτρολύτη. Επομένως το κατιονικό μόριο της χιτοζάνης σχηματίζει εύκολα ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ανιονικές ομάδες όπως αυτές του αλγινικού με αποτέλεσμα να τροποποιούνται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων. [10,33]

2.2.2 Παρασκευή νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης

Παρακάτω περιγράφονται οι βασικές μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης

2.2.2.1 Ιονοτροπική ζελατινοποίηση (Ionotropic gelation)

Κατα την ιονοτροπική ζελατινοποίηση, το θετικά φορτισμένο διάλυμα χιτοζάνης διαλύεται στο αρνητικά φορτισμένο διάλυμα αλγινικού άλατος με ή χωρίς την χρήση σταθεροποιητικού μέσου. Τα νανοσωματίδια σχηματίζονται μέσω συμπλοκοποίησης ανάμεσα στην θετικά φορτισμένη αμινομάδα της χιτοζάνης και την αρνητική καρβοξυλομάδα του αλγινικού η οποία επιτυγχάνεται με μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σαν σταθεροποιητικό μέσο χρησιμοποιείται συνήθως διάλυμα TPP. Η μέθοδος παρουσιάζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα όπως χαμηλή τοξικότητα, ήπιες συνθήκες διεξαγωγής, παρουσία υδατικού περιβάλλοντος και μικρή αλλαγή στη χημεία του φαρμάκου που πρόκειται να εγκλειστεί. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου συνιστά η χαμηλή σταθερότητα σε όξινες συνθήκες και η δυσκολία στον εγκλεισμό φαρμάκων υψηλού μοριακού βάρους. [32,33]

2.2.2.2 Πολυηλεκτρολυτική συμπλοκοποίηση (Polyelectrolyte complexation)

Κατα την μέθοδο πολυηλεκτρολυτικής συμπλοκοποίησης, πολυκατιονικό διάλυμα χιτοζάνης προστίθενται σε διάλυμα αλγινικού νατρίου προκειμένου να επιτευχθεί επικάλυψη των νανοσωματιδίων αλγινικού με χιτοζάνη. Η μέθοδος χρησιμοποιείται καθώς βελτιώνει την μηχανική αντοχή των νανοσωματιδίων και την διαπερατότητα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος και τις λειτουργίες των νανοσωματιδίων είναι οι συγκεντρώσεις του αλγινικού και του κατιονικού πολυμερούς, το μοριακό βάρος, η συγκέντρωση του χλωριούχου ασβεστίου και η σειρά προσθήκης του χλωριούχου ασβεστίου και της χιτοζάνης στο διάλυμα αλγινικού. [3,14]

2.2.2.3 Μέθοδος Layer by layer

Πρόκειται για μία απλή μέθοδο που παράγει νανοσωματίδια από δύο πολυηλεκτρολύτες με αντίθετο φορτίο όπως το αλγινικό και η χιτοζάνη. Η αλληλεπίδραση φορτίου-φορτίου μεταξύ του υποστρώματος και των μονοστοιβάδων των πολυηλεκτρολυτών, δημιουργεί νανοσωματίδια πολλαπλών στρωμάτων που συγκρατούνται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. [14]

3. Φλαβονοειδή

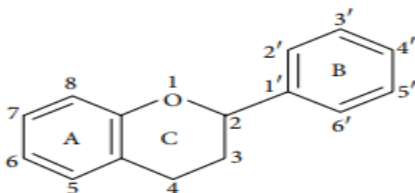
3.1 Γενικά στοιχεία

Τα φλαβονοειδή είναι εξειδικευμένοι μεταβολίτες που περιέχουν μεγάλες ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους. Τα φλαβονοειδή είναι φυσικά απαντώμενες πολυφαινόλες που συντίθεται από τα φυτά όταν αποκρίνονται σε μικροβιακή λοίμωξη. Η χημική φύση των φλαβονοειδών εξαρτάται από την δομή τους, τον βαθμό υδροξυλίωσης, τις πιθανές υποκαταστάσεις καθώς και τον βαθμό πολυμερισμού. Η δομή τους καθορίζει σε πολύ μεγάλο ποσοστό τις βιολογικές και φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φλαβονοειδή στην υγεία του ανθρώπου λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που διαθέτουν οι πολυφαινολικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική συμπεριφορά στηρίζεται στις ομάδες υδροξυλίου των φλαβονοειδών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Λόγω της αντιοξειδωτικής τους συμπεριφοράς, τα φλαβονοειδή θεωρούνται απαραίτητα συστατικά της καθημερινής διατροφής. [5]

2.2.3 Χημική δομή

Απο χημικής άποψης τα φλαβονοειδή βασίζονται σε έναν σκελετό δεκαπέντε ατόμων άνθρακα που αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρανίου.

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο οξείδωσης και την υποκατάσταση στον δακτύλιο του πυρανίου. Χαρακτηριστικές υποκατηγορίες είναι οι φλαβόνες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, φλαβοανίλες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβόνες, χαλκόνες και διυδροφλαβονόλες. Ανάλογα με την υποκατάσταση σε ένα από τους βενζολικούς δακτυλίους προκύπτουν επιμέρους ενώσεις σε κάθε υποομάδα.



Εικόνα 7: Χημική δομή φλαβονοειδούς

Τα φλαβονοειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές, αντιθρομβωτικές και αντικαρκινογόνες ιδιότητες.

2.2.4 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία σημαντική υποομάδα φαινολικών ενώσεων και συναντώνται κυρίως στα φρούτα και στα λαχανικά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φλαβονοειδή στην υγεία του ανθρώπου λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση στο σώμα μέσω αναστολής της δράσης των ελεύθερων ριζών με σκοπό την καθυστέρηση της οξείδωσης των λιπιδίων.

Τα φλαβονοειδή έχουν μία βασική δομή 2- φαινυλο-βενζο-γ-πυρόνης η οποία αποτελείται από έναν βενζολικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με άλλον έναν βενζολικό δακτύλιο στην 2η θέση του οποίου υπάρχει μία φαινυλο ομάδα. Οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών διαφέρουν στο επίπεδο οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου της γ-βενζοπυρόνης καθώς και στον αριθμό και την θέση των ομάδων υδροξυλίου.

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που παράγονται είτε φυσικά (ενδογενή) είτε εξωτερικά μέσω τροφίμων(εξωγενή) και δρούν ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στην αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά να δώσουν ηλεκτρόνια σε ασταθή συστήματα, εξουδετερώνοντάς τα με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της καταστροφής του DNA. Τα αντιοξειδωτικά δρούν ως αναστολείς ενζύμων, σαρωτές ριζών, απενεργοποιητές οξυγόνου, δότες ηλεκτρονίων, αποικοδομητές υπεροξειδίου και ως μέσο χηλικοποίησης μετάλλων.

Η αντιοξειδωτική δράση ενός флаβονοειδούς στηρίζεται σε τρεις παράγοντες:

1. Την ικανότητα χηλικοποίησης μετάλλων που εξαρτάται από τον τρόπο δόμησης του καρβονυλίου και των υδροξυλίων γύρω από το μόριο.
2. Την παρουσία ομάδων που δρούν ως δότες ηλεκτρονίων και επομένως μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες.
3. Την ικανότητα του флаβονοειδούς να απομακρύνει το μονήρες ηλεκτρόνιο που οδηγεί στο σχηματισμό μίας σταθερής φαινολικής ρίζας. [7,9]

2.2.4.1 Φλαβόνες

Οι φλαβόνες είναι μία κατηγορία флаβονοειδών που έχει σαν σκελετό την 2-φαινυλο-1 βενζοπυραν-4-όνη. Η φλαβόνη αποτελείται συνολικά από τρεις δακτυλίους και διαθέτει υδροξύλιο, καρβοξύλιο και έναν συζευγμένο διπλό δεσμό. Βάση της δομής της παρουσιάζει πολύ σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες. Οπτικά είναι άχρωμες ενώσεις, ιδιαίτερα κρυσταλλικές με μεγάλη διαλυτότητα σε διαλύτες όπως το νερό και η αιθανόλη. Όταν διαλύονται σε αλκάλια εμφανίζουν χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. [7]

2.2.4.1.1 Χρυσίνη

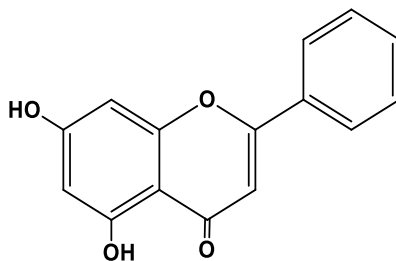
2.2.4.1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η χρυσίνη είναι μία υδροξυλιωμένη φλαβόνη που προέρχεται από διάφορα εκχυλίσματα φυτών όπως η πρόπολη, το μέλι και το μπλέ λουλούδι πάθους (*Passiflora caerulea*) με σημαντική φαρμακευτική και οικονομική αξία. Σημαντική πηγή χρυσίνης αποτελούν επίσης τα μανιτάρια καθώς και το φαρμακευτικό φυτό *Radix scutellariae*. Η συγκέντρωση της χρυσίνης που συναντάται στην πρόπολη είναι ίση με 28g/l ενώ στο μέλι δάσους 5.3mg/kg.

2.2.4.1.1.2 Χημική δομή

Η χρυσίνη (5,7 υδροξυ - φλαβόνη) είναι ένα флаβονοειδές με μεγάλο ενδιαφέρον. Η χρυσίνη έχει την χαρακτηριστική δομή μίας φλαβόνης που αποτελείται από έναν σκελετό με δεκαπέντε άτομα άνθρακα. Ο σκελετός απαρτίζεται από δύο συγχωνευμένους βενζολικούς δακτυλίους A, C και έναν φαινολικό δακτύλιο με μία ομάδα υδροξυλίου στην πέμπτη και έβδομη θέση του δακτυλίου A. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των φλαβονών που εντοπίζεται και στην περίπτωση του μορίου της χρυσίνης είναι ο διπλός δεσμός C₂-C₃ στον δακτύλιο C και η έλλειψη υδροξυλίου στη θέση C₃. Η χρυσίνη σε αντίθεση με τα περισσότερα флаβονοειδή δεν διαθέτει καθόλου υδροξύλιο στον B δακτύλιο. Η χρυσίνη παράγεται από το οξύ φαινυλαλαμίνη. Η φαινυλαλαμίνη

μετατρέπεται αρχικά σε κινναμικό οξύ παρουσία της δράσης ενός ενζύμου. Η τελική σύνθεση της χρυσίνης επέρχεται μετά από μία σειρά ενζυματικών αντιδράσεων.



Εικόνα 8: Χημική δομή χρυσίνης

Η χρυσίνη λόγω της χημικής της δομής και συγκεκριμένα της απουσίας υδροξυλίου στους δακτυλίους Β και C, εμφανίζει πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες. Η παρουσία καρβονυλίου, ο διπλός δεσμός C₂-C₃ στον δακτύλιο C και η υδροξυλίωση στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου Β είναι οι βασικές προϋποθέσεις για να έχει μια ένωση υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι φαινολικές ομάδες λόγω της δομής συντονισμού που διαθέτουν έχουν την τάση να σταθεροποιούν τη ρίζα που σχηματίζεται στον φαινολικό άνθρακα. Όταν οι φαινολικές ομάδες διαθέτουν ομάδες που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων όπως το υδροξύλιο στις θέσεις όρθο ή παρα παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Όσον αφορά στην παρουσία του καρβονυλίου η αντιοξειδωτική ικανότητα βελτιώνεται όταν αυτός διαχωρίζεται από τον αρωματικό δακτύλιο. [8]

2.2.4.1.1.3 Εγκλεισμός χρυσίνης σε διάφορους φορείς

❖ Χρυσίνη σε β-κυκλοδεξτρίνη (CD)

Η κυκλοδεξτρίνη λόγω της ικανότητάς της να εγκλείει υδρόφοβα μόρια, χρησιμοποιείται ως μέσο παράδοσης φαρμάκων. Ο μέσος όρος μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι 458nm, με δείκτη πολυδιασποράς 0.8 και ζ-δυναμικό -38.4mV. Επίσης η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH που παρουσίασαν τα νανοσωματίδια εκτιμάται υψηλότερη συγκριτικά με εκείνη της απλής χρυσίνης. γεγονός που συνεπάγεται καλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον τα νανοσωματίδια χρυσίνης-β κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιμικροβιακή και αντικαρκινική ικανότητα. [35]

❖ Χρυσίνη σε πολυ-αιθυλενογλυκόλη(PEG) και πολυ-γαλακτικό συν γλυκολικό οξύ(PLGA)

Όταν η χρυσίνη συνδυάζεται με πολυ-αιθυλενογλυκόλη και πολυγαλακτικό συν γλυκολικό οξύ παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα και μεγαλύτερη ανοχή στο εκάστοτε φάρμακο. Επιπλέον, εμφανίζει αυξημένη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα χωρίς όμως να βλάπτει τα φυσιολογικά. Το σύστημα χρυσίνη-PEG-PLGA εφαρμόζεται για την αποτελεσματική θεραπεία στον καρκίνο του μαστού. Όπως προέκυψε από την δυναμική σάρωση (DLS), τα νανοσωματίδια χρυσίνης – PEG έχουν μέσο όρο διαμέτρου μικρότερη από 200nm .[37,38]

❖ Χρυσίνη σε αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την δυναμική σάρωση τα νανοσωματίδια έχουν μέσο όρο διαμέτρου 97.5 ± 5.75 nm και ζ-δυναμικό -11mV. Αποτελέσματα in vitro κυτταροτοξικότητας έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια χρυσίνης-αλβουμίνης είναι βιοσυμβατά με κύτταρα HFF2. Επομένως, το σύστημα καθίσταται ικανό για την χορήγηση φαρμάκων με στόχο την θεραπεία του καρκίνου. [36]

❖ Χρυσίνη σε αλγινικό

Προς το παρόν δεν έχουν παρασκευαστεί νανοσωματίδια χρυσίνης σε φορέα αλγινικού.

2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

2.3.1 Προσδιορισμός αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH

Η ρίζα DPPH είναι η ελεύθερη ρίζα της 2,2 διφαιλυλ-1-πικρυλυδραζιλής. Η μέθοδος DPPH συνίσταται για ενώσεις που περιέχουν ομάδες NH, OH και SH. Βασικό χαρακτηριστικό του DPPH είναι ότι εξαιτίας του μονήρες ηλεκτρονίου που διαθέτει, παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 517 nm. Υπάρχουν δύο βασικοί μηχανισμοί που περιγράφουν την δράση της ρίζας DPPH.

Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό τα φλαβονοειδή καταστέλλουν την ελεύθερη ρίζα με μεταφορά ενός ατόμου H συμβάλλοντας στην σταθεροποίηση της ρίζας υπεροξυλίου μέσω δομής συντονισμού, όπως περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση.



Ο δεύτερος μηχανισμός στηρίζεται στην μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το φλαβονοειδές στην δραστική ελεύθερη ρίζα που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός κατιόντος στο αντιοξειδωτικό και ενός ανιόντος στην ρίζα. Στο επόμενο βήμα, πραγματοποιείται μεταφορά του πρωτονίου από το κατιόν. Οι αντιδράσεις παρουσιάζονται παρακάτω.



Όταν το ηλεκτόνιο της ρίζας DPPH συζευχθεί με έναν δότη υδρογόνου, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης με αποτέλεσμα την εξασθένιση του πορφυρού χρώματος (βιολετί) του διαλύματος. Η μεταβολή της έντασης απορρόφησης που παρατηρείται κατά την αντίδραση στα 517 nm είναι ενδεικτική της ικανότητας της ένωσης να δρά ως δεσμευτής ελεύθερων ριζών σε συστήματα που δεν περιέχουν σίδηρο. [16,19]

Η τιμή DPPH εκφράζεται ως IC50 δηλαδή ως την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί αναστολή σχηματισμού ριζών DPPH κατά 50%. Επομένως η αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τιμή IC50.

Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας δίνεται από την ακόλουθη σχέση.

$$\text{Παρεμπόδιση ελεύθερης ρίζας (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Όπου

- ❖ A_0 = απορρόφηση DPPH
- ❖ A_1 = απορρόφηση DPPH μαζί με την ένωση

Το μοντέλο δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης της χρυσίνης. [18,19]

2.3.2 Μέθοδος ABTS

Η θετικά φορτισμένη ρίζα ABTS + έχει χαρακτηριστικό μπλέ-πράσινο χρώμα και έχει την ικανότητα να απορροφάει στα 734 nm. Η αντίδραση της ρίζας με παράγοντες δέσμησης ελεύθερων ριζών όπως αντιοξειδωτικά έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απορρόφησης στα 734 nm. Ειδικότερα, η μείωση της απορρόφησης συνοδεύεται από ταυτόχρονη εξασθένιση του έντονου μπλέ-πράσινου χρώματος του διαλύματος ABTS. Η ρίζα ABTS+ παράγεται μέσω της αντίδρασης ενός ισχυρού μέσου οξειδωσης όπως το υπερθειικό κάλιο με το άλας του ABTS.

Πλεονεκτήματα μεθόδου ABTS

- ❖ Η μέθοδος ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα επίπεδα pH, επομένως είναι πολύ χρήσιμη όταν πρόκειται να μελετηθεί η επίδραση του pH στην αντιοξειδωτική δράση μίας ένωσης.
- ❖ Το ABTS είναι διαλυτό τόσο σε υδάτινα όσο και σε οργανικά διαλύματα. Επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σε δείγματα που βρίσκονται διαλυμένα σε διαφορετικά μέσα. [20]

2.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός ή αλλιώς φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (DLS) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους, της κατανομής μεγέθους και του ζ-δυναμικού των σωματιδίων. Η δυναμική σκέδαση φωτός απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και λειτουργεί χωρίς προ-πειραματική βαθμονόμηση. Η μέθοδος μπορεί να δώσει πληροφορίες για σωματίδια με διάμετρο από μερικά νανόμετρα έως πέντε μικρόμετρα.

2.4.1 Αρχή λειτουργίας για προσδιορισμό μεγέθους και κατανομής μεγέθους

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου για τον προσδιορισμό μεγέθους και κατανομής μεγέθους των νανοσωματιδίων στηρίζεται στον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Ειδικότερα, μονοχρωματική ακτίνα λέιζερ, συγκεκριμένου μήκους κύματος, φωτοβολεί το δείγμα που βρίσκεται σε πλήρη διασπορά μέσα στην κυψελίδα και τα διεσπαρμένα σωματίδια σκεδάζουν μέρος της ακτινοβολίας. Τα σωματίδια ακολουθούν την κίνηση Brown λόγω των θερμικών συγκρούσεων που δημιουργούνται μεταξύ των σωματιδίων και των μορίων διαλύτη. Η ταχύτητα κίνησής των σωματιδίων εξαρτάται από την διάμετρό τους. Η κίνηση Brown των σωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα την διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα δεδομένα έντασης-χρόνου αξιολογούνται μέσω μοντέλων

συσχέτισης. Η υδροδυναμική διάμετρος υπολογίζεται από την εξίσωση Stokes-Einstein, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Εξίσωση Stokes-Einstein} = \frac{k_B * T}{3\pi\eta D_T}$$

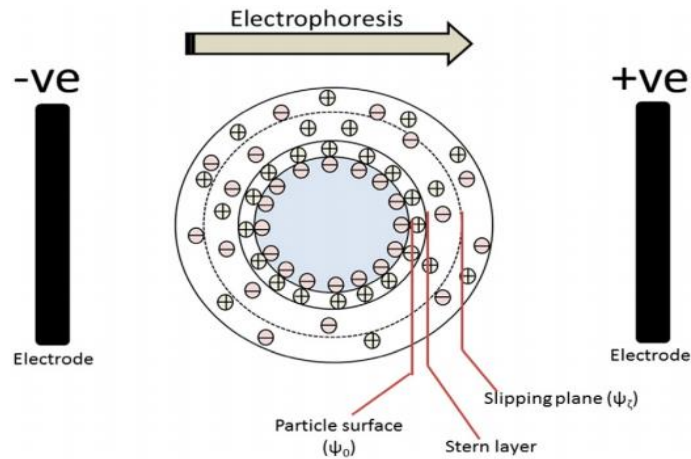
Όπου

- ❖ k_B =Σταθερά Boltzman
- ❖ T = απόλυτη θερμοκρασία
- ❖ η = Ιξώδες μέσου διασποράς
- ❖ D_T =Συντελεστής διάχυσης [21,23,26]

2.4.2 Αρχή λειτουργίας για προσδιορισμό ζ-δυναμικού

Η λειτουργία της μεθόδου για τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού βασίζεται στην αρχή σκέδασης του φωτός. Το δείγμα τοποθετείται σε έναν θάλαμο που περιέχει δύο ηλεκτρόδια και μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου τα φορτισμένα σωματίδια αναγκάζονται να μεταναστεύσουν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο.

Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο είναι διασκορπισμένο, δημιουργείται ένα διπλό στρώμα στην επιφάνειά του. Το εσωτερικό του διπλού στρώματος αποτελείται από ιόντα τα οποία είναι αντίθετα φορτισμένα από το σωματίδιο και με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα στρώμα που ονομάζεται Stern layer. Επίσης δημιουργείται ένα στρώμα διάχυσης που αποτελείται τόσο από θετικά όσο και από αρνητικά ιόντα. Μέσα στο στρώμα διάχυσης, είναι ένα υποθετικό επίπεδο (Slipping plane) το οποίο λειτουργεί σαν διεπιφάνεια μεταξύ των κινούμενων σωματιδίων και του στρώματος διασποράς το οποίο έχει ηλεκτροφορηθεί. Το επίπεδο αυτό είναι το χαρακτηριστικό επίπεδο ολίσθησης και το ζ-δυναμικό είναι το ηλεκτροκινητικό δυναμικό που αναπτύσσεται σε αυτό.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση τρόπου υπολογισμού ζ-δυναμικού[23]

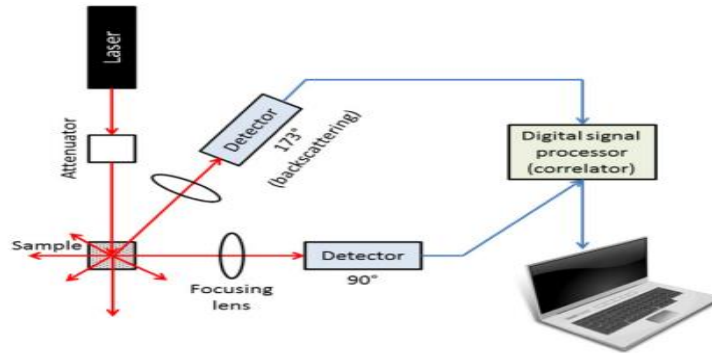
Η ταχύτητα των σωματιδίων στο ηλεκτρικό πεδίο είναι γνωστή και ως ηλεκτροφορητική κινητικότητα και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι παράγοντες συνδέονται με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσω της εξίσωσης Henry

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Όπου

- ❖ U_E = Ηλεκτροφορητική κινητικότητα σωματιδίων
- ❖ ε = διηλεκτρική σταθερά μέσου διασποράς
- ❖ z = ζ-δυναμικό
- ❖ η = Ιξώδες μέσου διασποράς
- ❖ $f(ka)$ = συνάρτηση, η οποία για τα υδατικά διαλύματα παίρνει την τιμή 1.5 και ονομάζεται προσέγγιση Smoluchowski και για μη πολικούς διαλύτες παίρνει την τιμή 1 και αναφέρεται ως προσέγγιση Huckel. [21,22]

Παρακάτω παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση των οργάνων της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση οργάνων DLS[23]

2.4.3 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

2.4.3.1 Μέγεθος (Size)

Το μέγεθος συνιστά ένα βασικό μέγεθος για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων. Ως μέγεθος εκφράζεται η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων μετρημένη σε νανόμετρα, η οποία υπολογίζεται μέσω του συντελεστή διάχυσης από την εξίσωση Stokes-Einstein.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην επιστήμη των Φαρμάκων, η νανοκλίμακα αφορά σωματίδια με διάμετρο από 1 έως 100 nm. Το μέγεθος αποτελεί έναν βασικό παράγοντα για διάφορες βιολογικές δραστηριότητες των νανοσωματιδίων όπως την κυτταρική πρόσληψη, την τοξικότητα και την διάλυση σε φορείς. Επίσης, επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, την σταθερότητά τους, τον ρυθμό απελευθέρωσης της ένωσης σε θέσεις στόχους καθώς και την ανάπτυξη συστημάτων παράδοσης φαρμάκων.

Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των νανοσωματιδίων, τόσο μικρότερη καθίσταται η τάση καθίζησης και συσσωμάτωσης. [23,24]

2.4.3.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας μεγέθους των νανοσωματιδίων. Μία τιμή PDI κοντά στο 0 υποδηλώνει ομοιομορφία μεγέθους και μονοδιασπορά. Αντίθετα τιμή PDI μεγαλύτερη του 0.2 συνεπάγεται ευρεία κατανομή μεγέθους και επομένως πολυδιασπορά. [25]

2.4.3.3 ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό που ονομάζεται επίσης ηλεκτροκινητικό δυναμικό είναι μία παράμετρος που σχετίζεται με τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων και ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικά διπλού στρώματος που εμφανίζεται στην επιφάνεια των ηλεκτροφορητικά κινητών σωματιδίων και της ηλεκτρικά ουδέτερης περιοχής του στρώματος διασποράς (διαλύματος).

Η τιμή του ζ-δυναμικού αποτελεί μία ένδειξη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Ειδικότερα όταν η τιμή ζ-δυναμικού είναι υψηλά θετική ή αρνητική, τότε τα νανοσωματίδια έχουν την τάση να απωθούν το ένα το άλλο και συνεπώς μειώνονται οι συσσωματώσεις. Ειδικότερα, τιμή ζ-δυναμικού κοντά στο ± 30 mV είναι ιδανική για νανοσωματίδια. Στις παραμέτρους που επηρεάζουν το ζ-δυναμικό συμπεριλαμβάνονται το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων, το μέσο διασποράς, η θερμοκρασία και κυρίως το pH του μέσου διασποράς. [21,22,23,35]

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου παρασκευής και χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων αλγινικού καθώς και νανοσωματιδίων αλγινικού – χιτοζάνης με σκοπό τον επιτυχή εγκλεισμό του φλαβονοειδούς χρυσίνης. Ο εγκλεισμός πραγματοποιείται με στόχο την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και την ελεγχόμενη αποδέσμευση και την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της χρυσίνης.

Ειδικότερα, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού συγκεντρώσεων 0.06%w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v σε αναλογίες χρυσίνης - αλγινικού 1:1, 1:2 και 4:3 (w/w). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού - χιτοζάνης με δύο διαφορετικές μεθόδους για τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3.

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Ο προσδιορισμός του ποσοστού της ένωσης που εγκλείστηκε επιτεύχθηκε μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) ενώ ο δομικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR).

Προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό της χρυσίνης που εγκλείστηκε μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), εφαρμόστηκε τόσο η έμμεση μέθοδος απόδοσης εγκλεισμού όσο και η άμεση μέθοδος.

Αναφορικά με τον χαρακτηρισμό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) διερευνήθηκε η σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε διάστημα τριών μηνών, καθώς μελετήθηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητά τους.

Τέλος, τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1.1 Υλικά

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων είναι τα εξής:

- ❖ Αλγινικό νάτριο, MW=216.12g/mol
- ❖ Tween80, Alfa Aesar
- ❖ Χρυσίνη(5,7 διυδροξυφλαβόνη) 97%,MW=254.241g/mol
- ❖ Χλωριούχο ασβέστιο(CaCl₂) , MW=110.99g/mol Panreac
- ❖ Αιθανόλη 99.5%,Merck
- ❖ Χιτοζάνη, TCI, 5-20mPa s, 0.5% σε οξικό οξύ 20°C
- ❖ Οξικό οξύ, Carlo Erba
- ❖ Υπερκάθαρο νερό

3.1.2 Όργανα και Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των νανοσωματιδίων αλγινικού αλλά και για την αξιολόγησή τους αναφέρονται παρακάτω:

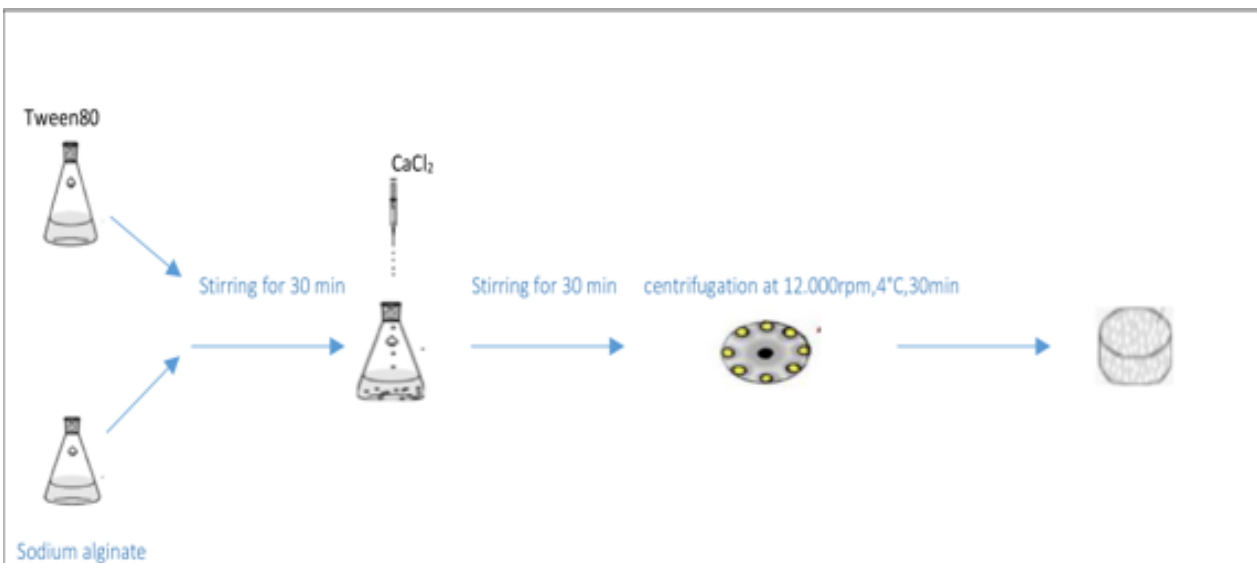
- ❖ Φασματοφωτόμετρο UV-VIS,V-770 UV-VIS Jasco
- ❖ Φασματόμετρο FT-IR, FT-IR-4200 Jasco
- ❖ Συσκευή DLS, Zetasizer Nano ZS Malvern
- ❖ Συσκευή φυγοκέντρου
- ❖ Λουτρό υπερήχων, WiseClean
- ❖ Freeze Dryer

Εγκλεισμός του φλαβονοειδούς χρυσίνη σε αλγινικό

3.2 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού

3.2.1 Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων(Blank)

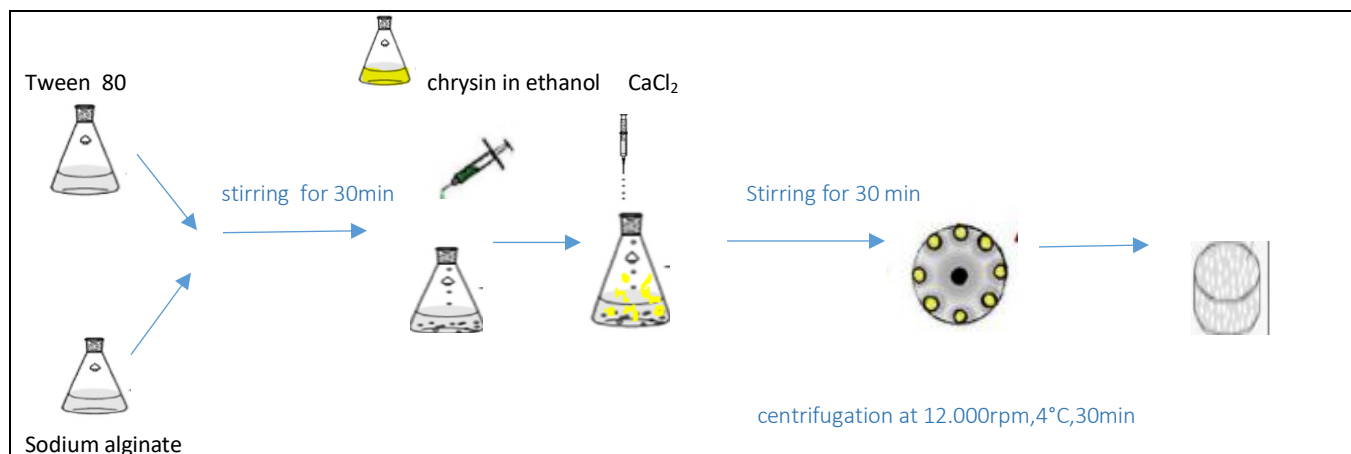
Σε διάλυμα αλγινικού νατρίου όγκου 9.5mL συγκέντρωσης 0.06%w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v αντίστοιχα προστίθεται επιφανειοδραστικός παράγοντας Tween 80 1%w/v σε αναλογία μάζας 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα του χλωριούχου ασβεστίου 18 mM τέτοια ώστε η αναλογία μάζας αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου να είναι 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση για άλλη μισή ώρα. Αφού ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C για μισή ώρα με συνολικά δύο εκπλύσεις με νερό. Τα νανοσωματίδια αλγινικού που έχουν σχηματιστεί οδηγούνται για λυοφιλοποίηση (Freeze-drying) προκειμένου να παραλειφθούν σε μορφή άσπρης σκόνης. Τα ανακτώμενα νανοσωματίδια ζυγίζονται και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. [39,40]



Εικόνα 11: Πειραματική διαδικασία παρασκευής κενών νανοσωματιδίων αλγινικού

3.2.2 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού με χρυσίνη (Chr-Alg)

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθεται διάλυμα αλγινικού νατρίου όγκου 9.5mL συγκέντρωσης 0.06%w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v αντίστοιχα μαζί με επιφανειοδραστικό παράγοντα Tween80 1%w/v σε αναλογία μάζας 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα χρυσίνης σε αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 1:1 ή 1:2 ή 4:3 η οποία πρώτα είχε διαλυθεί σε μικρή ποσότητα αιθανόλης. Έπειτα από 5 λεπτά προστίθεται το διάλυμα του χλωριούχου ασβεστίου 18mM τέτοιο ώστε η αναλογία μάζας αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου να είναι 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση στην ίδια θερμοκρασία για άλλη μισή ώρα. Αφού ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C για μισή ώρα με συνολικά δύο εκπλύσεις. Τα νανοσωματίδια αλγινικού με εγκλεισμένη την χρυσίνη που έχουν σχηματιστεί οδηγούνται για λυοφιλοποίηση (Freeze-drying) προκειμένου να παραλειφθούν σε μορφή κίτρινης σκόνης. Τα ανακτώμενα νανοσωματίδια ζυγίζονται και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. [39,40]



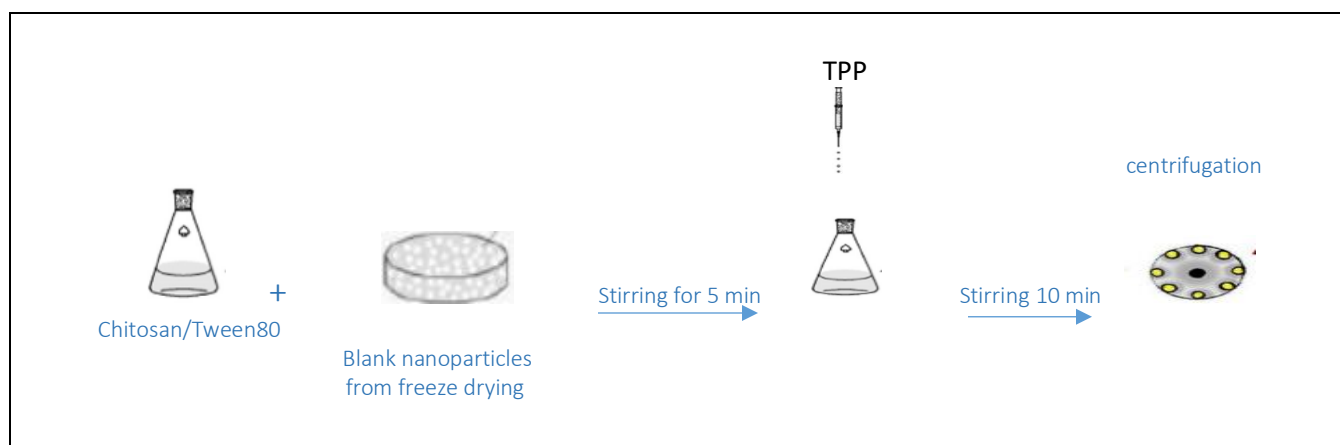
Εικόνα 12: Πειραματική διαδικασία παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης

3.3 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης

3.3.1 Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο Ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης (Μέθοδος Α)

Η μέθοδος ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης χρησιμοποιείται για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων αλγινικού με χιτοζάνη (CS).

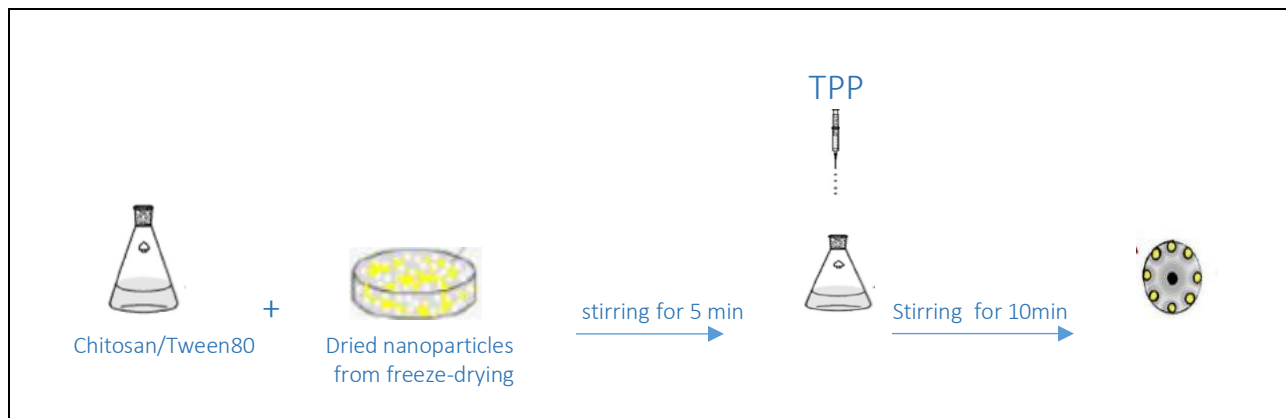
Συγκεκριμένα, σε γυάλινο φυαλίδιο προστίθενται 5 mL από διάλυμα 1% οξικού οξέος που περιέχει χιτοζάνη 0.2% w/v και Tween 80 σε αναλογία μάζας 1:1 με τη χιτοζάνη με 0.9mg από το ανακτώμενο από την λυοφιλοποίηση δείγμα αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v(Blank) το οποίο διαλύθηκε σε 0.75mL υπερκάθαρο νερό. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 2 mL από το διάλυμα TPP κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε η αναλογία CS:TPP να είναι 6:1 και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση ακόμα 10 λεπτά. [48]



Εικόνα 13: Πειραματική διαδικασία παρασκευής κενών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης(Μέθοδος Α)

3.3.2 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης-χρυσίνης με την Μέθοδο Α

Σε γυάλινο φυαλίδιο προστίθενται 5 mL από διάλυμα χιτοζάνης-Tween σε αναλογία μάζας 1:1 με συγκεκριμένη ποσότητα από το ανακτώμενο από την λυοφιλοποίηση δείγμα αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v σε αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 το οποίο διαλύθηκε σε 1.5mL υπερκάθαρο νερό. Για συγκεντρώσεις αλγινικού 0.06%w/v και 0.04%w/v προστέθηκαν 2.2 mg χρυσίνης, ενώ για συγκέντρωση αλγινικού 0.02%w/v προστέθηκαν 1.6mg χρυσίνης. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 2 mL από το διάλυμα TPP συγκέντρωσης 0.833g/l και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση ακόμα 10 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C για μισή ώρα με συνολικά δύο εκπλύσεις. Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που έχουν σχηματιστεί οδηγούνται για λυοφιλοποίηση(Freeze-drying) προκειμένου να παραλειφθούν σε μορφή κίτρινης σκόνης. Τα ανακτώμενα νανοσωματίδια ζυγίζονται και φυλάσσονται σε ξηραντήρα.[48]

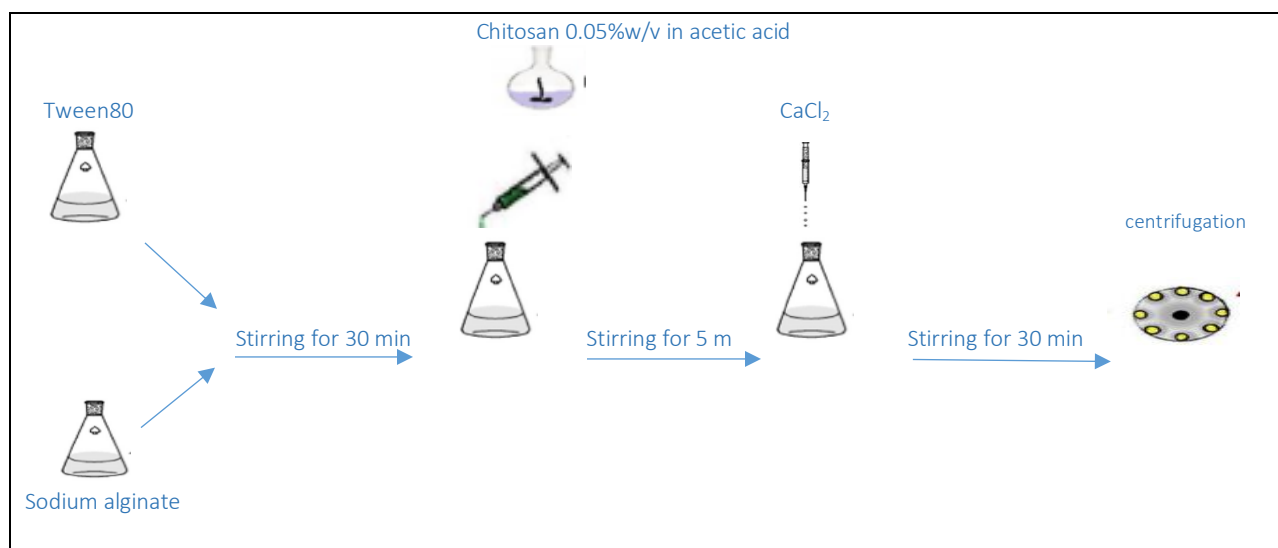


Εικόνα 14: Πειραματική διαδικασία παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο ιοντροπικής πηκτωμάτωσης(Μέθοδος Α)

3.3.3 Μέθοδος σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την Μέθοδο Β

Η μέθοδος αυτή δημιουργεί ένα πλέγμα των δύο πολυμερών τα οποία συνδέονται μεταξύ τους λόγω των αντίθετων φορτίων που διαθέτουν.

Συγκεκριμένα, σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται διάλυμα αλγινικού νατρίου όγκου 9.5mL συγκέντρωσης 0.06%w/v, με επιφανειοδραστικό Tween 80 1%w/v σε αναλογία μάζας 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mL από το διάλυμα χιτοζάνης συγκέντρωσης 0.05%w/v (σε 1%w/v οξικό οξύ), μετά από 5 λεπτά γίνεται προσθήκη 0.5 mL CaCl_2 συγκέντρωσης 18mM και το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση άλλη μισή ώρα. Αφού ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C για μισή ώρα με συνολικά δύο εκπλύσεις. Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που έχουν σχηματιστεί οδηγούνται για λυοφιλοποίηση (Freeze-drying) προκειμένου να παραλειφθούν σε μορφή άσπρης σκόνης. Τα ανακτώμενα νανοσωματίδια ζυγίζονται και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. [39,40]



Εικόνα 15: Πειραματική διαδικασία παρασκευής τυφλών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο Β

3.3.4 Μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο B

Σε γυάλινο φυαλίδιο προστίθενται διάλυμα αλγινικού νατρίου όγκου 9.5mL συγκέντρωσης 0.06%w/v, με επιφανειοδραστικό Tween80 1%w/v σε αναλογία μάζας 1:1. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα. Στη συνέχεια προστίθενται 7.6mg χρυσίνης διαλυμένα σε 1 mL αιθανόλης και μετά από 5 λεπτά προστίθενται 0.5mL CaCl₂ συγκέντρωσης 18mM. Το διάλυμα αφήνεται για μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα. Έπειτα ακολουθεί προσθήκη 4.8mL από το διάλυμα χιτοζάνης συγκέντρωσης 0.2%w/v (σε 1%v/v οξικό οξύ) , 2 mL διάλυμα TPP συγκέντρωσης 0.833g/L και ακολουθεί μαγνητική ανάδευση για επιπλέον μισή ώρα. Αφού ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία 4°C για μισή ώρα με συνολικά δύο εκπλύσεις. Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που έχουν σχηματιστεί οδηγούνται για λυοφιλοποίηση(Freeze-drying) προκειμένου να παραλειφθούν σε μορφή κίτρινης σκόνης. Τα ανακτώμενα νανοσωματίδια ζυγίζονται και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. [39,40]

3.4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

3.4.1 Απόδοση διεργασίας

Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από το λόγο της ποσότητας των ανακτώμενων ξηρών νανοσωματιδίων προς το άθροισμα των αρχικών ποσοτήτων του φορέα (αλγινικό) και της ένωσης που εγκλείεται (χρυσίνη). Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{Μάζα νανοσωματιδίων σε ξηρή μορφή (mg)}}{\text{Μάζα αλγινικού (mg) και μάζα χρυσίνης(mg)}} \quad (1)$$

3.4.2 Απόδοση εγκλεισμού

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).

3.4.2.1 Έμμεσος τρόπος υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού

Από το υπερκείμενο υγρό που προέρχεται από τις εκπλύσεις κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης λαμβάνονται 3 mL τα οποία φιλτράρονται με φίλτρο 200μm και ακολούθως λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200-500 nm, με χρήση κυψελίδας χαλαζία. Σε περίπτωση που η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη του 1, πραγματοποιείται αρραίωση του αρχικού δείγματος.

Απο την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει και έχοντας την καμπύλη αναφοράς του πρότυπου διαλύματος χρυσίνης, υπολογίζεται η ποσότητα της χρυσίνης που περιέχεται στο υπερκείμενο υγρό. Η απόδοση εγκλεισμού δίνεται από την παρακάτω σχέση :

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = 1 - \frac{\text{Μάζα ένωσης που δεν εγκλείστηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης (mg)}} \quad (2)$$

3.4.2.2 Άμεσος τρόπος υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού

Αρχικά έγινε προσθήκη 10 mg ανακτώμενου ξηρού συμπλόκου σε 10 mL απιονισμένου νερού και 5 mL οξικού αιθυλεστέρα σε γυάλινο φιαλίδιο. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων υπό θέρμανση στους 65° C για 20 min προκειμένου η οργανική φάση να δεσμεύσει την χρυσίνη.

Ακολουθεί εκχύλιση του δείγματος με δύο διαδοχικές εκπλύσεις με οξικό αιθυλεστέρα με σκοπό να παραμείνει μόνο η οργανική φάση και να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα νερού, καθώς και ξήρανση της οργανικής φάσης χρησιμοποιώντας Na_2SO_4 .

Εν συνεχεία, λαμβάνονται 3 mL από το δείγμα και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200-500 nm, με χρήση κυψελίδας χαλαζία. Σε περίπτωση που η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη του 1, πραγματοποιείται αρραίωση του αρχικού δείγματος.

Απο την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει και έχοντας την καμπύλη αναφοράς του πρότυπου διαλύματος χρυσίνης, υπολογίζεται η ποσότητα της χρυσίνης που περιέχεται δείγμα. Η απόδοση εγκλεισμού δίνεται από την παρακάτω σχέση :

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = \frac{\text{Μάζα ένωσης που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης (mg)}} \quad (3)$$

3.4.3 Χαρακτηρισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό έγινε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός με χρησιμοποίηση του οργάνου Zetasizer Nano ZS.

Πριν την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο, πραγματοποιείται υδατόλουτρο για 2 min και ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex για περίπου 1 min προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά του δείγματος. Η προσθήκη του δείγματος στην κυψελίδα τύπου U (DTS1070) πραγματοποιείται με σύριγγα μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων της και έπειτα το δείγμα τοποθετείται στο όργανο.

Με την χρήση κατάλληλου λογισμικού λαμβάνονται οι μετρήσεις μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού αντίστοιχα. Για κάθε ένα μέγεθος λαμβάνονται τρεις μετρήσεις προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και αφού ολοκληρωθούν οι μετρήσεις λαμβάνεται ο μέσος όρος τους.

Πριν την λήψη των μετρήσεων, δημιουργείται ένα αρχείο SOP για το μέγεθος και ένα για το ζ-δυναμικό. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δύο αρχεία SOP, ένα για τα τυφλά δείγματα (blank) και ένα για τα νανοσωματίδια που περιείχαν χρυσίνη. Στα αρχεία SOP συμπληρώνονται κάποιες πληροφορίες που αφορούν στο δείγμα, την κυψελίδα και το πρωτόκολλο μέτρησης. Ειδικότερα απαιτείται μέτρηση του δείκτη διάθλασης, του pH της διασποράς μέσω πεχαμετρικού χαρτιού, της απορρόφησης της διασποράς σε συγκεκριμένο μήκος κύματος που εκπέμπει το laser της συσκευής (633 nm). Οι παραπάνω πληροφορίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Στοιχεία για την δημιουργία αρχείου SOP

	Blank	Chr
pH	7	7
Δείκτη διάθλασης	1.3319	1.3323
Απορρόφηση στα 633 nm	0.0061	0.0099
Θερμοκρασία	25 ± 1	25 ± 1

3.4.4 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Η μέθοδος υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιείται προκειμένου να επιβεβαιωθεί εάν ο εγκλεισμός είναι επιτυχής ή όχι. Αρχικά λαμβάνονται τα φάσματα FT-IR των φορέων εγκλεισμού αλγινικού και χιτοζάνης, το φάσμα απορρόφησης της ένωσης που εγκλειστήκε (χρυσίνη) καθώς και το φάσμα του φυσικού μίγματος χρυσίνης-αλγινικού σε αναλογία 4:3. Ακολούθως, λαμβάνονται τα φάσματα των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων αλγινικού – χρυσίνης σε αναλογία 4:3 για όλες τις συγκεντρώσεις αλγινικού καθώς και ένα τυφλό δείγμα αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων για νανοσωματίδια αλγινικού με επικάλυψη χιτοζάνης που προέκυψαν από δύο διαφορετικές μεθόδους προκειμένου να επιτευχθεί σύγκριση. Για την λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε η ανάμειξη των ουσιών με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία περίπου 1:100 για την παρασκευή δείγματος με την μορφή δισκίου (παλέτας).

4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρασκευή και την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων προκειμένου να επιτευχθεί ο χαρακτηρισμός τους. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα απόδοσης διεργασίας και εγκλεισμού αλλά και τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS που χαρακτηρίζει τα νανοσωματίδια ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό. Ακολουθεί δομικός χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FT-IR).

4.1.1 Υπολογισμός απόδοσης διεργασίας

Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση

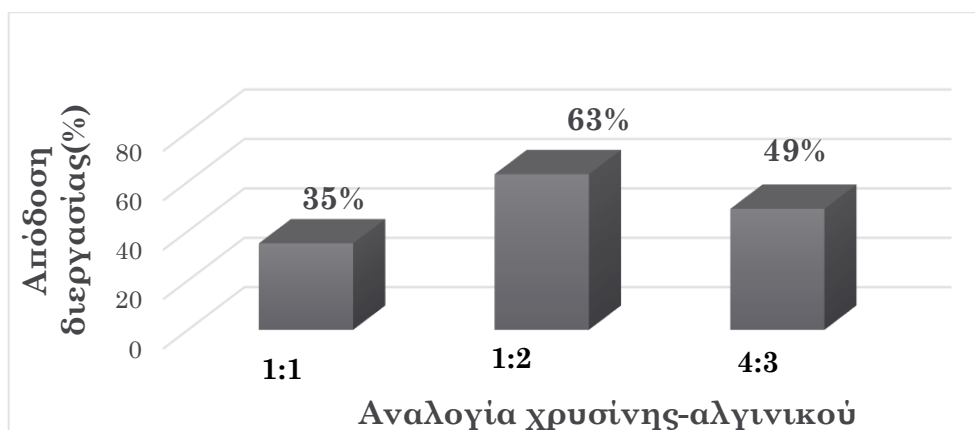
$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{Μάζα νανοσωματιδίων σε ξηρή μορφή (mg)}}{\text{Μάζα αλγινικού (mg) και μάζα χρυσίνης (mg)}} \quad (1)$$

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας για τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού σε διάφορες αναλογίες αλγινικού-χρυσίνης καθώς και τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης.

Υπολογισμός απόδοσης διεργασίας στα νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης σε κανονική και μεγάλη κλίμακα

Πίνακας 2: Απόδοση διεργασίας για τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Μάζα αλγινικού(mg)	Μάζα χρυσίνης (mg)	Συνολική αρχική ποσότητα αλγινικού-χρυσίνης(mg)	Ποσότητα ανακτώμενων ξηρών νανοσωματιδίων(mg)	Απόδοση διεργασίας(%)
1:1	5.7	5.7	11.4	4	35
1:2	5.7	2.85	8.55	5.4	63
4:3	5.7	7.6	13.3	6.5	49



Διάγραμμα 1: Απόδοση διεργασίας νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v συναρτήσει των τριών αναλογιών

Πίνακας 3: Απόδοση διεργασίας για τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.04%w/v

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Μάζα αλγινικού(mg)	Μάζα χρυσίνης (mg)	Συνολική αρχική ποσότητα αλγινικού-χρυσίνης(mg)	Ποσότητα ανακτώμενων ξηρών νανοσωματιδίων(mg)	Απόδοση διεργασίας(%)
1:1	3.8	3.8	7.6	3.5	46

1:2	3.8	1.9	5.7	1.8	32
4:3	3.8	5.06	8.86	2.2	25

Πίνακας 4: Απόδοση διεργασίας για τα νανοσωματίδια αλγινικού 0.02%w/v

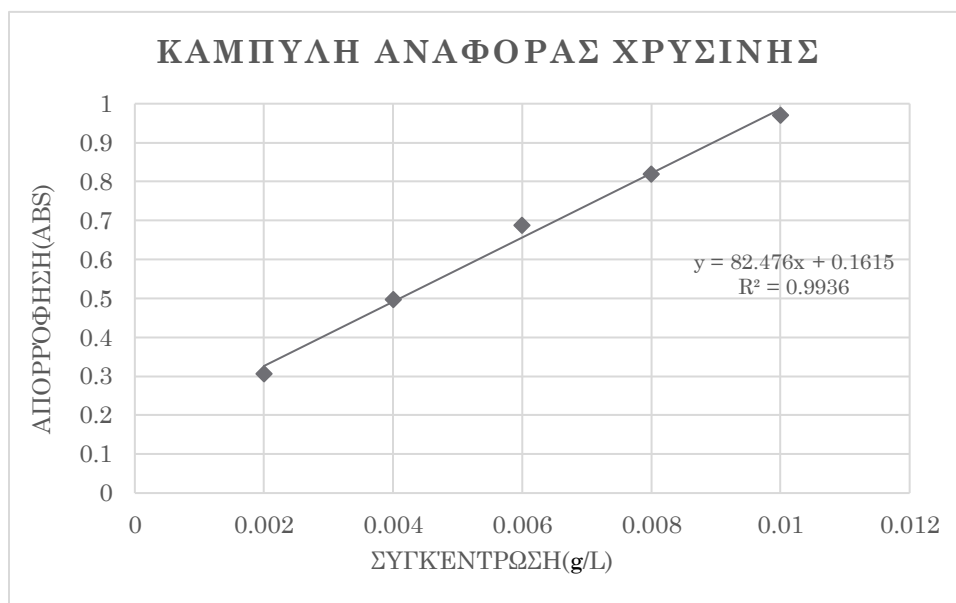
Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Μάζα αλγινικού(mg)	Μάζα χρυσίνης (mg)	Συνολική αρχική ποσότητα αλγινικού-χρυσίνης(mg)	Ποσότητα ανακτώμενων ξηρών νανοσωματιδίων(mg)	Απόδοση διεργασίας(%)
1:1	1.9	1.9	3.8	1.0	26
1:2	1.9	0.95	2.85	1.2	42
4:3	1.9	2.5	4.4	1.6	36

Πίνακας 5: Απόδοση διεργασίας για νανοσωματίδια αλγινικού τριών συγκεντρώσεων σε αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 σε μεγαλύτερη κλίμακα(scale-up)

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Συγκέντρωση αλγινικού(%)	Μάζα αλγινικού(mg)	Μάζα χρυσίνης (mg)	Συνολική αρχική ποσότητα αλγινικού - χρυσίνης(mg)	Ποσότητα ανακτώμενων ξηρών νανοσωματιδίων(mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
4:3	0.06	57	76.0	133	74.3	56
	0.04	16.8	22.4	39.2	26.2	67
	0.02	50	65.8	115.8	20.1	17

4.1.2 Υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού

Για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού αρχικά κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν διαλύματα χρυσίνης σε αιθανόλη γνωστής συγκέντρωσης και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 264nm. Η καμπύλη αναφοράς της χρυσίνης φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς χρυσίνης ($\lambda=264\text{nm}$)

4.1.2.1 Έμμεσος υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = 1 - \frac{\text{Μάζα ένωσης που δεν εγκλείστηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα ένωσης (mg)}}$$

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 2), η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων υπολογίζεται από την σχέση **Abs=82.476C2 +0.1615** (3) όπου

- ❖ C2=Τελική συγκέντρωση χρυσίνης σε g/L
- ❖ Abs=Απορρόφηση δείγματος νανοσωματιδίων στα 264 nm

Από την σχέση (3) υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση C2

Στη συνέχεια εφαρμόζεται ο νόμος αραιώσης $C_1V_1=C_2V_2 \rightarrow C_1=\frac{C_2 \cdot V_2}{V_1}$ (4) όπου

- ❖ V1= Όγκος δείγματος που πήραμε από το υπερκείμενο
- ❖ V2= Όγκος κυψελίδας(3mL)

- ❖ $C1 =$ Συγκέντρωση χρυσίνης στο δείγμα όγκου $V1$

Από την σχέση (4) υπολογίζεται η συγκέντρωση $C1$

Η μάζα της χρυσίνης υπολογίζεται από την σχέση $m = C1 \cdot V$ (5) όπου

- ❖ $V =$ Συνολικός όγκος υπερκείμενου
- ❖ $m =$ ποσότητα χρυσίνης που δεν εγκλείστηκε

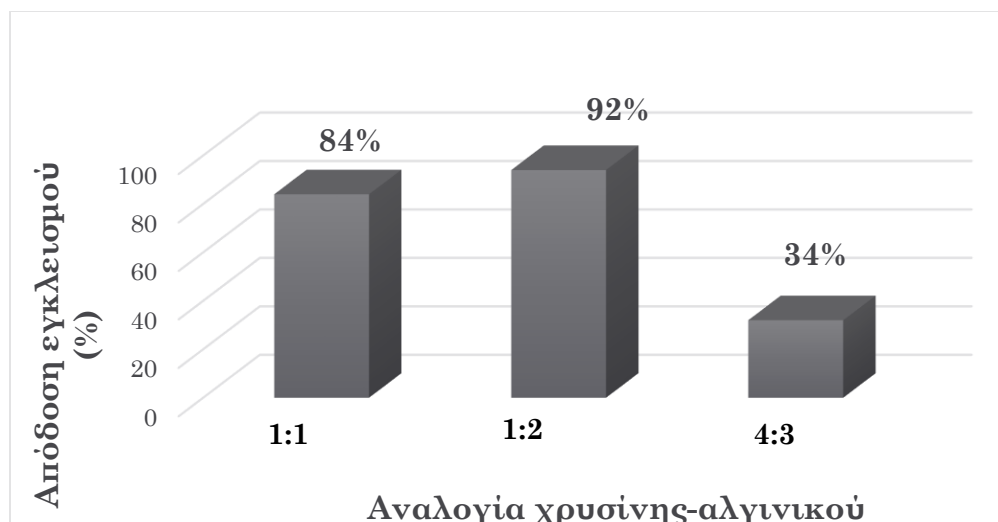
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων εγκλεισμού των νανοσωματιδίων για τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού και για όλες τις διαφορετικές αναλογίες αλγινικού-χρυσίνης.

Πίνακας 6: Απόδοση εγκλεισμού για τα νανοσωματίδια συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Αρχική μάζα χρυσίνης (mg)	Ποσότητα χρυσίνης που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1:1	5.7	5.7	100
1:2	2.85	0.19	93
4:3	7.6	0.22	97

Πίνακας 7: Απόδοση εγκλεισμού για τα νανοσωματίδια συγκέντρωσης 0.04%w/v

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Αρχική μάζα χρυσίνης (mg)	Ποσότητα χρυσίνης που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1:1	3.8	0.60	84
1:2	1.9	1.26	34
4:3	5.06	0.41	92



Διάγραμμα 3: Απόδοση εγκλεισμού νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 0.04%w/v συναρτήσει των τριών αναλογιών χρυσίνης-αλγινικού

Πίνακας 8: Απόδοση εγκλεισμού για τα νανοσωματίδια συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Αρχική μάζα χρυσίνης (mg)	Ποσότητα χρυσίνης που εγκλειστήκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1:1	1.9	0.7	88
1:2	0.95	0.95	100
4:3	2.5	2.5	100

4.1.2.2 Άμεσος υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού

Για τον άμεσο υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού εφαρμόζονται οι παραπάνω σχέσεις (2), (3), (4) και (5).

Πίνακας 11: Απόδοση εγκλεισμού για νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 σε μεγαλύτερη κλίμακα(scale-up)

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Ποσότητα χρυσίνης που εγκλείστηκε (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
4:3	6.44	64

Η απόδοση εγκλεισμού με την άμεση μέθοδο είναι σημαντικά μικρότερη από την απόδοση εγκλεισμού που προέκυψε από την έμμεση μέθοδο. Ωστόσο η τιμή της άμεσης μεθόδου είναι πιο ρεαλιστική καθώς είναι λογικό να εγκλειστεί ένα μέρος της χρυσίνης. Το γεγονός ότι η απόδοση εγκλεισμού με την έμμεση μέθοδο είναι τόσο υψηλή πιθανώς σημαίνει ότι η μικρή διαλυτότητα της χρυσίνης σε υδατικό διάλυμα εμποδίζει την ανίχνευσή της μέσω της μεθόδου UV-Vis.

4.1.3 Υπολογισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων

Για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν μετράται το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

Κατά την μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το DLS για τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού σε όλες τις διαφορετικές αναλογίες αλγινικού-χρυσίνης.

4.1.3.1 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού (Blank)

Πίνακας 12: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού (BLANK) για τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού

Συγκέντρωση αλγινικού (%)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)

0.06	370 ±3.2	0.52 ±0.003	-20 ±0.70
0.04	415 ±36.2	0.40 ±0.03	-28.6 ±3.75
0.02	700 ±111.7	0.67 ±0.04	-15 ±4.94

Τα νανοσωματίδια αλγινικού (Blank) παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 370 nm έως 700nm. Επίσης όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων, τα νανοσωματίδια αλγινικού (Blank) συγκέντρωσης 0.06%w/v σχηματίζουν δύο μεγάλες οικογένειες σε ισάριθμο ποσοστό. Αντίθετα, τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.04%w/v και 0.02%w/v σχηματίζουν μία χαρακτηριστική οικογένεια σε υψηλό ποσοστό, ενώ υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό νανοσωματιδίων που το μέγεθός τους είναι χαμηλότερο από τα 100nm. Η ευρεία κατανομή μεγέθους έχει ως αποτέλεσμα ο δείκτης πολυδιασποράς που είναι χαρακτηριστικός της ομοιομορφίας του μεγέθους να εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές. Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται από 0.4 έως 0.67 γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μέτριας ομοιομορφίας μεγέθους.

Τα κενά νανοσωματίδια αλγινικού (Blank) εμφανίζουν τιμή ζ-δυναμικού που κυμαίνεται από -15mV έως -28.6mV. Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν σχετικά υψηλά αρνητικές τιμές γεγονός που υποδεικνύει σημαντική σταθερότητα και μειωμένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων.

Πίνακας 9:Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου,δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού(BLANK) για τις δύο συγκεντρώσεις αλγινικού σε μεγαλύτερη κλίμακα(scale-up)

Συγκέντρωση αλγινικού(%)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό(mV)
0.06	469.7 ± 17.9	0.44 ± 0.017	-30 ± 5
0.02	359.6 ± 15.6	0.63 ± 0.036	-22.2 ± 4.04

Τα νανοσωματίδια αλγινικού (Blank) μεγαλύτερης κλίμακας παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 359 nm έως 469 nm. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων, τα νανοσωματίδια αλγινικού (Blank) σχηματίζουν δύο οικογένειες. Η ευρεία κατανομή μεγέθους έχει ως αποτέλεσμα ο δείκτης πολυδιασποράς που είναι χαρακτηριστικός της ομοιομορφίας του

μεγέθους να εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές. Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται από 0.44 έως 0.63 γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μέτριας ομοιομορφίας μεγέθους.

Τα νανοσωματίδια αλγινικού(Blank) μεγαλύτερης κλίμακας εμφανίζουν τιμή ζ-δυναμικού που κυμαίνεται κατά απόλυτη τιμή από 22.2 mV έως 30 mV. Τα νανοσωματίδια συγκέντρωσης 0.02%w/v εμφανίζουν ικανοποιητική τιμή ζ-δυναμικού ενώ τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v παρουσιάζουν αρκετά υψηλή τιμή γεγονός που υποδεικνύει σημαντική σταθερότητα και μειωμένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων.

4.1.3.2 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού χρυσίνης

Πίνακας 10: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης για τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού στις τρεις αναλογίες

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Συγκέντρωση αλγινικού(%)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό(mV)
1:1	0.06	300±18.7	0.40 ±0.1	-13 ±6.9
	0.04	970 ±59.16	0.74 ±0.01	-15.2 ±6.98
	0.02	225 ±6.15	0.35 ±0.02	-20 ±2.60
1:2	0.06	400 ±100.6	0.45 ±0.03	-13 ±5.1
	0.04	333 ±24.78	0.39 ±0.01	-7.6 ±0.982
	0.02	600 ±70.06	0.50 ±0.08	-30 ±2.30
4:3	0.06	191± 7.8	0.30 ±0.02	-37 ±4.65
	0.04	219 ±6.417	0.38 ±0.02	-43 ±0.70
	0.02	230 ±21.45	0.30 ±0.06	-32 ±3.61

Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται από 191 nm έως 600nm. Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, η αναλογία χρυσίνης – αλγινικού 4:3 παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς. Αναλυτικότερα, παρατηρείται ότι στην αναλογία 4:3 για συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν το μικρότερο μέγεθος με μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 190 nm και τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0.30. Η τιμή δείκτη πολυδιασποράς με μέσο όρο 0.3 υποδηλώνει αρκετά καλή ομοιομορφία μεγέθους. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις διάφορες αναλογίες χρυσίνης-αλγινικού παρατηρείται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα χρυσίνης που χρησιμοποιήθηκε κατά τον εγκλεισμό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το αλγινικό δεν διαλύεται εύκολα με αποτέλεσμα να παρουσιάζει υψηλή τάση συσσωμάτωσης.

Η αναλογία χρυσίνης- αλγινικού 4:3 εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές ζ-δυναμικού με τιμές που κυμαίνονται από -32mV έως -43mV. Σημαντικά αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού φανερώνουν υψηλή σταθερότητα μεγέθους και έλλειψη τάσης συσσωμάτωσης. Όπως παρατηρείται από τις τιμές ζ-δυναμικού, η παρουσία αλγινικού σε μεγαλύτερη αναλογία συγκριτικά με εκείνη της χρυσίνης προκαλεί την μείωση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα να καθιστά δύσκολη την εφαρμογή τους σε περαιτέρω εφαρμογές.

Πίνακας 11: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης για τις συγκεντρώσεις αλγινικού 0.06%w/v και 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 σε μεγαλύτερη κλίμακα(scale-up)

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Συγκέντρωση αλγινικού(%)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό(mV)
4:3	0.06	595 ±46.6	0.65 ±0.042	-22.4 ±1.47
	0.02	438.3 ±24.87	0.39 ±0.019	-12.2 ±0.68

Τα νανοσωματίδια αλγινικού μεγαλύτερης κλίμακας παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους καθώς το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 438 nm έως 595 nm. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων, τα νανοσωματίδια αλγινικού – χρυσίνης σχηματίζουν μία χαρακτηριστική οικογένεια σε υψηλό ποσοστό, ενώ υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό νανοσωματιδίων, της τάξης του 10% που το μέγεθός τους είναι χαμηλότερο από 150 nm. Η ευρεία κατανομή μεγέθους έχει ως αποτέλεσμα ο δείκτης πολυδιασποράς που είναι χαρακτηριστικός της ομοιομορφίας του μεγέθους να εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές. Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται από 0.39 έως 0.65 γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μέτριας ομοιομορφίας μεγέθους.

Τα νανοσωματίδια αλγινικού μεγαλύτερης κλίμακας εμφανίζουν τιμή ζ-δυναμικού που κυμαίνεται κατά απόλυτη τιμή από 15mV έως 28.6mV. Τα νανοσωματίδια συγκέντρωσης 0.06%w/v εμφανίζουν ικανοποιητική τιμή ζ-δυναμικού ενώ τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%w/v παρουσιάζουν αρκετά χαμηλή τιμή γεγονός που υποδεικνύει έλλειψη σταθερότητας και αυξημένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων.

4.1.3.3 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που παρασκευάστηκαν με την Μέθοδος A

Πίνακας 12: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης για όλες τις συγκεντρώσεις αλγινικού και για αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 καθώς και blank δείγματος

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Συγκέντρωση αλγινικού(%)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό(mV)
Blank	0.06	184.3 ± 8.1	0.4 ± 0.017	42 ± 5.00
4:3	0.06	131.7 ± 13.5	0.39 ± 0.050	33.93 ± 0.75
	0.04	240.6 ± 30.56	0.54 ± 0.150	30.5 ± 4.04
	0.02	139.5 ± 0.50	0.41 ± 0.024	21.4 ± 4.59

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, τα νανοσωματίδια αλγινικού που επικαλύπτονται με χιτοζάνη παρουσιάζουν χαμηλότερα μεγέθη μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου συγκριτικά με τα νανοσωματίδια αλγινικού. Ειδικότερα, το μέγεθός τους κατά μέσο όρο κυμαίνεται από 131 nm έως 240 nm. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα νανοσωματίδια αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v παρουσιάζουν το μικρότερο μέγεθος με τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 131.7 nm και δείκτη πολυδιασποράς 0.39. Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται από 0.39 έως 0.54 γεγονός που υποδηλώνει μέτρια διασπορά και ομοιομορφία μεγέθους. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων, τα

νανοσωματίδια σχηματίζουν μία κύρια οικογένεια η οποία έχει μορφή κανονικής κατανομής ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό, της τάξης του 5% έχει μέγεθος σωματιδίων μεγαλύτερο από 5μm.

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης παρουσιάζουν θετικό ζ-δυναμικό. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η χιτοζάνη είναι ένα ισχυρά θετικό πολυμερές και επομένως κατά την επικάλυψη το θετικό φορτίο της χιτοζάνης βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης εμφανίζουν τιμή ζ-δυναμικού που κυμαίνεται από 21.4 mV έως 33.93 mV, γεγονός που υποδεικνύει σημαντική σταθερότητα. Ειδικότερα, την υψηλότερη τιμή ζ-δυναμικού παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια που προκύπτουν με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v.

4.1.3.4 Αποτελέσματα DLS για τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που παρασκευάστηκαν με την δεύτερη μέθοδο (Μέθοδος Β)

Πίνακας 13: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης για όλες συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και για αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 καθώς και blank δείγματος.

Αναλογία χρυσίνης-αλγινικού	Περιεκτικότητα διαλύματος χιτοζάνης (%)	Ποσότητα διαλύματος TPP(0.83g/L) σε mL	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό(mV)
Blank	0.05	-	129.8 ± 3	0.43 ± 0.014	18.9 ± 6.92
4:3	0.2	2	391.6 ± 83.26	0.4 ± 0.041	21.56 ± 1.62

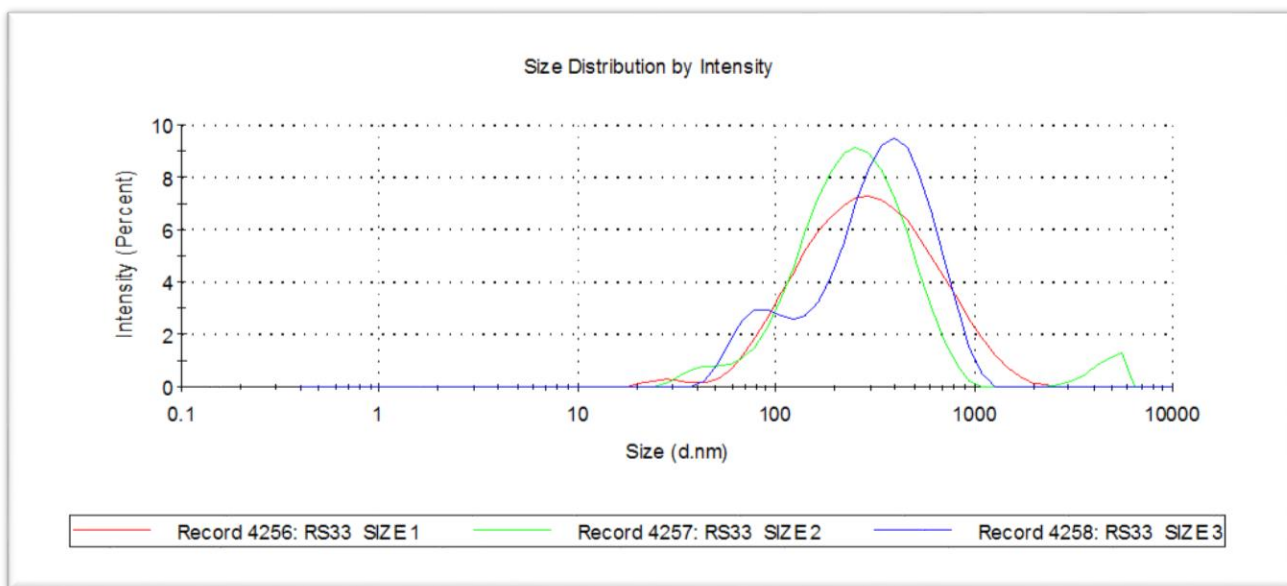
Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, τα νανοσωματίδια αλγινικού που επικαλύπτονται με χιτοζάνη σύμφωνα με την μέθοδο Β παρουσιάζουν υψηλότερα μεγέθη μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου συγκριτικά με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης μέσω της μεθόδου ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης. Ειδικότερα, το μέγεθός τους κατά μέσο όρο είναι 391 nm. Η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς είναι 0.4 γεγονός που υποδηλώνει μέτρια διασπορά και ομοιομορφία μεγέθους. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων, τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν ευρεία κατανομή μεγέθους το οποίο είναι εμφανές από την ύπαρξη δύο οικογενειών.

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης που σχηματίστηκαν με την μέθοδο B παρουσιάζουν θετικό ζ-δυναμικό αλλά μικρότερο συγκριτικά με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που σχηματίστηκαν με την μέθοδο ιοντροπικής πηκτωμάτωσης. Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης με την μέθοδο B εμφανίζουν τιμή ζ-δυναμικού περίπου ίση με 22 mV, γεγονός που υποδεικνύει μέτρια σταθερότητα.

Σταθερότητα νανοσωματιδίων έπειτα από τρεις μήνες

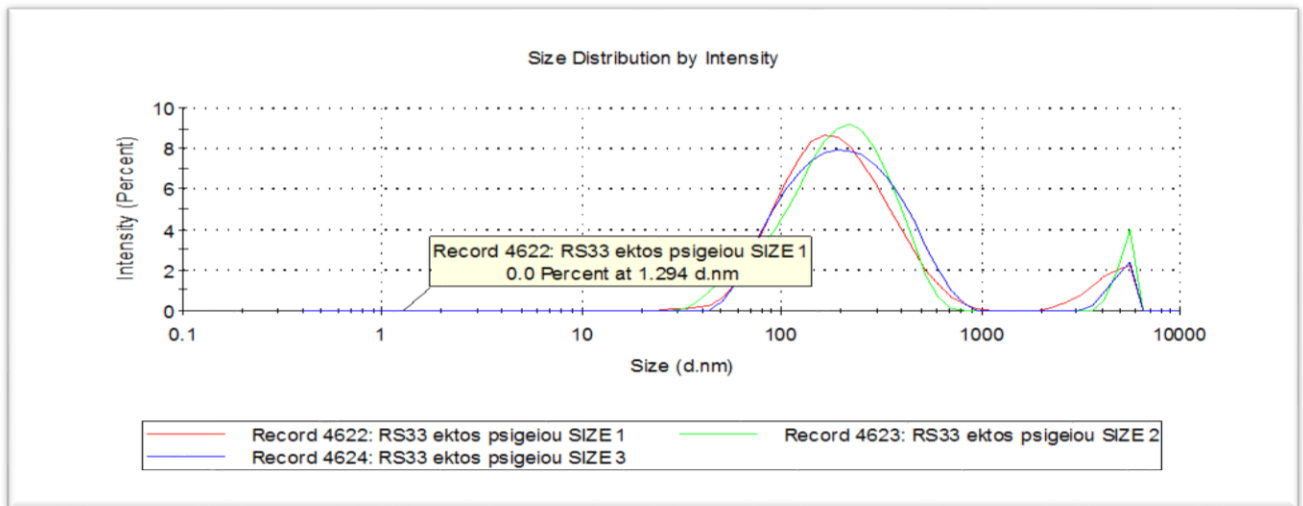
Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση αλγινικού 0.02%w/v και με αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν ως προς την σταθερότητά τους έπειτα από διάστημα τριών μηνών. Αρχικά παρατίθεται η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αμέσως μετά τη σύνθεσή τους (Εικόνα 17).

Μελέτη σταθερότητας δείγματος συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v



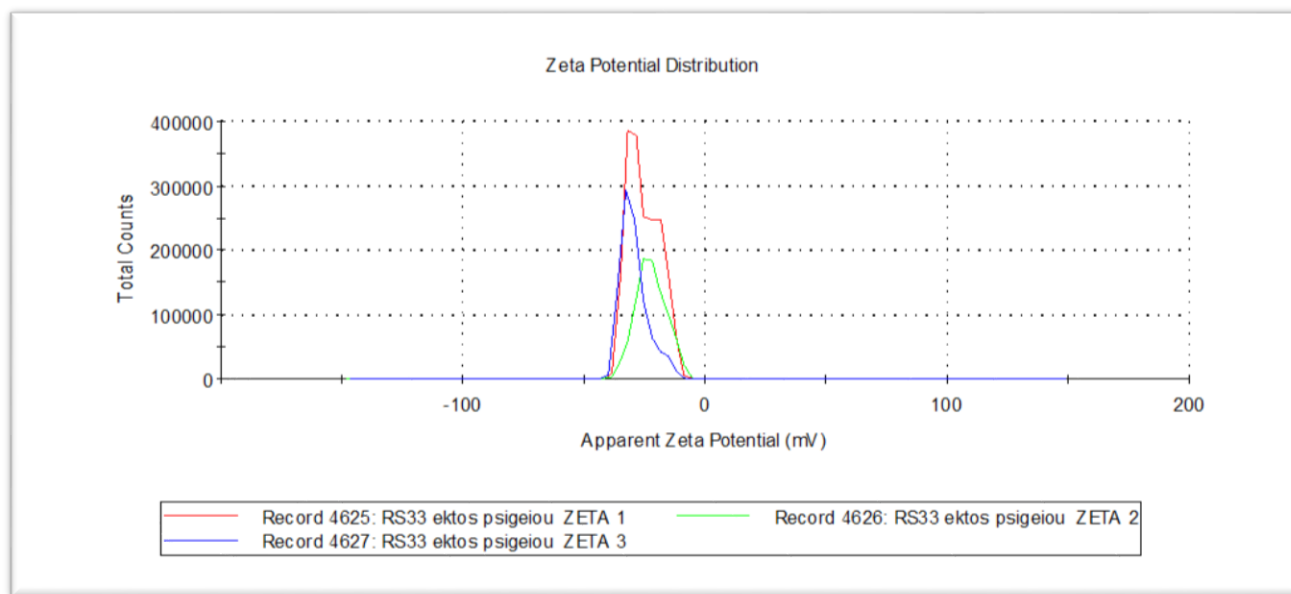
Εικόνα 17: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3

Παρακάτω παρουσιάζεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων μετά από διάστημα τριών μηνών και αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Εικόνα 18).



Εικόνα 28: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 έπειτα από διάστημα τριών μηνών

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, τα νανοσωματίδια έπειτα από διάστημα τριών μηνών με αποθήκευση σε συνθήκες περιβάλλοντος εμφανίζουν πολύ μικρή απόκλιση συγκριτικά με το αντίστοιχο αρχικό δείγμα. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα νανοσωματίδια με συγκέντρωση αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3 είναι ιδιαίτερως σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, η τιμή μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου είναι ίση με $230 \pm 21.45 \text{ nm}$, ο δείκτης πολυδιασποράς(PDI) 0.30 ± 0.06 και ζ-δυναμικό $-32 \pm 3.61 \text{ mV}$.

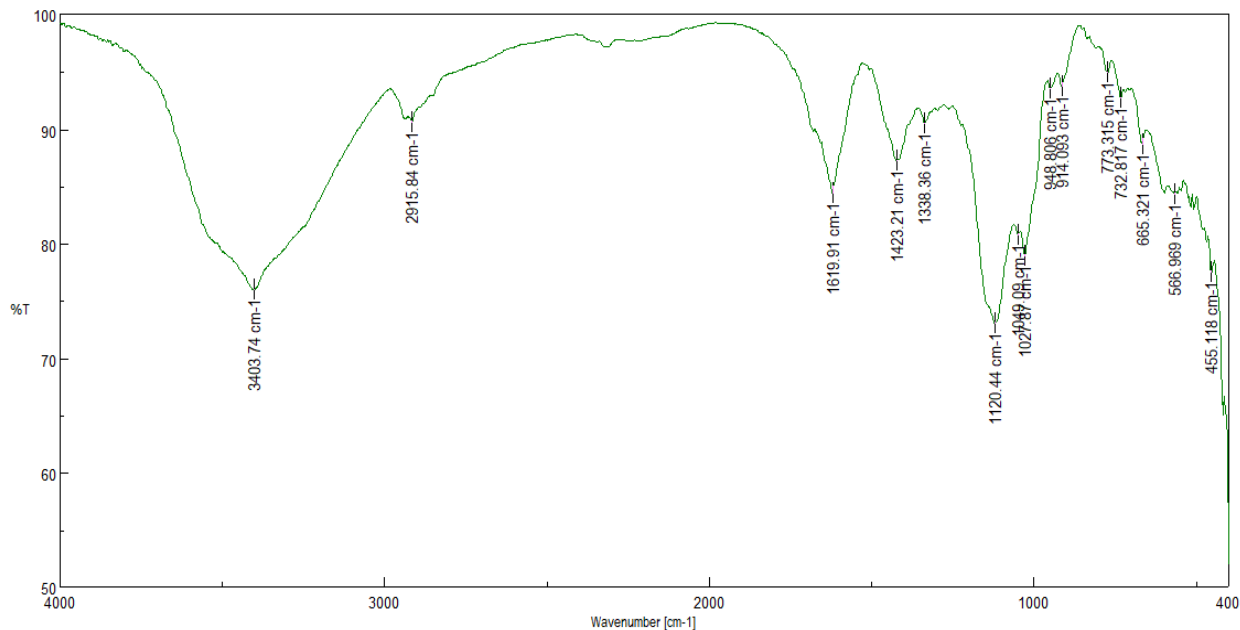


Εικόνα 16:Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3 μετά από διάστημα τριών μηνών.

Επίσης, για το ίδιο δείγμα το οποίο όμως είχε αφεθεί για τρεις μήνες σε διαφορετική θερμοκρασία (εντός ψυγείου) μετρήθηκε πάλι το μέγεθος με την μέθοδο δυναμικής σκέδασης (DLS) προκειμένου να μελετηθεί πως επηρεάζει ο παράγοντας της θερμοκρασίας την μέση υδροδυναμική διάμετρο. Τα αποτελέσματα ωστόσο φανέρωσαν σημαντική αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI), γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση της θερμοκρασίας οδήγησε σε πιθανή συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων.

4.1.4 Μελέτη δομής νανοσωματιδίων μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)

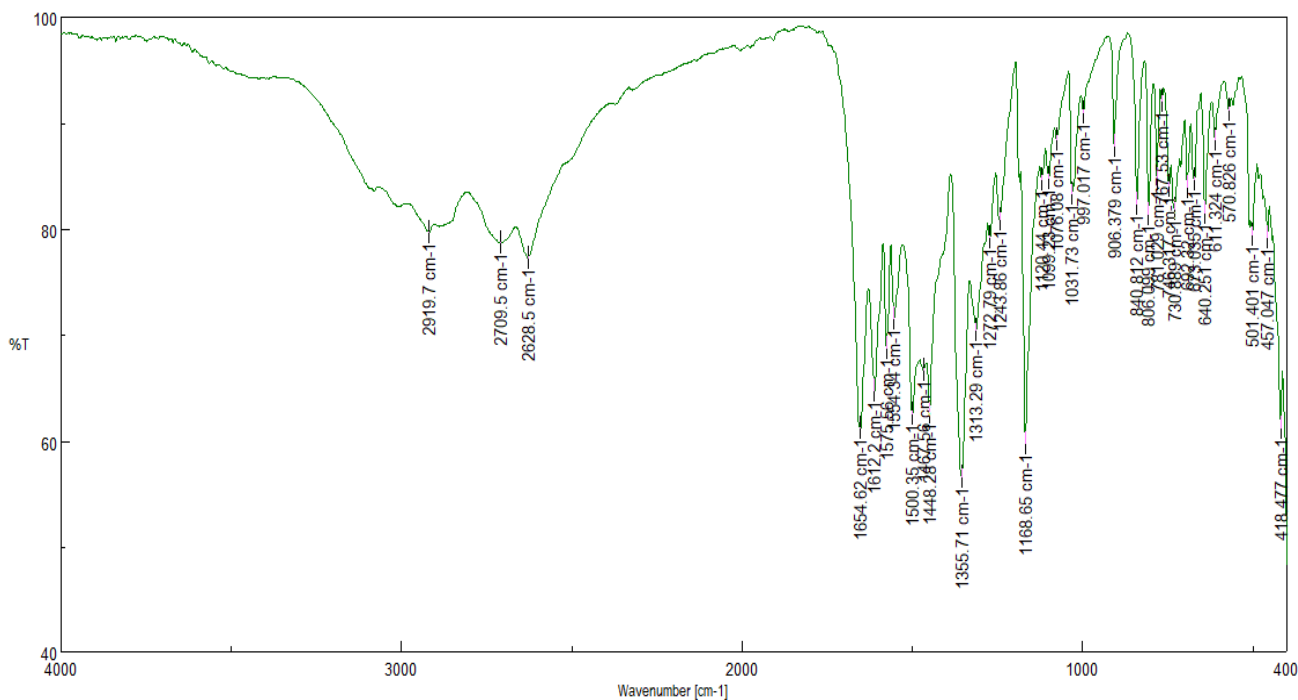
Το φάσμα του αλγινικού νατρίου εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20)



Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR του αλγινικού νατρίου

Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος αλγινικού νατρίου εμφανίζονται στα 3403.7 cm^{-1} που οφείλεται σε O-H δόνηση τάσης ενώ στα 2915.84 cm^{-1} εμφανίζεται μία μικρότερη κορυφή η ύπαρξη της οποίας αποδίδεται σε C-H δόνηση τάσης. Στα 1619.19 cm^{-1} η κορυφή αποδίδεται σε ασύμμετρη δόνηση τάσης του καρβονυλίου C=O και στα 1423.21 cm^{-1} η κορυφή οφείλεται σε δόνηση κάμψης C-O-H με την συμβολή συμμετρικών δονήσεων τάσης της καρβοξυλικής ομάδας C=O. Τέλος, η κορυφή στα 1120.44 cm^{-1} που οφείλεται σε C-O δόνηση τάσης.

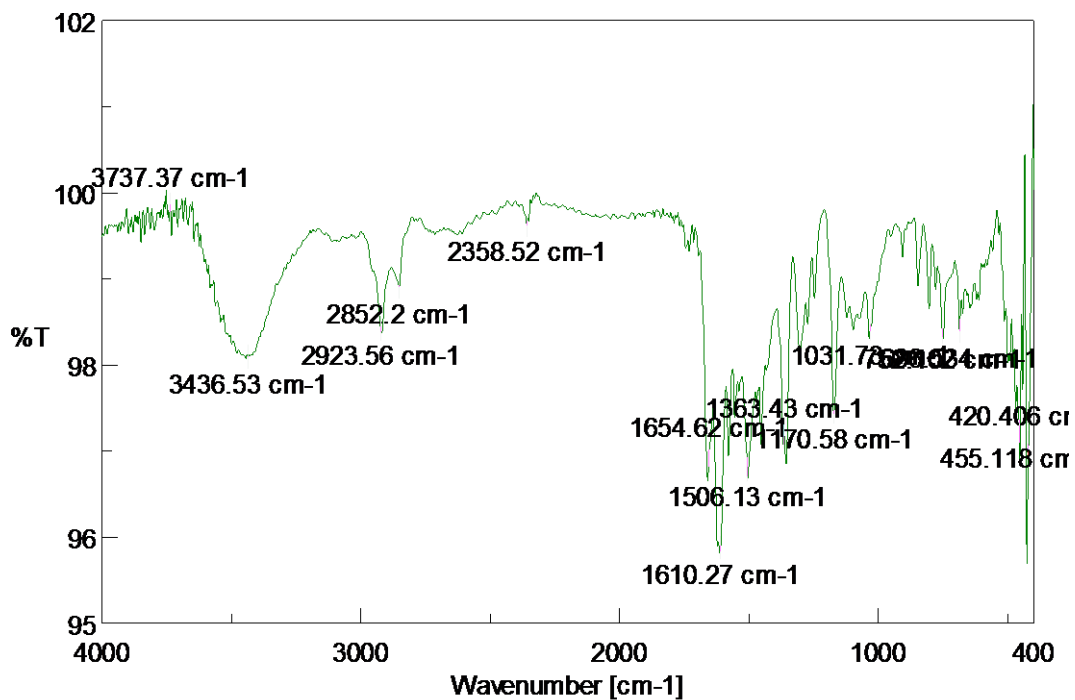
Το φάσμα FT-IR της χρυσίνης εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 21)



Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR χρυσίνης

Αρχικά, περίπου στα $3500-4000\text{cm}^{-1}$ εμφανίζεται ένας θόρυβος που προκύπτει από συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης O-H. Η εμφάνιση μικρών κορυφών στα 2919.7cm^{-1} , 2709.5cm^{-1} και 2628.5cm^{-1} αποδίδεται σε τάσεις δόνησης C-H. Οι χαρακτηριστικές κορυφές στο μόριο της χρυσίνης εμφανίζονται στα 1654.62cm^{-1} και 1612.2cm^{-1} που οφείλονται σε C=O τάσεις δόνησης. Οι κορυφές στα 1575.66cm^{-1} και 1500.35cm^{-1} εμφανίζονται λόγω τάσεων δόνησης C-C, ενώ οι κορυφές στα 1448.28cm^{-1} και 1467.56cm^{-1} οφείλονται σε αρωματικές C-H δονήσεις κάμψης. Η εμφάνιση μικρής κορυφής στα 1272.79cm^{-1} αποδίδεται σε C-C δονήσεις κάμψης ενώ η κορυφή στα 1120.44cm^{-1} είναι χαρακτηριστική λόγω της παρουσίας O-H δονήσεων κάμψης.

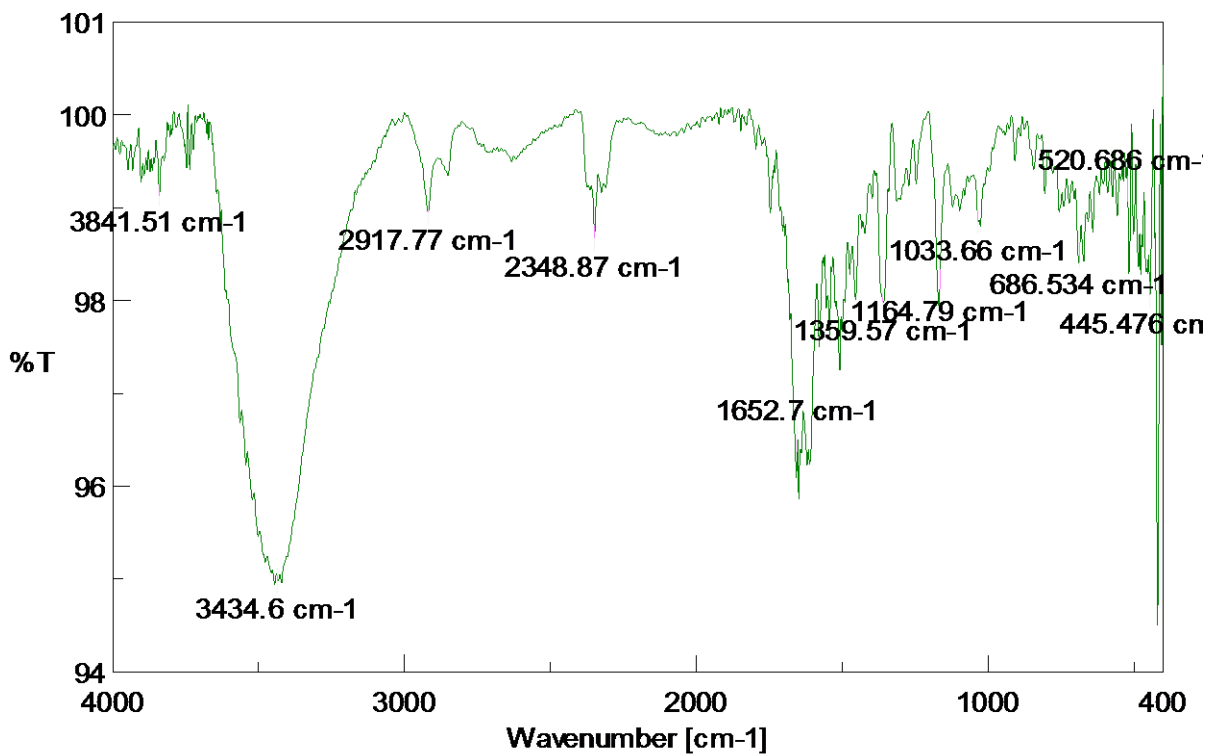
Το φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού (Blank) εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 22)



Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού(Blank)

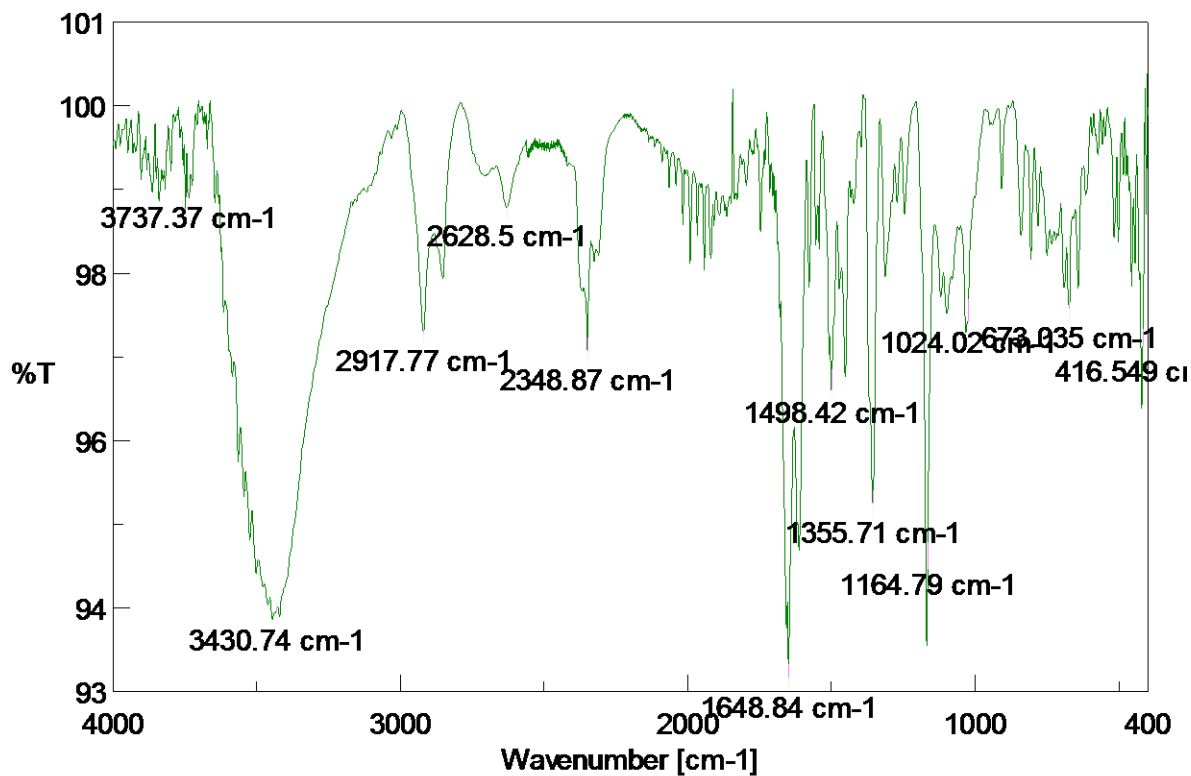
Στη συνέχεια εξετάζονται τα φάσματα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης(Chr-Alg)

Πρώτα παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v με αναλογία χρυσίνη-αλγινικό 4:3(Εικόνα 23).



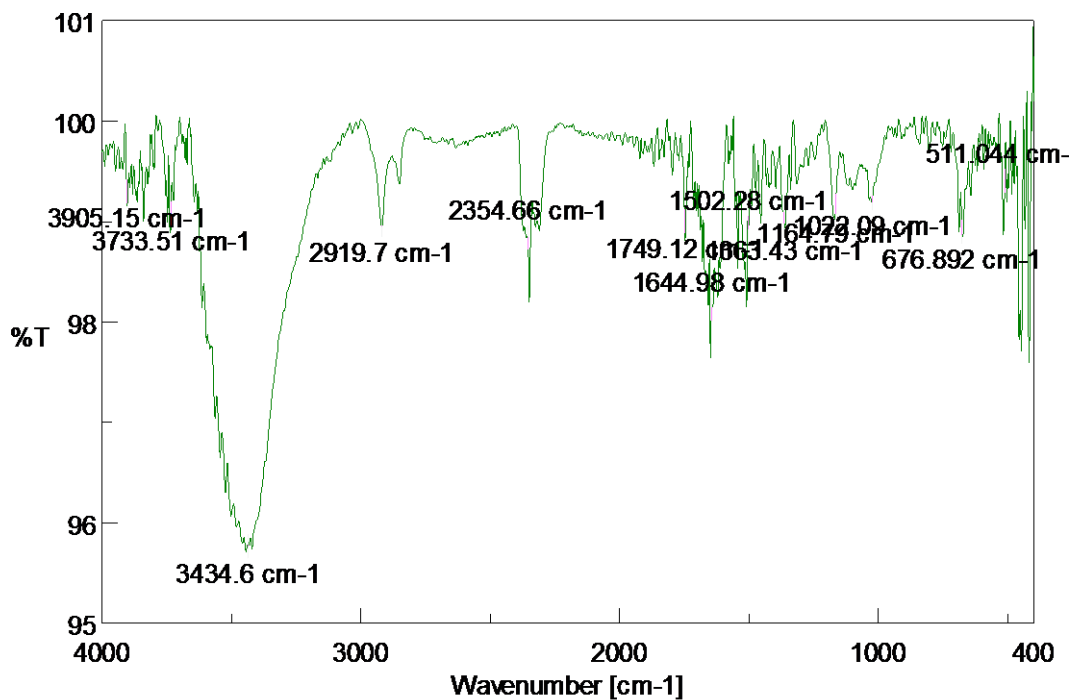
Εικόνα 20: Φάσμα FT-IR νανοσωματιδίων αλγινικού 0.06%w/v με αναλογία χρυσίνης - αλγινικό 4:3

Ακολουθεί το φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού 0.04%w/v με αναλογία χρυσίνη-αλγινικό 4:3(Εικόνα 24).



Εικόνα 21: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού 0.04%w/v με αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%/v με αναλογία χρυσίνη-αλγινικό 4:3(Εικόνα 25).



Εικόνα 22: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού 0.02%w/v με αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3

Συγκρίνοντας τα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων με το φάσμα FT-IR του αλγινικού νατρίου προκύπτει ο παρακάτω πίνακας με τις μετατοπίσεις στις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης.

Πίνακας 14: Μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης του αλγινικού νατρίου στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων

Χαρακτηριστική ομάδα αλγινικού	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)			
	Alg	Chr-Alg(0.06%) 4:3	Chr-Alg(0.04%) 4:3	Chr-Alg(0.02%) 4:3
Δόνηση τάσης O-H	3403	3434.6	3430.74	3434.6
Ασύμμετρη δόνηση τάσης C-O-H	1619.19	1652.7	1648.84	1644.96
Δόνηση τάσης C-O	1120.44	1164.79	1164.79	1164.79

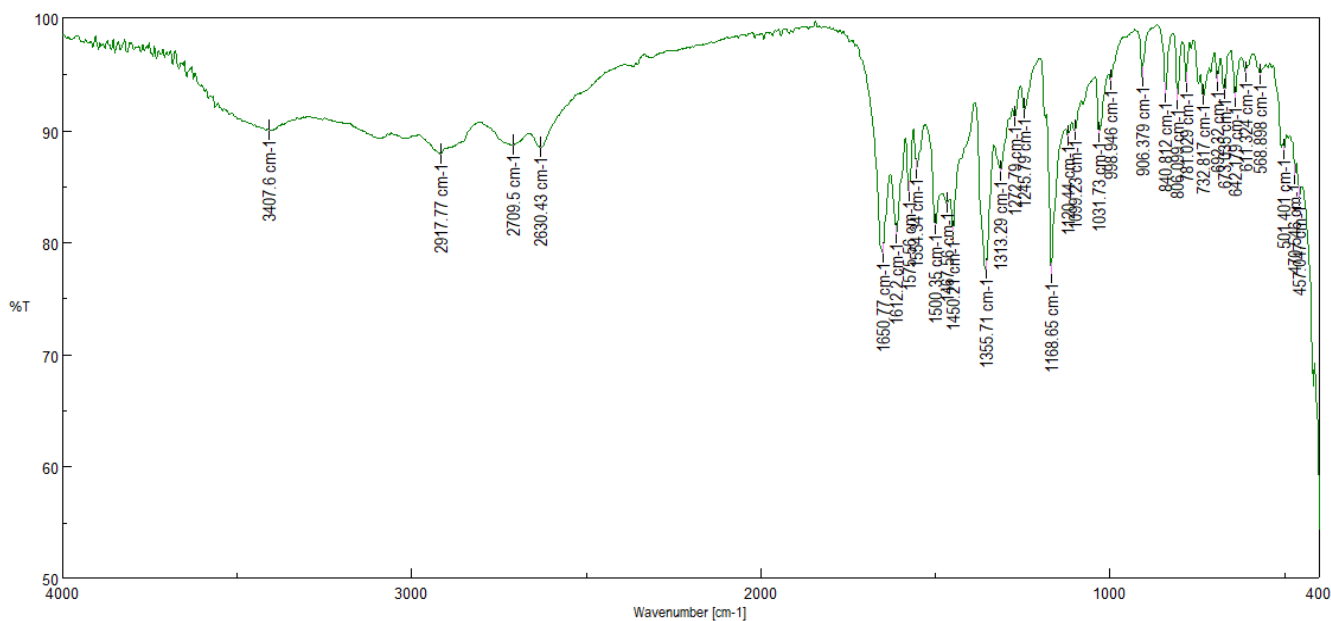
Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, στο φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης παρατηρούνται μετατοπισμένες οι κορυφές που εμφανίζονται στα 3403cm⁻¹, 1619.19cm⁻¹ και 1120.44cm⁻¹ στο φάσμα του αλγινικού. Η μεγαλύτερη μετατόπιση στο φάσμα των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης παρατηρείται στην κορυφή που εμφανίζεται στα 1120.44 cm⁻¹ του φάσματος αλγινικού και η οποία αποδίδεται στην δόνηση τάσης C-O. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι ενδεικτικές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αλγινικού και χρυσίνης.

Πίνακας 15: Μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών απορρόφησης της χρυσίνης στα φάσματα FT-IR των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων

Χαρακτηριστική ομάδα χρυσίνης	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)			
	Chr	Chr-Alg(0.06%) 4:3	Chr-Alg(0.04%) 4:3	Chr-Alg(0.02%) 4:3
Δόνηση τάσης C-H	2919.7	2923.56	2917.77	2919.7
Δόνηση τάσης C=O	1654.62	1652.7	1648.84	1644.98

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, στο φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση της κορυφής δόνησης τάσης C-H για την περίπτωση του αλγινικού 0.006 %w/v, ενώ μεγαλύτερες μετατοπίσεις παρατηρούνται σε μετατοπισμένες οι κορυφές που εμφανίζονται στα 2628.5 cm⁻¹ και 2919.7cm⁻¹ στο φάσμα του χρυσίνης. Η μεγαλύτερη μετατόπιση στο φάσμα των νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης παρατηρείται στην κορυφή που εμφανίζεται στα 2628.5 cm⁻¹ του φάσματος χρυσίνης και την περίπτωση της δόνησης τάσης C=O, σε όλες τις συγκεντρώσεις αλγινικού.

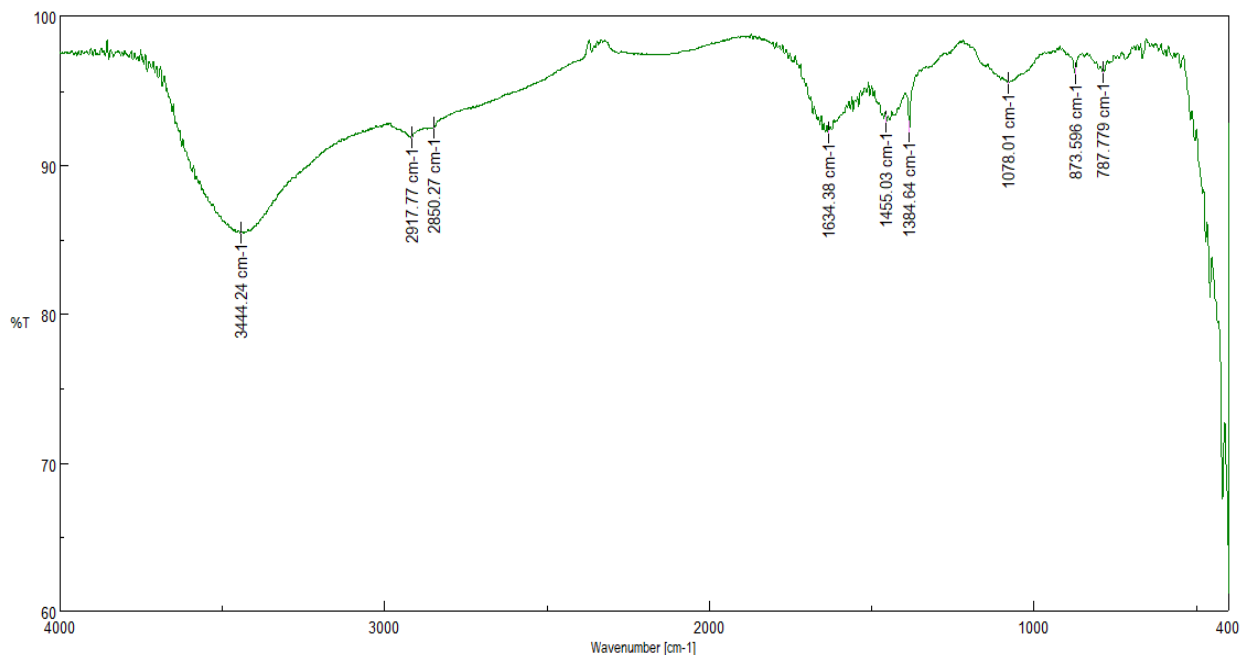
Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR του φυσικού μίγματος αλγινικού-χρυσίνης με αναλογία 4:3(Εικόνα 26).



Εικόνα 23: Φάσμα FT-IR του φυσικού μίγματος αλγινικού -χρυσίνης με αναλογία 2:1

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω φάσμα FT-IR του φυσικού μίγματος χρυσίνης-αλγινικού σε αναλογία 4:3 είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές της χρυσίνης που εμφανίζονται στα 2917.77cm^{-1} , 2709.5cm^{-1} και 2630.43cm^{-1} . Ωστόσο, οι κορυφές της χρυσίνης στο φάσμα του φυσικού μίγματος εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με το φάσμα των νανοσωματιδίων αλγινικού – χρυσίνης, γεγονός που υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλεισμό της χρυσίνης στα νανοσωματίδια αλγινικού.

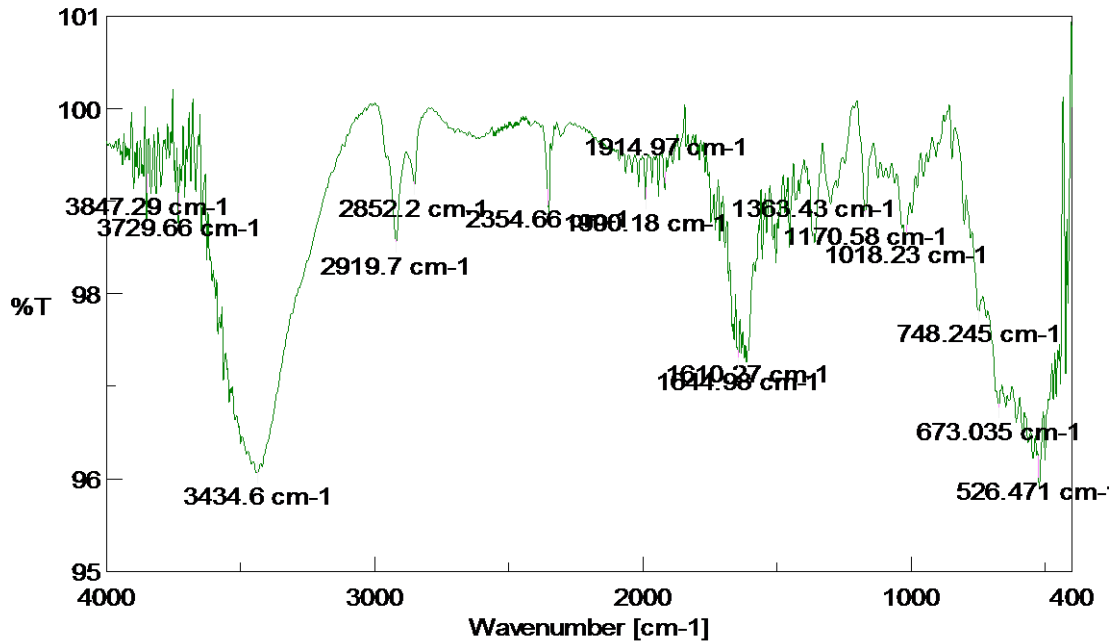
Ακολουθεί το φάσμα FT-IR της χιτοζάνης(Εικόνα 27).



Εικόνα 24: Φάσμα FT-IR της χιτοζάνης

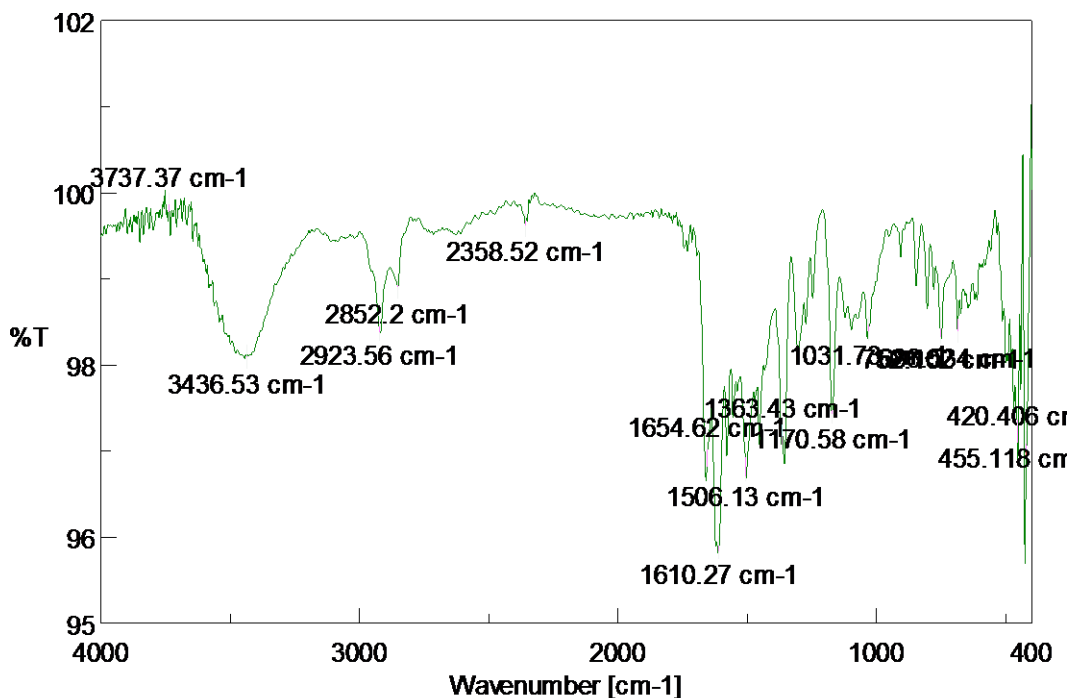
Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος χιτοζάνης εμφανίζονται στα 3444.24 cm^{-1} και στα 2915.84 cm^{-1} που αποδίδονται σε O-H δόνηση τάσης και σε C-H δόνηση τάσης αντίστοιχα. Στα 1634.38 cm^{-1} η κορυφή αποδίδεται σε δόνηση τάσης του καρβονυλίου C=O και στα 1455.03 cm^{-1} η κορυφή οφείλεται σε δόνηση κάμψης μεθυλίου. Τέλος, η κορυφή στα 1384.64 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση τάσης μεθυλενίου ενώ η κορυφή που εμφανίζεται στα 1078.01 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης COH, COC και CH₂OH.

Ακολουθεί το φάσμα αλγινικού-χιτοζάνης με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3(Εικόνα 28).



Εικόνα 25: Φάσμα FT-IR του συστήματος αλγινικού-χιτοζάνης με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3.

Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα αλγινικού-χιτοζάνης που προέκυψε με την μέθοδο B (Εικόνα 29)



Εικόνα 26: Φάσμα FT-IR του συστήματος αλγινικού-χιτοζάνης με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3.

Στα φάσματα FT-IR του συστήματος αλγινικού-χιτοζάνης παρατηρούνται κορυφές που αποδίδονται τόσο στο αλγινικό όσο και στη χιτοζάνη, ωστόσο το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές της χρυσίνης, υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλεισμό της με το διπλό σύστημα αλγινικού-χιτοζάνης.

4.1.5 Εφαρμογή μεθόδου DPPH για μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης της χρυσίνης

Ακολούθησε αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης της χρυσίνης μέσω μεθόδου DPPH. Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν ότι η χρυσίνη δεν δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα του DPPH το οποίο μπορεί να οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων όπως η σταθερότητα της ρίζας της χρυσίνης που προκύπτει από την μεταφορά, η ταχύτητα μεταφοράς των ατόμων υδρογόνου και ο αριθμός των ατόμων υδρογόνου που παρέχει η φαινολική ένωση.[46]

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης σε συγκεντρώσεις αλγινικού 0.06%w/v, 0.04%w/v και 0.02%w/v και αναλογίες χρυσίνης-αλγινικού 1:1, 1:2 και 4:3. Αξίζει να τονιστεί ότι πραγματοποιήθηκε εις βάθος διερεύνηση προκειμένου να προκύψουν τα νανοσωματίδια αλγινικού με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους μέσω διαφόρων τεχνικών (DLS, FT-IR).

Στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους μέσω διαφόρων τεχνικών.

Σύμφωνα με την μέθοδο δυναμικής σκέδασης ηλεκτρονίων (DLS) προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- ❖ Οι καλύτερες τιμές μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού προέκυψαν από την αναλογία χρυσίνης – αλγινικού 4:3. Ειδικότερα, η μέση υδροδυναμική διάμετρος (SIZE) κυμαίνεται από 191 nm έως 230 nm, η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) από 0.3-0.38 ενώ το ζ-δυναμικό έχει τιμές -32mV έως -43mV.
- ❖ Τα νανοσωματίδια με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v εμφάνισαν τη μικρότερη τιμή μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, η οποία προσεγγίζει τα 191 nm, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αλγινικό είναι εντός ορίων της νανοκλίμακας και επομένως αποτελεί ιδανικό φορέα για ποικίλες φαρμακευτικές εφαρμογές.
- ❖ Τα νανοσωματίδια αλγινικού-χρυσίνης με αναλογία 4:3 εμφανίζουν τιμές ζ-δυναμικού που κυμαίνονται από -32mV έως -43mV, υποδεικνύοντας υψηλή σταθερότητα και κατ'επέκταση μειωμένη τάση συσσωμάτωσης.
- ❖ Η μελέτη σταθερότητας 3 μηνών έδειξε ότι το μέγεθος και το φορτίο των σωματιδίων που διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

Ακόμη, η απόδοση διεργασίας κυμαίνεται από 25-63%, ανάλογα με την συγκέντρωση του αλγινικού και την αναλογία-χρυσίνης αλγινικού. Όσον αφορά στην απόδοση εγκλεισμού, ο έμμεσος τρόπος υπολογισμού είχε κάποια σφάλματα ίσως λόγω χαμηλής διαλυτότητας της χρυσίνης. Γι'αυτό εφαρμόστηκε ο άμεσος τρόπος υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού στο δείγμα που είχε τα καλύτερα αποτελέσματα και βρέθηκε απόδοση 64%.

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια αλγινικού-χιτοζάνης μέσω δύο μεθόδων. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο δυναμικής σκέδασης ηλεκτρονίων (DLS).

- ❖ Γενικότερα, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης-αλγινικού εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται μόνο από αλγινικό. Επομένως,

η χιτοζάνη συμβάλλει στην επίτευξη μικρότερου μεγέθους νανοσωματιδίων και κατ'επέκταση αυξημένης επιφάνειας.

❖ Τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται από την επικάλυψη του αλγινικού με χιτοζάνη, εμφανίζουν τιμή μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου από 131 nm έως 240 nm , ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς κυμαίνεται από 0.39-0.54.

❖ Τα νανοσωματίδια αλγινικού με επικάλυψη χιτοζάνης εμφανίζουν ισχυρά θετικό ζ-δυναμικό, όπως αναμένεται βιβλιογραφικά καθώς η χιτοζάνη η οποία βρίσκεται εξωτερικά συνιστά έναν κατιονικό πολυσακχαρίτη. Επομένως η θετική τιμή του ζ-δυναμικού που κυμαίνεται από 21mV έως 33mV υποδηλώνει την επιτυχή επικάλυψη των νανοσωματιδίων τα οποία είναι ιδιαιτέρως σταθερά.

Τέλος, η δομή των νανοσωματιδίων μελετήθηκε μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας FT-IR.

❖ Από τις μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών στο φάσμα FT-IR, επιβεβαιώνεται η επιτυχής δημιουργία νανοσωματιδίων αλγινικού. Επίσης, οι χαρακτηριστικές κορυφές της χρυσίνης στο φάσμα του φυσικού μίγματος εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με το φάσμα των νανοσωματιδίων, γεγονός που σηματοδοτεί τον επιτυχή εγκλεισμό του φλαβονοειδούς χρυσίνη στα νανοσωματίδια αλγινικού.

❖ Στο φάσμα των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν μέσω επικάλυψης του αλγινικού με χιτοζάνη, δεν παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές της χρυσίνης. Αυτό υποδηλώνει ότι η χρυσίνη έχει επικαλυφθεί επιτυχώς με το διπλό σύστημα αλγινικού-χιτοζάνης.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μελλοντικοί στόχοι της παρούσας εργασίας αποτελούν:

❖ Η εξέταση όλων των πιθανών παραμέτρων π.χ ταχύτητα ανάδευσης που επιδρούν στην διεργασία εγκλεισμού με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης εγκλεισμού και διεργασίας καθώς και ο καθορισμός του προφίλ απελευθέρωσης των εγκλεισμένων νανοσωματιδίων σε διάφορες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Αξίζει να αναφερθεί ότι έγινε προσπάθεια μελέτης του ρυθμού απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.06%w/v και αναλογίας χρυσίνης-αλγινικού 4:3.

❖ Η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων αλγινικού που έχουν επικαλυφθεί με χιτοζάνη. Πρότερο σκοπό συνιστά η απομόνωση των νανοσωματιδίων και έπειτα η αξιολόγηση της μορφολογίας τους μέσω της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM).

- ❖ Η αξιολόγηση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο των τριών μηνών προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία αλλοίωσής τους κατά την μεταφορά και την αποθήκευση.
- ❖ Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης της χρυσίνης με περισσότερες *in vitro* μεθόδους, π.χ. AAPH.
- ❖ Η *in vitro* αξιολόγηση των νανοσωματιδίων ως προς την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και κυτταροτοξική δράση τους.
- ❖ Η χρήση αναλυτικών μεθόδων όπως HPLC για τον ακριβέστερο προσδιορισμό της χρυσίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
- [2] George, A., Shah, P. A., & Shrivastav, P. S. (2019). Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *International journal of pharmaceutics*, 561, 244-264.
- [3] Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J., & Sagis, L. M. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 209, 163-171.
- [4] Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- [5] Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187-196.
- [6] Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, Volume 2013, Article ID 162750, 16 pages
- [7] Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, 84, 206-239.
- [8] Sulaiman, G. M., Al-Amiery, A. A., & Bagnati, R. (2014). Theoretical, antioxidant and cytotoxic activities of caffeic acid phenethyl ester and chrysin. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(1), 101-105.
- [9] Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

- [10] Elgadir, M. A., Uddin, M. S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A. J. K., & Sarker, M. Z. I. (2015). Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), 619-629.
- [11] Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., & Wasan, E. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 9(4), 53.
- [12] Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 6, 765.
- [13] Tavakoli, F., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Jabbari, M., Behzadi, R., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., & Zarghami, N. (2018). Effects of nano-encapsulated curcumin-chrysin on telomerase, MMPs and TIMPs gene expression in mouse B16F10 melanoma tumour model. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 75-86.
- [14] Lopes, M., Abraham, B., Veiga, F., Seica, R., Cabral, L. M., Arnaud, P., ... & Ribeiro, A. J. (2017). Preparation methods and applications behind alginate-based particles. *Expert opinion on drug delivery*, 14(6), 769-782.
- [15] Sosnik, A. (2014). Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. *ISRN pharmaceutics*, 2014.
- [16] Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... & Elmore, S. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food chemistry*, 264, 471-475.
- [17] Chen, X., Deng, Z., Zhang, C., Zheng, S., Pan, Y., Wang, H., & Li, H. (2018). Is antioxidant activity of flavonoids mainly through the hydrogen-atom transfer mechanism?. *Food Research International*.
- [18] Jabeen, H., Saleemi, S., Razzaq, H., Yaqub, A., Shakoore, S., & Qureshi, R. (2018). Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 268-275.
- [19] Hamlaoui, I., Bencheraiet, R., Bensegueni, R., & Bencharif, M. (2018). Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1156, 385-389.

- [20] Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of functional foods*, 18, 782-796.
- [21] Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, Academic press (Vol. 2), 1-10.
- [22] Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D., & McNeil, S. E. (2017). Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(24), 5779-5787.
- [23] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
- [24] Varenne, F., Rustique, E., Botton, J., Coty, J. B., Lanusse, G., Lahcen, M. A., ... & Negri, L. (2017). Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. *International journal of pharmaceutics*, 528(1-2), 299-311.
- [25] Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168-177.
- [26] Xu, R. (2002). Electrophoretic light scattering: Zeta potential measurement. *Particle characterization: Light scattering methods*, volume 13, 289-343.
- [27] Draget, K. I., & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 251-256.
- [28] Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource technology*, 184, 355-362.
- [29] Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., & Wang, F. (2018). Applications of alginate as a functional food ingredient. In *Biopolymers for Food Design*, Academic Press (pp. 409-429).
- [30] Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 83-99.
- [31] Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, 59, 46-58.

[32] Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., & Wasan, E. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 9(4), 53.

[33] Patil, J. S., Kamalapur, M. V., Marapur, S. C., & Kadam, D. V. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 241-248.

[34] Motwani, S. K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F. J., & Khar, R. K. (2008). Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 513-525.

[35] Sundararajan, M., Thomas, P. A., Venkadeswaran, K., Jeganathan, K., & Geraldine, P. (2017). Synthesis and characterization of chrysin-loaded β -cyclodextrin-based nanosponges to enhance in-vitro solubility, photostability, drug release, antioxidant effects and antitumorous efficacy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(12), 8742-8751.

[36] Nosrati, H., Rakhshbahar, A., Salehiabar, M., Afroogh, S., Manjili, H. K., Danafar, H., & Davaran, S. (2018). Bovine serum albumin: an efficient biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin. *Journal of Molecular Liquids*, 271, 639-646.

[37] Anari, E., Akbarzadeh, A., & Zarghami, N. (2016). Chrysin-loaded PLGA-PEG nanoparticles designed for enhanced effect on the breast cancer cell line. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(6), 1410-1416.

[38] Zheng, H., Li, S., Pu, Y., Lai, Y., He, B., & Gu, Z. (2014). Nanoparticles generated by PEG-Chrysin conjugates for efficient anticancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 454-460.

[39] Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S., & Khuller, G. K. (2006). Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Indian journal of chest diseases and allied sciences*, 48(3), 171.

[40] Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., & Nimmannit, U. (2008). Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 209-214.

[41] Sundaraganesan, N., Mariappan, G., & Manoharan, S. (2012). Molecular structure and vibrational spectroscopic studies of chrysin using HF and density functional theory. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 87, 67-76.

[42] Leal, D., Matsuhiro, B., Rossi, M., & Caruso, F. (2008). FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate research*, 343(2), 308-316.

[43] Aishwarya, V., & Sumathi, T. Enhanced. (2016). Blood–Brain Barrier Transmigration Using the Novel Chrysin Embedded Solid Lipid Nanoformulation: A Salient Approach on Physico-Chemical Characterization, Pharmacokinetics and Biodistribution Studies, *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(12): 1574-1582

[44] Seetharaman, P., Gnanasekar, S., Chandrasekaran, R., Chandrakasan, G., Kadarkarai, M., & Sivaperumal, S. (2017). Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5, 7-dihydroxy flavone)-producing endophytic fungi from *Passiflora incarnata* L. leaves. *Annals of microbiology*, 67(4), 321-331.

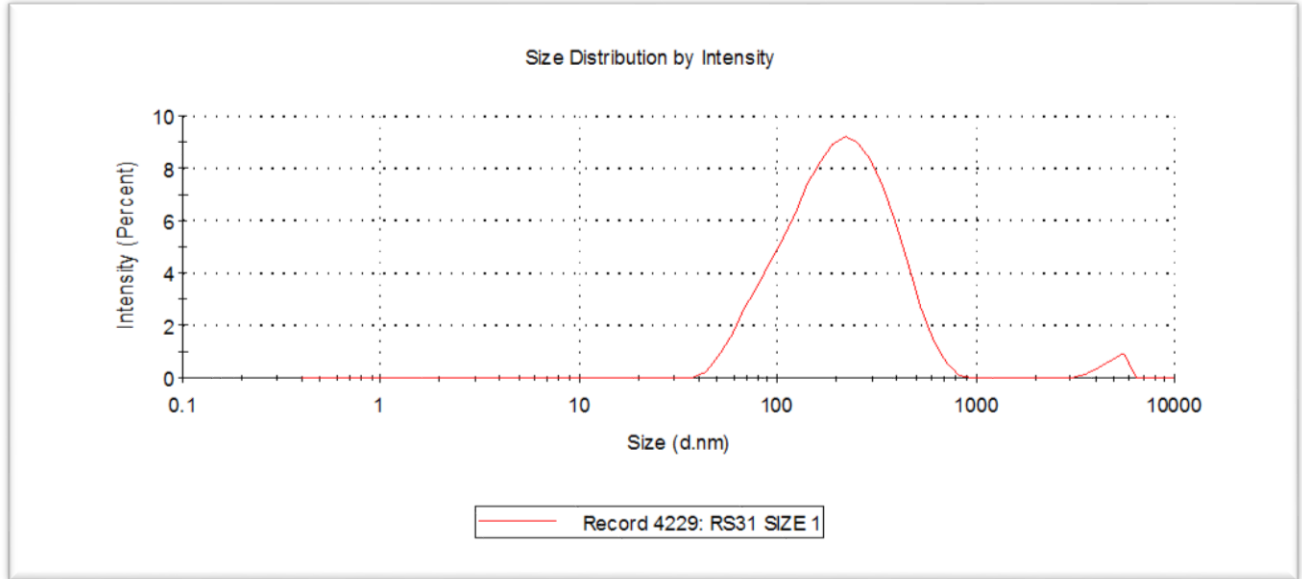
[45] Meena, K., Muthu, K., Meenatchi, V., Rajasekar, M., Bhagavannarayana, G., & Meenakshisundaram, S. P. (2014). *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124, 663-669.

[46] Kedare B.S,Singh P.R (2001) *J.Food Sci Technol*,48(4) 421-422

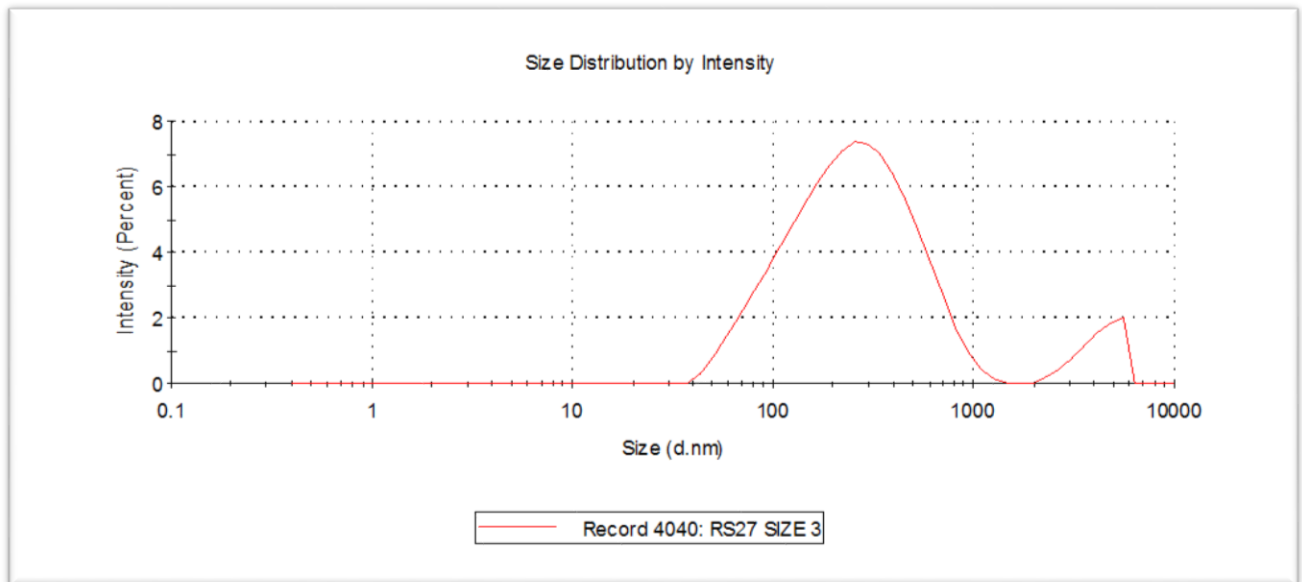
[47] Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.

[48] Silva, N. C., Silva, S., Sarmiento, B., & Pintado, M. (2015). Chitosan nanoparticles for daptomycin delivery in ocular treatment of bacterial endophthalmitis. *Drug delivery*, 22(7), 885-893.

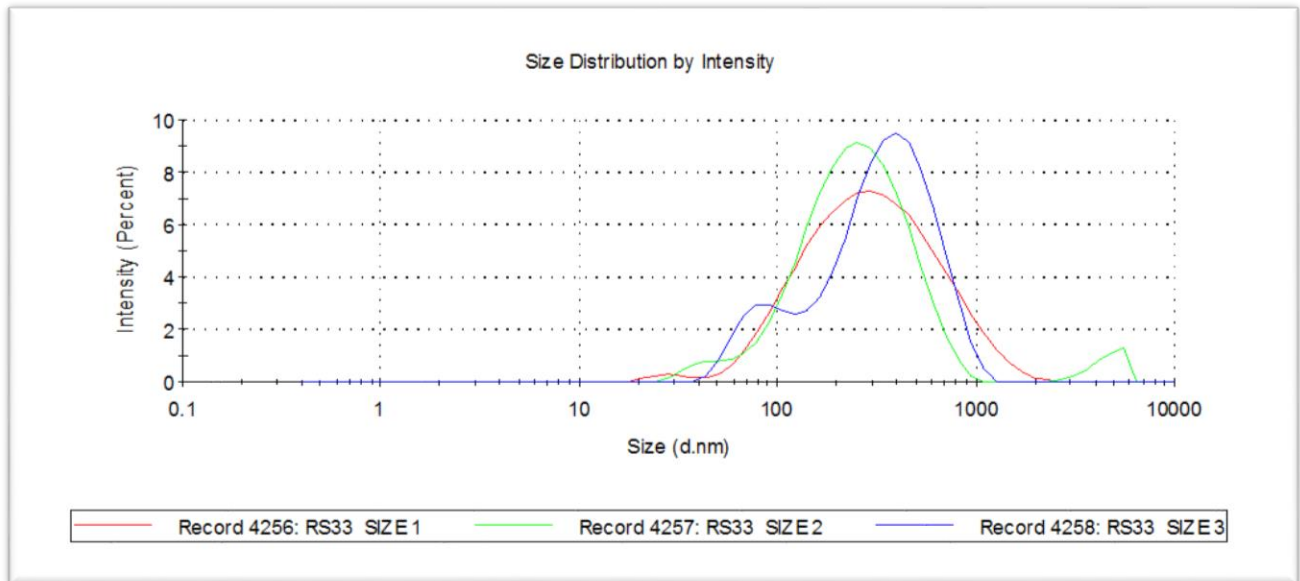
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



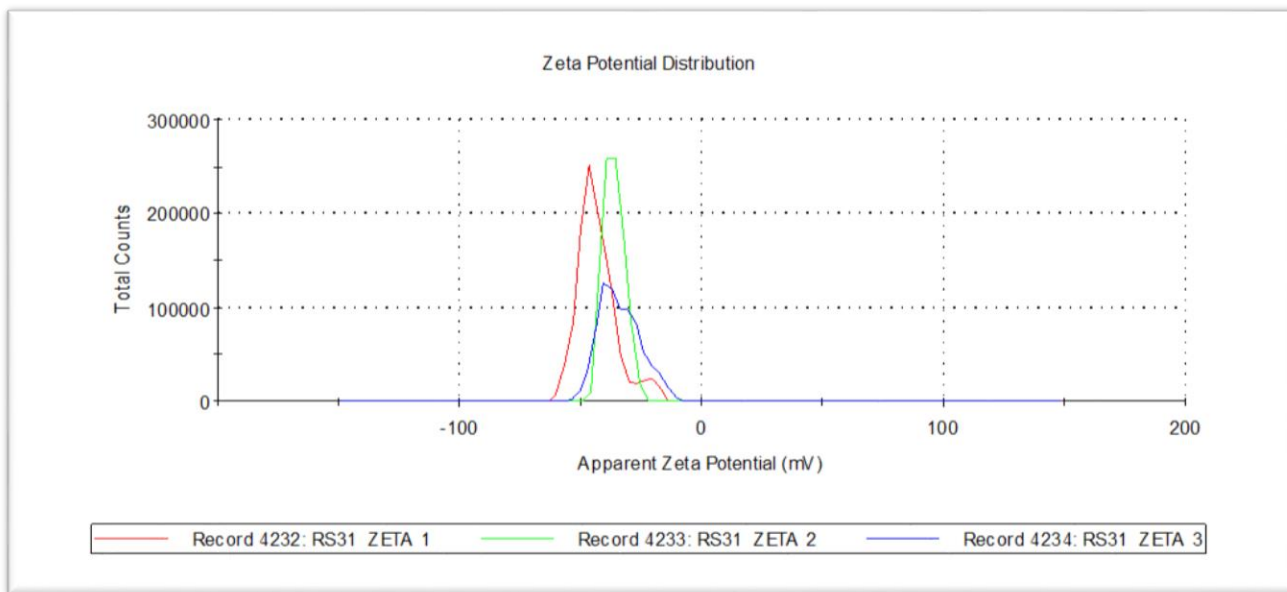
Εικόνα 30: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3



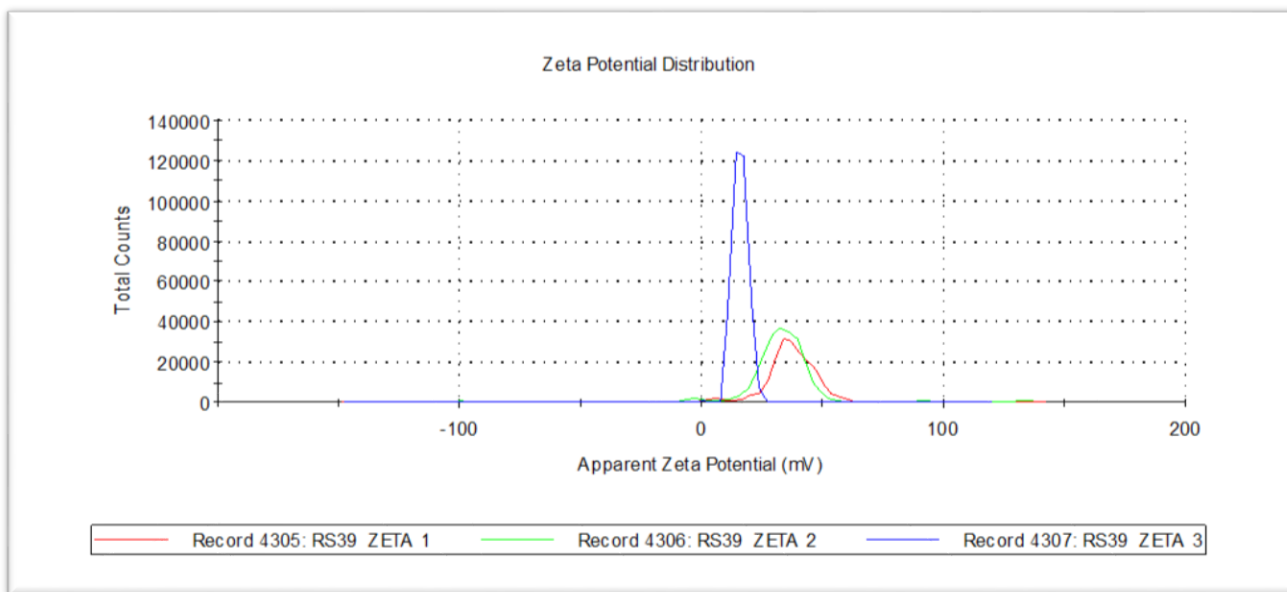
Εικόνα 41: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.04%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3



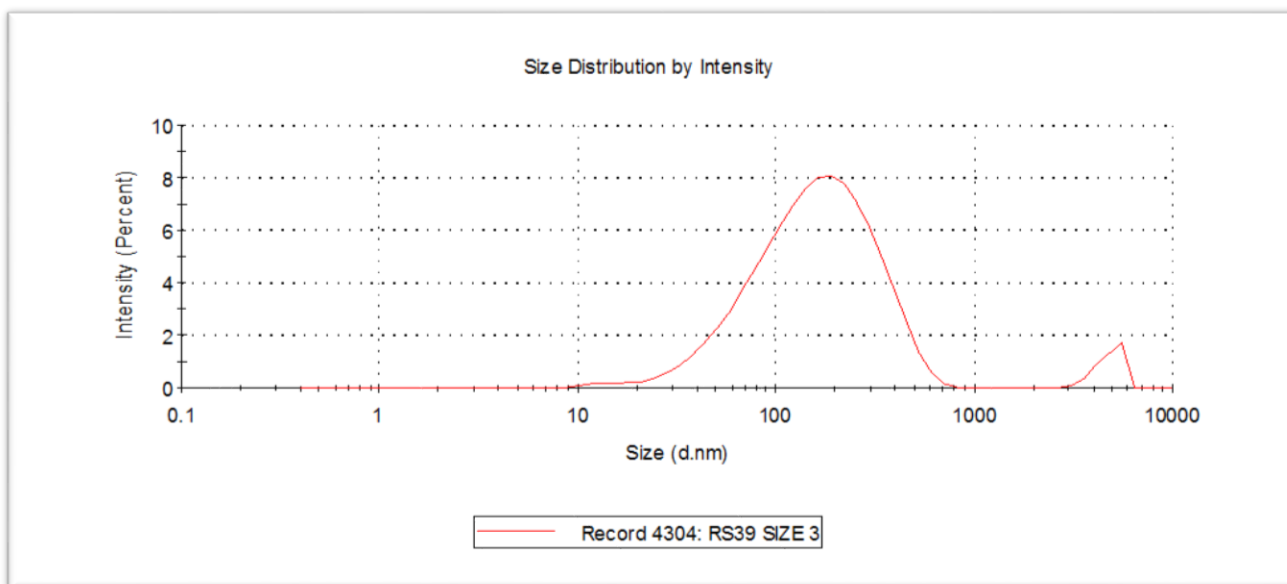
Εικόνα 52: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3



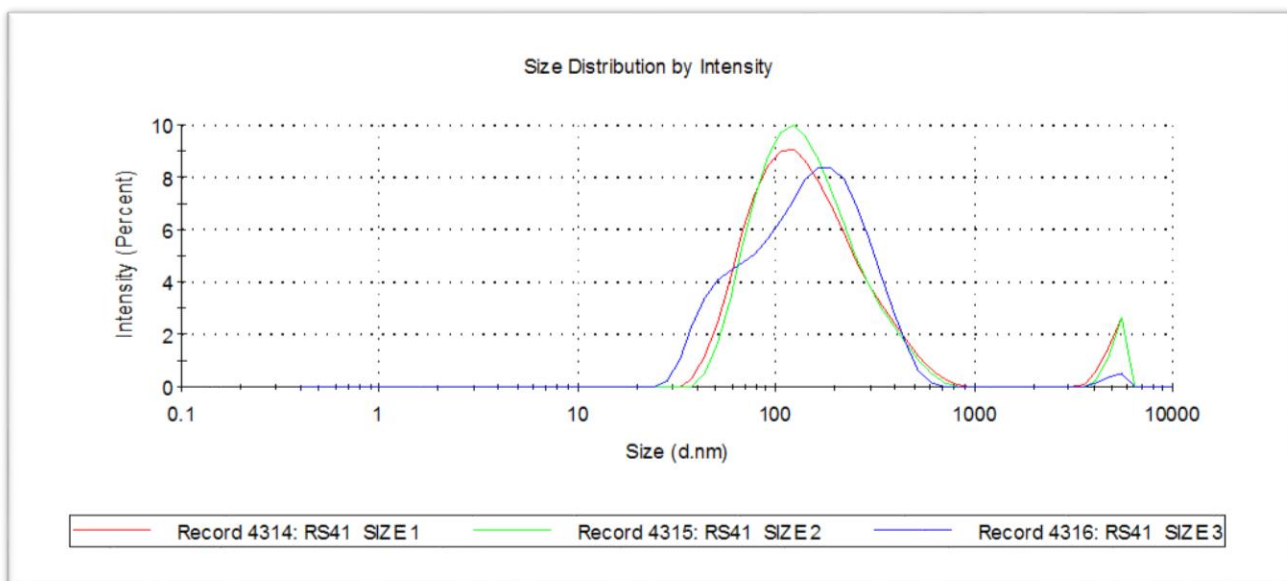
Εικόνα 63: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3



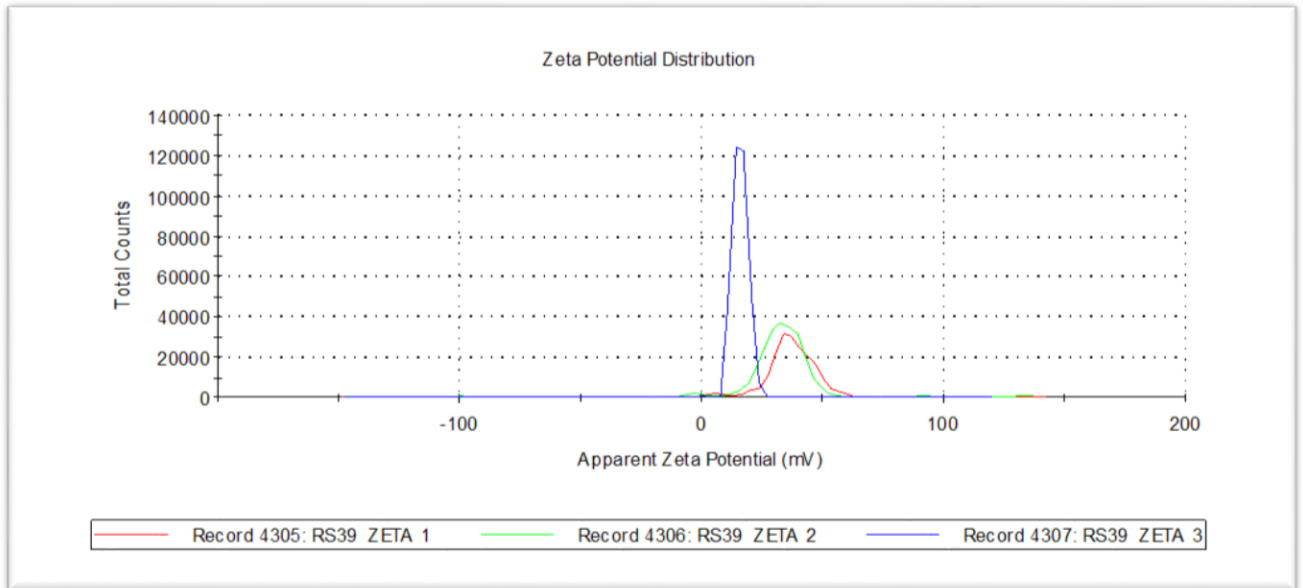
Εικόνα 74: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3



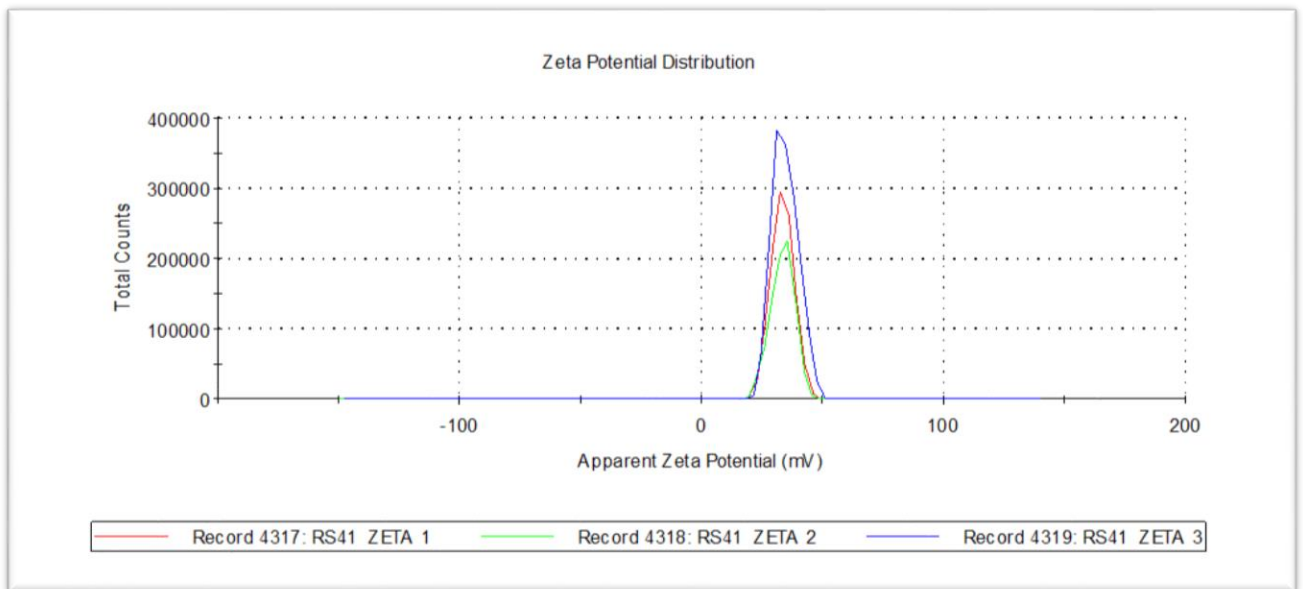
Εικόνα 85: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο



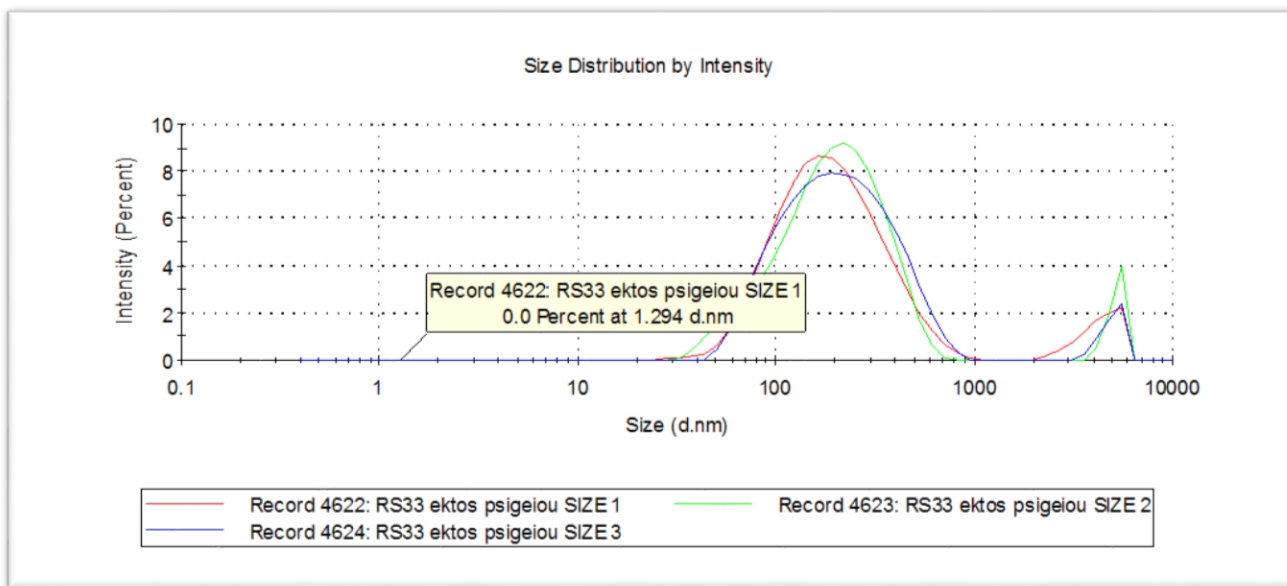
Εικόνα 96: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο



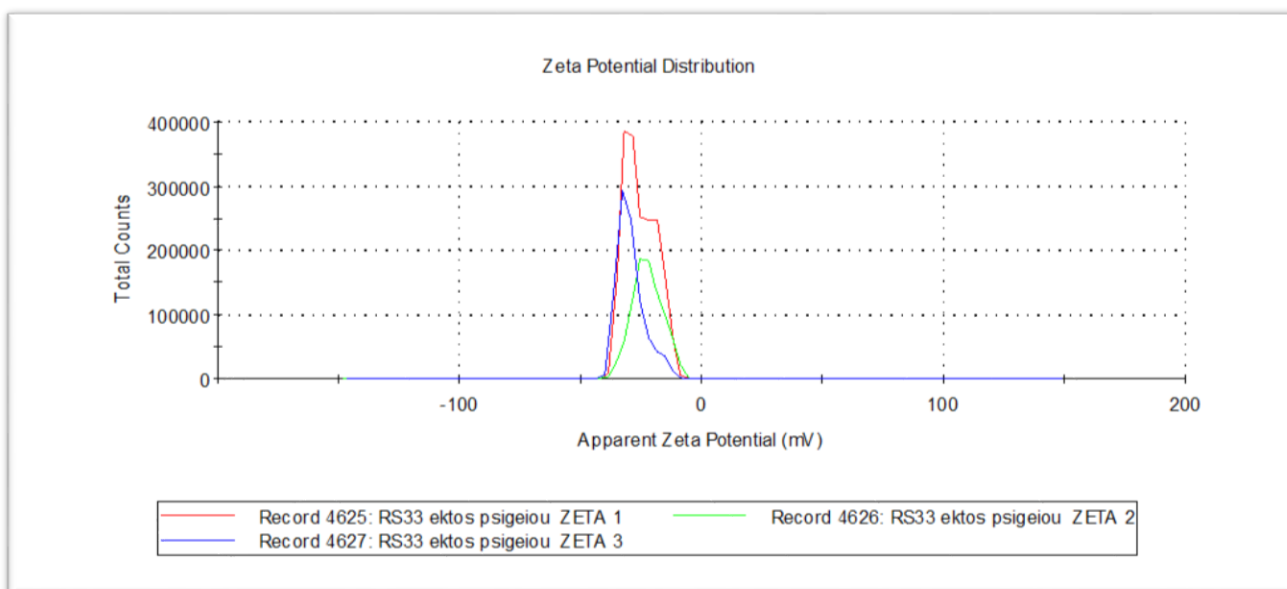
Εικόνα 107: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο



Εικόνα 118: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο



Εικόνα 129: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 έπειτα από διάστημα τριών μηνών



Εικόνα 40: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3 μετά από διάστημα τριών μηνών

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:Χημική δομή συμπλέγματος α-l γουλουρονικού οξέος(G)[3]	15
Εικόνα 2:Χημική δομή συμπλέγματος β-d μαννουρονικού οξέος(M)[3]	15
Εικόνα 3:Χημική δομή αλγινικού οξέος[3]	15
Εικόνα 4:Σχηματική απεικόνιση νανο-συσσωματώματος[3]	17
Εικόνα 5:Σχηματική απεικόνιση νανοκάψουλας[3]Μέθοδος γαλακτωματοποίησης αλγινικού σε έλαιο	17
Εικόνα6:Σχηματική απεικόνιση νανοσφαίρας	18
Εικόνα 7:Απεικόνιση μορίου χιτοζάνης	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 8:Χημική δομή φλαβονοειδούς	26
Εικόνα 9:Χημική δομή χρυσίνης	28
Εικόνα 10:Σχηματική απεικόνιση τρόπου υπολογισμού ζ-δυναμικού[23]	33
Εικόνα 11:Σχηματική απεικόνιση οργάνων DLS[23]	34
Εικόνα 12:Πειραματική διαδικασία παρασκευής τυφλών νανοσωματιδίων αλγινικού	38
Εικόνα 13: Πειραματική διαδικασία παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού-χρυσίνης	39
Εικόνα 14:Πειραματική διαδικασία παρασκευής τυφλών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την πρώτη μέθοδο	40
Εικόνα 15:Πειραματική διαδικασία παρασκευής νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την πρώτη μέθοδο	41
Εικόνα 16:Πειραματική διαδικασία παρασκευής τυφλών νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης με την δεύτερη μέθοδο	42
Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR του αλγινικού νατρίου	61

Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR χρυσίνης.....	62
Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού(Blank).....	63
Εικόνα 20: Φάσμα FT-IR νανοσωματιδίων αλγινικού 0.06%w/v με αναλογία χρυσίνης - αλγινικό 4:3	64
Εικόνα 21: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού 0.04%w/v με αναλογία χρυσίνης- αλγινικού 4:3	65
Εικόνα 22: Φάσμα FT-IR των νανοσωματιδίων αλγινικού 0.02%w/v με αναλογία χρυσίνης- αλγινικού 4:3	66
Εικόνα 23: Φάσμα FT-IR του φυσικού μίγματος αλγινικού -χρυσίνης με αναλογία 2:1	68
Εικόνα 24: Φάσμα FT-IR της χιτοζάνης.....	69
Εικόνα 25: Φάσμα FT-IR του συστήματος αλγινικού-χιτοζάνης με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3.....	70
Εικόνα 26: Φάσμα FT-IR του συστήματος αλγινικού-χιτοζάνης με συγκέντρωση αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικού 4:3.....	71
Εικόνα 27 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 28 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.04%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 29 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3	80
Εικόνα 30 Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3	81
Εικόνα 31 Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3	81
Εικόνα 32 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού- χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο	82

Εικόνα 33 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο	82
Εικόνα 34 Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο.....	83
Εικόνα 35 Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο.....	83
Εικόνα 36 Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 έπειτα από διάστημα τριών μηνών	84
Εικόνα 37 Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3 μετά από διάστημα τριών μηνών.....	84
Εικόνα 138: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων αλγινικού-χιτοζάνης συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 που προέκυψαν από την πρώτη μέθοδο.....	78
Εικόνα 149: Παράρτημα Εικόνων: Κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων αλγινικού συγκέντρωσης 0.02%w/v, αναλογίας χρυσίνης-αλγινικό 4:3 έπειτα από διάστημα τριών μηνών.....	78
Εικόνα 40: Παράρτημα Εικόνων: ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.02%w/v και αναλογία χρυσίνης-αλγινικό 4:3 μετά από διάστημα τριών μηνών.....	78

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Απόδοση διεργασίας νανοσωματιδίων συγκέντρωσης αλγινικού 0.06%w/v συναρτήσει των τριών αναλογιών.....	47
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς χρυσίνης($\lambda=264\text{nm}$)	49
Διάγραμμα 3: Απόδοση διεργασίας νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 0.06%w/v συναρτήσει των τριών αναλογιών χρυσίνης-αλγινικού	51