



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

Μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού του φυσικού αντιοξειδωτικού τυροσόλη σε βιοσυμβατούς νανοφορείς με εφαρμογή Πειραματικού Σχεδιασμού

Μεταπτυχιακή Εργασία

Ευαγγελία Κωνσταντέλη
Πτυχιούχος Χημικός Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Αν. Δέτση

Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

Μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού του φυσικού αντιοξειδωτικού τυροσόλη σε βιοσυμβατούς νανοφορείς με εφαρμογή Πειραματικού Σχεδιασμού

Μεταπτυχιακή Εργασία

Ευαγγελία Κωνσταντέλη

Πτυχιούχος Χημικός Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αναστασία Δέτση, Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π
Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.
Απόστολος Κυρίτσης, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών (ΕΜΠ) υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας, κας Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019, στα πλαίσια του ΔΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών» .

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγησή της και τον χρόνο που αφιέρωσε. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Υπ. Διδάκτορα Νεφέλη Ποντίλλο για τη χρήσιμη βοήθεια και συνεργασία που αναπτύχθηκε. Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη που πάντα βοηθά και μας φροντίζει. Θέλω, ακόμη, να ευχαριστήσω όλο το εργαστήριο για τη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τα δικά μου άτομα για τη στήριξη και την υπομονή τους, τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας όσο και στο σύνολο του μεταπτυχιακού.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	i
Περιεχόμενα	ii
Κατάλογος Σχημάτων	iv
Κατάλογος Εικόνων	iv
Κατάλογος Διαγραμμάτων	v
Κατάλογος Πινάκων	vii
Συντομογραφίες	ix
Περίληψη	1
Abstract	2
1. Εισαγωγή	3
1.1. Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (Drug delivery systems)	3
1.1.1. Ρόλος και χρησιμότητα	3
1.1.2. Νανοσωματίδια ως φορείς φαρμάκων	3
1.1.3. Χαρακτηριστικά νανοφορέων	5
1.1.4. Εγκλεισμός δραστικής ουσίας και απελευθέρωσή της	6
1.2. Δραστική ουσία και νανοφορείς της παρούσας έρευνας	8
1.2.1. Τυροσόλη (TYR)	8
1.2.2. β-Κυκλοδεξτρίνη (βCD)	10
1.2.3. Χιτοζάνη (CS)	14
1.3. Μέθοδοι χαρακτηρισμού και ανάλυσης των συμπλόκων	18
1.3.1. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Νανοσωματιδίων	18
1.3.2. Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης	20
1.3.3. Μέθοδοι εκτίμησης της δομής και της στοιχειομετρίας	21
1.4. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)	24
1.4.1. Σκοπός και χρήσεις	24
1.4.2. Πειραματική Διεργασία	24
1.4.3. Είδη Πειραματικού Σχεδιασμού	25
2. Πειραματικό Μέρος	27
2.1. Αντιδραστήρια	27
2.2. Οργανολογία	27
2.3. Σύμπλοκα εγκλεισμού τυροσόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη (TYR-βCD)	29
2.3.1. Παρασκευή των Συμπλόκων	29
2.3.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-βCD	31
2.4. Εγκλεισμός της τυροσόλης στη χιτοζάνη (TYR-CS)	35
2.4.1. Παρασκευή των Νανοσωματιδίων	35
2.4.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-CS	36
2.5. Εγκλεισμός της τυροσόλης σε συνδυασμό φορέων (TYR-βCD/CS)	38
2.5.1. Παρασκευή των Νανοσωματιδίων	38
2.5.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-βCD/CS	39
2.6. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)	41

2.6.1.	TYR-CS	41
2.6.2.	TYR-βCD/CS (coated)	41
3.	Αποτελέσματα: ανάλυση και συζήτηση	42
3.1.	Απόδοση Διεργασίας (Yield, α%)	42
3.2.	Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)	43
3.3.	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	45
3.4.	Προφίλ Απελευθέρωσης (Release Profile, RP)	52
3.5.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	54
3.6.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	56
3.7.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	57
3.8.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	60
3.9.	Θερμοβαρουμετρική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)	62
3.10.	Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)	64
3.10.1.	TYR-CS	64
3.10.2.	TYR-βCD/CS	72
4.	Συμπεράσματα – Μελλοντική Έρευνα	81
5.	Παράρτημα	85
5.1.	Καμπύλη αναφοράς καθαρής ένωσης TYR	85
5.2.	NMR	86
5.3.	FT-IR	87
5.4.	TGA	90
6.	Βιβλιογραφία	92

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Η δομή της TYR σε δισδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση.	8
Σχήμα 2: Σταθεροποίηση ρίζας στο φαινολικό δακτύλιο λόγω συντονισμού. ²³	9
Σχήμα 3: Μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η TYR. ²⁰	10
Σχήμα 4: Προσανατολισμός των H στο μόριο της CD. ²⁸	11
Σχήμα 5: 2D και 3D απεικόνιση του μορίου της βCD. ²⁹⁻³⁰	11
Σχήμα 6: Διαστάσεις φαινολικού δακτυλίου (nm). ³⁸	13
Σχήμα 7: Πιθανές στοιχειομετρίες εγκλεισμού σε CD. ³⁹	13
Σχήμα 8: Η δομή της CS. ⁴²	14
Σχήμα 9: Απακετυλίωση της χιτίνης για παραγωγή χιτοζάνης. ⁴²	15
Σχήμα 10: Δυνατοί τρόποι δημιουργίας νανοσωστημάτων CS. ⁴¹	16
Σχήμα 11: Μέθοδοι πηκτωμάτωσης: Α) ιοντική διασταύρωση, Β) ομοιοπολική διασταύρωση, C) σύμπλεγμα πολυηλεκτρολυτών, D) συσσωμάτωσης ⁴³	17
Σχήμα 12: Δομή DPPH.	20
Σχήμα 13: Αντίδραση δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH.	21
Σχήμα 14: Κατανομή των δεσμών σε 4 κύριες περιοχές στην ηλεκτρομαγνητική περιοχή του IR. ⁵⁶	22
Σχήμα 15: Box-Behnken σχεδιασμός 3 επιπέδων, 3 μεταβλητών. ⁶⁶	25
Σχήμα 16: Δομή του Trolox (αριστερά) και της Βιταμίνη E (δεξιά). ⁷⁰	33
Σχήμα 17: Σύνθεση χημικά τροποποιημένης CS με τη χρήση GL.	38
Σχήμα 18: Πιθανή διαμόρφωση του συμπλόκου εγκλεισμού TYR-βCD.	82

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Συγκριτική κλίμακα διαστάσεων. ⁴	3
Εικόνα 2: Διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων χρησιμοποιούμενοι ως φορείς φαρμάκων. ⁶	4
Εικόνα 3: Τελική τροποποίηση του νανοφορέα για φαρμακευτική χρήση (XPclad). ³	6
Εικόνα 4: Παρασκευή συμπλόκου ΚοE39.	30
Εικόνα 5: Παρασκευή συμπλόκου ΚοE6.	31
Εικόνα 6: Διάφορα «κέικ» CS NPs.	36
Εικόνα 7: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων CS (blank) σε μεγέθυνση 500× (αριστερά) και 3000× (δεξιά).	54
Εικόνα 8: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-CS σε μεγέθυνση 500× (αριστερά) και 3000× (δεξιά).	54
Εικόνα 9: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-βCD/CS σε μεγέθυνση 500× (αριστερά) και 3000× (δεξιά).	55
Εικόνα 10: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-CS (αριστερά) και TYR-βCD/CS (δεξιά) σε μεγέθυνση 5000×.	55

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Επίδραση επιφανειοδραστικού παράγοντα. DLS μέτρησης μεγέθους νανοσωματιδίων με (κόκκινο) και χωρίς TWEEN (πράσινο).	46
Διάγραμμα 2: Επίδραση TPP και TYR ως παράγοντες διασταύρωσης. Σύγκριση δειγμάτων με προσθήκη TPP (κόκκινο), με προσθήκη TYR αντί TPP (μπλε) και χωρίς προσθήκη παράγοντα διασταύρωσης (πράσινο).	47
Διάγραμμα 3: Επίδραση χρόνου στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Σύγκριση δειγμάτων που προέκυψαν από ανάδευση 10min (κόκκινο) και 20min (πράσινο).	47
Διάγραμμα 4: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Σύγκριση δειγμάτων που προέκυψαν από ανάδευση με 300rpm (κόκκινο), 700rpm (μπλε) και 1100rpm (πράσινο).	48
Διάγραμμα 5: Προφίλ απελευθέρωσης του ΚοΕ1 για t=0-180min.	52
Διάγραμμα 6: Προφίλ απελευθέρωσης για το ΚοΕ6 για t=0-310min.	52
Διάγραμμα 7: Φάσμα NMR του συμπλόκου ΚοΕ6 σε D ₂ O.	57
Διάγραμμα 8: Φάσμα IR των συμπλόκων ΚοΕ6 και ΚοΕ39 συγκριτικά με τις καθαρές ενώσεις.	60
Διάγραμμα 9: Φάσμα IR των συμπλόκων ΚοΕ51, ΚοΕ68, του διαλύματος CS 0,2% και της TYR.	60
Διάγραμμα 10: Φάσμα IR της χημικά τροποποιημένης χιτοζάνης, ΚοΕ81.	61
Διάγραμμα 11: TGA του συμπλόκου ΚοΕ6.	62
Διάγραμμα 12: TGA TYR-βCD/CS.	63
Διάγραμμα 13: TGA ΚοΕ81.	63
Διάγραμμα 14: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R ₁ : TYR-CS).	65
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-μεγέθους (TYR-CS).	66
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TYR-μεγέθους (TYR-CS).	67
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TYR-TPP-μεγέθους (TYR-CS).	67
Διάγραμμα 18: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R ₂ : TYR-CS).	69
Διάγραμμα 19: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-ζ-δυναμικού (TYR-CS).	69
Διάγραμμα 20: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TYR-CS-ζ-δυναμικού (TYR-CS).	70
Διάγραμμα 21: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-TYR-ζ-δυναμικού (TYR-CS).	70
Διάγραμμα 22: Γενική συσχέτιση παραγόντων και αποκρίσεων στο DoE TYR-CS.	71
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R ₁ : TYR-βCD/CS).	73
Διάγραμμα 24: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-μεγέθους (TYR-βCD/CS).	74
Διάγραμμα 25: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης ΚοΕ6-CS-μεγέθους (TYR-βCD/CS).	75
Διάγραμμα 26: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-ΚοΕ6-μεγέθους (TYR-βCD/CS).	75
Διάγραμμα 27: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R ₂ : TYR-βCD/CS).	77
Διάγραμμα 28: : Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).	78
Διάγραμμα 29: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης ΚοΕ6-CS-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).	78
Διάγραμμα 30: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-ΚοΕ6-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).	79
Διάγραμμα 31: Γενική συσχέτιση παραγόντων και αποκρίσεων στο DoE TYR-CS.	79

Διάγραμμα 32: Καμπύλη αναφοράς TYR στα 222,4nm, σε διαλύτη H ₂ O:EtOH 2:1. _____	85
Διάγραμμα 33: Φάσματα NMR του συμπλόκου ΚοΕ6 σε D ₂ O, σε χρόνους t=0 (κόκκινο), t=20min (πράσινο) και t=40min (μπλε). _____	86
Διάγραμμα 34: Φάσμα IR ΚοΕ1, ΚοΕ39. _____	87
Διάγραμμα 35: TGA TYR. _____	90
Διάγραμμα 36: TGA βCD. _____	90
Διάγραμμα 37: TGA CS. _____	91

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές Ιδιότητες TYR. ¹²⁻¹³	8
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μεγέθη CD. ²⁶	10
Πίνακας 3: Φυσικοχημικές Ιδιότητες βCD. ³¹⁻³³	12
Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών.	27
Πίνακας 5: Οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα.	27
Πίνακας 6: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ1. Για τη σύνθεση του συμπλόκου ΚοΕ39 χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι διπλάσιες ποσότητες.	29
Πίνακας 7: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ5.	29
Πίνακας 8: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ6.	30
Πίνακας 9: Συνθήκες μέτρησης DLS.	32
Πίνακας 10: Συνθήκες πειράματος DPPH.	33
Πίνακας 11: Συνθήκες πειραμάτων TGA.	34
Πίνακας 12: Συνθήκες μέτρησης DLS.	37
Πίνακας 13: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ81.	39
Πίνακας 14: Συνθήκες πειραμάτων TGA.	40
Πίνακας 15: Συνθήκες, παράγοντες και αποκρίσεις για το DoE των TYR-CS NPs.	41
Πίνακας 16: Συνθήκες, παράγοντες και αποκρίσεις για το DoE των TYR-βCD/CS NPs.	41
Πίνακας 17: Απόδοση διεργασίας για τα διάφορα προϊόντα.	42
Πίνακας 18: ΕΕ% και LC% για τα σύμπλοκα ΚοΕ1 και ΚοΕ39 σε διάφορες συνθήκες διεργασίας.	43
Πίνακας 19: Μέση τιμή επιφανειακού και ολικού εγκλεισμού.	44
Πίνακας 20: ΕΕ% για τα CS NPs.	44
Πίνακας 21: Πίνακας αποτελεσμάτων DLS για τα σύμπλοκα TYR-βCD, όπου «μ.ό.» ο μέσος όρος του αντίστοιχου μεγέθους και «std» η τυπική απόκλιση.	45
Πίνακας 22: 1 ^η σειρά πειραμάτων: Αποτελέσματα DLS πριν και μετά την υπερφυγόκεντρο (ανακλιμάκωση 2× από συνήθεις συνθήκες).	48
Πίνακας 23: Αποτελέσματα DLS για CS NPs (blank) στο υπερκείμενο υγρό και στο «κέικ».	49
Πίνακας 24: 2 ^η σειρά πειραμάτων: Αποτελέσματα DLS πριν την υπερφυγόκεντρο (ανακλιμάκωση 3× από συνήθεις συνθήκες).	49
Πίνακας 25: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS κυρίως δειγμάτων.	50
Πίνακας 26: Πειράματα της mCS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα DLS.	51
Πίνακας 27: RP ΚοΕ1.	52
Πίνακας 28: RP ΚοΕ6.	52
Πίνακας 29: Δείκτης IC ₅₀ για την ελεύθερη ρίζα DPPH, συμπλόκων και καθαρών ουσιών σε διάφορους χρόνους.	56
Πίνακας 30: Χημικές μετατοπίσεις TYR, βCD στο ΚοΕ6 σε σχέση με τις αντίστοιχες καθαρές ενώσεις.	57
Πίνακας 31: Χημικές μετατοπίσεις TYR, βCD στο ΚοΕ39 σε σχέση με τις αντίστοιχες καθαρές ενώσεις.	58
Πίνακας 32: Μεταβολές κατά τη TGA ανά δείγμα.	62
Πίνακας 33: Πειράματα DoE για το σύμπλοκο TYR-CS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα.	64
Πίνακας 34: ANOVA για την R ₁ (TYR-CS).	65
Πίνακας 35: Πίνακας R ² μοντέλου (TYR-CS).	65
Πίνακας 36: ANOVA για την R ₂ (TYR-CS).	68
Πίνακας 37: Πίνακας R ² μοντέλου (TYR-CS).	68

Πίνακας 38: Πειράματα DoE για το σύμπλοκο TYR-βCD/CS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα.	72
Πίνακας 39: ANOVA για την R_1 (TYR-βCD/CS).	73
Πίνακας 40: Πίνακας R^2 μοντέλου (TYR-βCD/CS).	73
Πίνακας 41: ANOVA για την R_2 (TYR-βCD/CS).	76
Πίνακας 42: Πίνακας R^2 μοντέλου (TYR-βCD/CS).	77
Πίνακας 43: Απορρόφηση της TYR σε διάφορες συγκεντρώσεις στα 222,4nm και 276,8nm.	85
Πίνακας 44: Κορυφές IR ΚοΕ1, ΚοΕ39.	87
Πίνακας 45: Κορυφές IR TYR, βCD, ΚοΕ6.	88
Πίνακας 46: Κορυφές IR CS 0,2%, ΚοΕ51, ΚοΕ68.	89
Πίνακας 47: Κορυφές IR ΚοΕ81.	89

Συντομογραφίες

TYR: τυροσόλη (tyrosol)

CD: κυκλοδεξτρίνη (cyclodextrin)

βCD: β-κυκλοδεξτρίνη (β-cyclodextrin)

CS: χιτοζάνη (chitosan)

eq: ισοδύναμο (equivalent)

r.t.: θερμοκρασία δωματίου (room temperature)

δεσμοί H: δεσμοί υδρογόνου

rpm: στροφές ανά λεπτό (Revolutions Per Minute)

NPs: νανοσωματίδια (nanoparticles)

ICs: σύμπλοκα εγκλεισμού (inclusion complexes)

δεσμοί H: δεσμοί υδρογόνου

ΙΠ: Ιονοτροπική Πηκτωμάτωση

C-L: Παράγοντας διασταύρωσης (Cross-Linker)

mCS: χημικά τροποποιημένη χιτοζάνη (Modified Chitosan)

EtOH: αιθανόλη (Ethanol)

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία γνωρίζει πολύ μεγάλη ανάπτυξη τον τελευταίο καιρό σε πληθώρα τομέων, όπως είναι η επιστήμη των υλικών, των τροφίμων και η ιατρική. Εκτεταμένη έρευνα γίνεται στο σχεδιασμό νέων δομών και στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών με βάση τα νανοσωματίδια, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων που προσφέρει η νανοκλίμακα.

Μια εφαρμογή που μελετάται ευρέως, είναι ο εγκλεισμός μιας δραστικής ουσίας σε κατάλληλους φορείς προς το σχηματισμό νανοσωματιδίων, το μέγεθος των οποίων είναι συγκρίσιμο με αυτό των βιολογικών συστημάτων. Σκοπός είναι η ανάπτυξη συστημάτων με στοχευμένη και ελεγχόμενη δράση, οι μειωμένες παρενέργειες αλλά και η παράταση της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού του φυσικού αντιοξειδωτικού τυροσόλη σε δύο φυσικής προέλευσης φορείς: τον κυκλικό ολιγοσακχαρίτη β-κυκλοδεξτρίνη και το βιοπολυμερές χιτοζάνη καθώς και τον συνδυασμό αυτών. Τα πλεονεκτήματα στη χρήση φυσικών μορίων είναι η βιοαποικοδομησιμότητά τους, η χαμηλή τοξικότητα και η συμβατότητά τους με βιολογικά συστήματα.

Στόχος της έρευνας ήταν η βελτιστοποίηση των πειραματικών διεργασιών, η μελέτη της δομής και της στοιχειομετρίας των συμπλόκων, η παρατήρηση ιδιοτήτων πριν και μετά τον εγκλεισμό. Επίσης, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση τόσο της τυροσόλης όσο και των νανοσωματιδίων που περιείχαν εγκλεισμένη τυροσόλη. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με διάφορες μεθόδους και τεχνικές, όπως φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR), προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH, μέτρηση μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).

Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στη βελτιστοποίηση της διεργασίας παρασκευής νανοσωματιδίων χιτοζάνης, όπου, αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη διαφορετικών τεχνικών σχηματισμού νανοσωματιδίων και ακολούθησε πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τελικά, εξήχθησαν συμπεράσματα για τις διαφορετικές μεθόδους και συνθήκες σύνθεσης των νανοσωματιδίων, επιβεβαιώθηκε ο εγκλεισμός των μορίων και προσδιορίστηκε η απόδοση εγκλεισμού. Η προστασία της τυροσόλης μέσα στους φορείς επιβεβαιώθηκε μέσω των αναλυτικών τεχνικών χαρακτηρισμού δομής, ενώ μελετήθηκε και η απελευθέρωσή της. Επίσης, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση της τυροσόλης και των νανοσωματιδίων.

Λέξεις-κλειδιά: τυροσόλη, β-κυκλοδεξτρίνη, χιτοζάνη, νανοσωματίδια, αντιοξειδωτική δράση, πειραματικός σχεδιασμός, , νανοφορείς, σύμπλοκα εγκλεισμού

Abstract

Nanotechnology has been very popular lately in a variety of fields, such as materials science, food science and medicine. Extensive research is being conducted on the design of new structures and the development of new nanoparticle-based technologies due to the unique properties of the nanoscale.

A widespread application is the inclusion of an active substance in suitable carriers for the formation of nanoparticles, in order to achieve size comparable to that of biological systems. The aim is to develop systems with targeted and controlled action, reduced side effects and extended time of action.

The aim of the present work is to study the process of encapsulation of the natural antioxidant tyrosol in two naturally occurring carriers: the cyclic oligosaccharide β -cyclodextrin and the biopolymer chitosan, but also their combination. The advantages of using natural molecules are their biodegradability, low toxicity and their ability to be absorbed compatibility with biological systems.

The aim of the research was to optimize the experimental processes, to study the structure and stoichiometry of the complexes, to observe the properties before and after the encapsulation. The antioxidant activity of both the active compound and the complexes has been extensively studied. Complete characterization of the systems was performed by various methods and techniques, such as Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Infrared Spectroscopy (FT-IR), antioxidant activity determination by the DPPH method, Dynamic Light Scattering (DLS) for the measurement of size, polydispersity index and ζ -potential, Thermogravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM).

In addition, main part of the research was the optimization of the process of the preparation of chitosan nanoparticles, in which different nanoparticle formation techniques were initially studied, followed by experimental design and statistical analysis of the results.

Finally, useful conclusions about the different methods and conditions of nanoparticle synthesis were obtained, the encapsulation of the molecules was confirmed and the encapsulation efficiency was determined. The protection of tyrosol inside the carriers was confirmed by structural characterization techniques, and the release profile was studied. The antioxidant activity of tyrosol and nanoparticles was also determined.

Keywords: tyrosol, β -cyclodextrin, chitosan, nanoparticles, antioxidant activity, design of experiments, nanocarriers, inclusion complex

1. Εισαγωγή

1.1. Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων (Drug delivery systems)

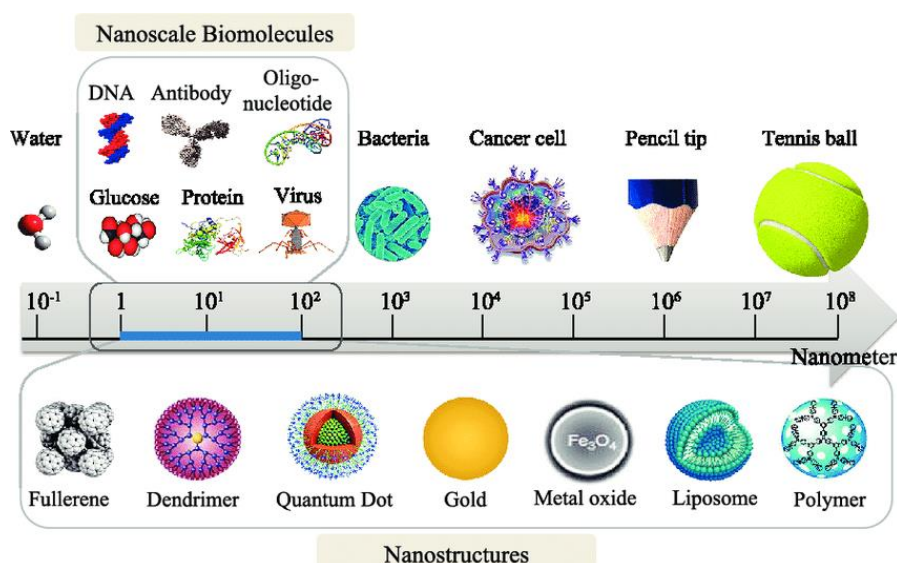
1.1.1. Ρόλος και χρησιμότητα

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ενός φαρμάκου παίζει η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική συμπεριφορά της δραστικής ουσίας στον οργανισμό και οι λοιπές φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις. Ο σχεδιασμός και η μελέτη ενός νέου φαρμάκου ξεκινά από τον τρόπο χορήγησης και εισόδου στον οργανισμό, συνεχίζει με την πορεία μέσα σε αυτόν και καταλήγει στην αποδέσμευση στο κύτταρο/ιστό-στόχο και την τελική απέκκριση όποιου υπολείμματος ή έκδοχης ουσίας (μεταβολισμός, διάσπαση ή αποβολή από τον οργανισμό).

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αναπτύχθηκαν με σκοπό η δραστική ουσία να φτάσει στο στόχο, να μη διασπαστεί ή αλλοιωθεί κατά τη μεταφορά της και να αποδεσμεύεται ελεγχόμενα. Διάφοροι φορείς που αναπτύχθηκαν ήταν πολυμερικά μικροσωματίδια, μικροσφαίρες κ.ά. με βάση είτε φυσικά μακρομόρια είτε συνθετικά πολυμερή. Ταυτόχρονα, όμως, άρχισαν να εξετάζονται και φυσικά μόρια για τη χρήση τους ως φορείς φαρμάκων, με κριτήριο τη βιοδιαθεσιμότητά τους, τη χαμηλή τοξικότητα και τη δυνατότητα βιοαποικοδόμησής τους.¹⁻²

1.1.2. Νανοσωματίδια ως φορείς φαρμάκων

Πλέον οι έρευνες στοχεύουν σε νανοσωματίδια ως φορείς φαρμάκων, λόγω των επιπλέον πλεονεκτημάτων που προσφέρει η **νανο-κλίμακα**. Πολλά από αυτά βασίζονται σε προϋπάρχοντα συστήματα, αλλάζοντας τις διαστάσεις τους από τη μικρο- στη νάνο-κλίμακα. Ταυτόχρονα, όμως, αναπτύσσονται ταχύτατα και άλλα εντελώς νέα συστήματα.³



Εικόνα 1: Συγκριτική κλίμακα διαστάσεων.⁴

Νανοεπιστήμη και Νανοτεχνολογία

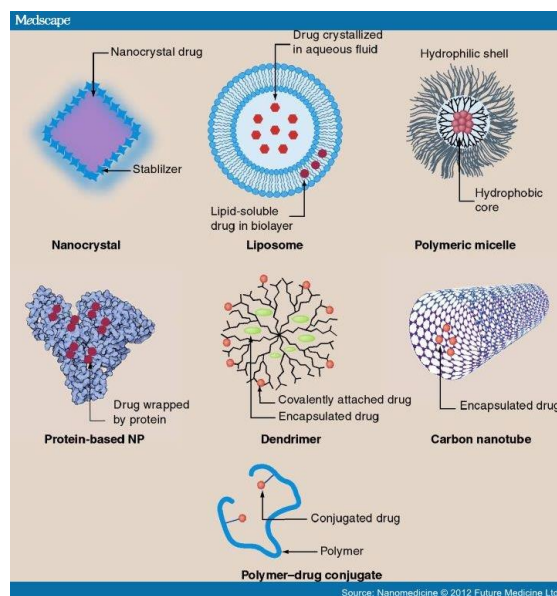
Οι τομείς αυτοί αφορούν τη μελέτη, το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων συστημάτων, των οποίων τουλάχιστον μία διάσταση βρίσκεται στη νάνο-κλίμακα. Τα συστήματα αυτά εμφανίζουν διαφορετικές **ιδιότητες**, σε σχέση με αντίστοιχα μεγαλύτερης κλίμακας, λόγω του ιδιαίτερου μεγέθους, του σχήματος και της δομής τους.⁵ Η νανοεπιστήμη και τεχνολογία έχουν γνωρίσει μεγάλη ανάπτυξη σε πολλούς τομείς όπως στην ιατρική, την κατάλυση, την τεχνολογία τροφίμων, τη γεωργία, την πληροφορική, κ.ά. Στην ιατρική συγκεκριμένα, σημαντική είναι η ανάπτυξη **συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων**, λόγω ιδιαίτερων πλεονεκτημάτων που θα αναλυθούν παρακάτω.²

Βιομόρια ως νανοφορείς

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι είτε φυσικά είτε συνθετικά. Τα διάφορα βιομόρια απομονώνονται και χρησιμοποιούνται είτε απευθείας, χωρίς τροποποίηση της δομής και της μορφολογίας τους είτε αφού τροποποιηθούν χημικά για βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων τους, της διαλυτότητάς τους, της ικανότητας πρόσδεσης ή εγκλεισμού της δραστικής ουσίας. Βιομόρια που δεν είναι εφικτό να απομονωθούν σε επαρκείς ποσότητες, ή δεν είναι χρηστικά στη συγκεκριμένη μορφολογία, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για τη σύνθεση άλλων βιομιμητικών μορίων ή αναλόγων. Συχνά χρησιμοποιούμενα βιομόρια είναι διάφορα σάκχαρα, πρωτεΐνες, ένζυμα και βιταμίνες, ενώ ως μιμητικό προς τις κυτταρικές μεμβράνες χρησιμοποιούμενος φορέας είναι τα λιπώδη σώματα.³

Συνθετικά μόρια-νανοφορείς

Αντίθετα από τα φυσικής προελεύσεως μόρια-φορείς, μπορούν να συντεθούν και τελείως πρωτότυπες ενώσεις. Διάφοροι τύποι συνθετικών νανοσωματιδίων που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως είναι πολυμερικά κυστίδια, μικκύλια, δενδριμερή κ.ά. από την κατηγορία των πολυμερών. Άλλου τύπου νανονσωματίδια είναι νανοσωλήνες άνθρακα, ανόργανα νανοσωματίδια (οξειδία όπως TiO_2 , μεταλλικά όπως Au , Ag κλπ.).³ (εικόνα 2)



Εικόνα 2: Διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων χρησιμοποιούμενοι ως φορείς φαρμάκων.⁶

1.1.3. Χαρακτηριστικά νανοφορέων

Βασικές προϋποθέσεις για την καταλληλότητα των νανοφορέων είναι η στοχευμένη και ελεγχόμενη **αποδέσμευση**, η **βιοσυμβατότητα** (ελαχιστοποιημένη τοξικότητα) και η **βιοαποικοδομησιμότητα**, καθώς και να μπορεί να εντοπίζεται η θέση του φαρμάκου στον οργανισμό κάθε στιγμή.

Εκτός από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που προσφέρουν τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και αναφέρθηκαν παραπάνω (1.1.1.), οι νανοδιαστάσεις προσφέρουν βελτιστοποιημένες ιδιότητες ή επιπλέον πλεονεκτήματα, λόγω της ιδιαιτερότητας του μεγέθους.

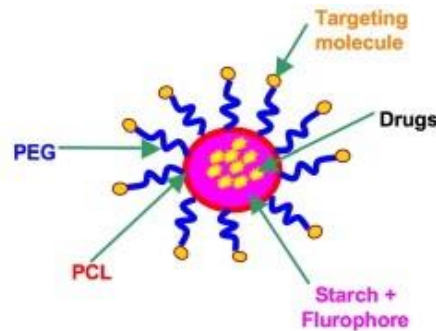
Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της επιφάνειας και συνεπώς του **λόγου επιφάνεια/όγκο** έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφανειακής δραστηριότητας. Το μέγεθος τους είναι συγκρίσιμο με αυτό των κυττάρων, όπου με τις κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να εισέρθει σε αυτό και να δράσει ενδοκυτταρικά. Τέλος, λόγω της ποικιλίας των μορίων που μπορούν να συνθέσουν ένα νανοσωματίδιο, μπορούν να ρυθμιστούν επιλεκτικά η υδροφιλικότητα, το φορτίο, οι μαγνητικές ιδιότητες κ.ά.

Η αναλογία επιφάνειας προς όγκο, πέρα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει λόγω αύξησης της επιφανειακής δραστηριότητας, είναι και ένας παράγοντας που επηρεάζει την αποδέσμευση της μεταφερόμενης ουσίας. Δηλαδή, μικρότερα σωματίδια με αυξημένο αυτό το λόγο, θα μεταφέρουν την ουσία είτε προσδεσμένη στην επιφάνειά τους είτε κοντά σε αυτήν, επιτυγχάνοντας έτσι ταχεία αποδέσμευση. Όταν το μέγεθος αυξηθεί, δημιουργείται περισσότερος χώρος για εγκλεισμό μεγαλύτερης ποσότητας της δραστηρικής ουσίας στο εσωτερικό του φορέα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου.

Κατά τη σύνθεση του νανοσωματιδίου προσδιορίζεται το μέγεθος αλλά και η κατανομή των μεγεθών στο δείγμα, τα οποία είναι χαρακτηριστικά μεγέθη. Σε αυτά μπορεί να βασίζεται η *in vivo* διασπορά τους, η τοξικότητά τους, η ικανότητα στόχευσης του μορίου/κυττάρου/ιστού-στόχου. Η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία, ο ρυθμός αποδέσμευσής της και η σταθερότητά τους είναι, επίσης, συνάρτηση του μεγέθους του σωματιδίου. Το μέγεθός τους και η κινητικότητά τους τα ευνοεί για πρόσδεση σε κυτταρικούς ή ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, διείσδυση σε διάφορα κύτταρα και όχι να μένουν στα επιθηλιακά στρώματα. Μέσα από την παρατήρηση των παραπάνω μεγεθών και χαρακτηριστικών, επιδιώκεται ο έλεγχος και η ρύθμισή τους.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νανοφορέα μπορούν να ρυθμιστούν με την επιλογή κατάλληλων μορίων που το απαρτίζουν. Για παράδειγμα, για ένα πολυμερικό σωματίδιο, μπορούμε να επιλέξουμε ένα κατά συστάδες συμπολυμερές, όπου η μία συστάδα είναι πιο υδρόφιλη από την άλλη. Κατά τη διάλυσή του σε εκλεκτικό διαλύτη μπορεί να ρυθμιστεί ποια φάση θα είναι στο εσωτερικό και ποια στο εξωτερικό, ανάλογα με το μόριο που θέλουμε να εγκλείσουμε και το περιβάλλον για το οποίο προορίζεται. Υπάρχει, όμως και η δυνατότητα για εκ των υστέρων τροποποίηση της επιφάνειας, με δραστικές ομάδες, οι οποίες θα έχουν ως σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας, την ικανότητα πρόσδεσης με κάποιον υποδοχέα, τη

ρύθμιση του pH, την παρακολούθηση του φορέα στον οργανισμό ή ακόμα και για την πρόσδεση του επιθυμητού μορίου-φαρμάκου.



Εικόνα 3: Τελική τροποποίηση του νανοφορέα για φαρμακευτική χρήση (XPclad).³

Στην εικόνα 2 φαίνεται ένα παράδειγμα τέτοιας τροποποίησης νανοφορέα, με παράγοντες που ρυθμίζουν την υδροφιλικότητα για κατάλληλη διάχυση (υδρόφιλη Πολυαιθυλενογλυκόλη - PEG, υδρόφοβη Πολυκαπρολακτόνη - PCL), ενεργοποίησή του με κατάλληλο μόριο που θα αλληλεπιδράσει με το στόχο (π.χ. κάποιο αντίσωμα), ενώ στο εσωτερικό του εκτός από το φάρμακο έχει εγκλειστεί και φθορίζουσα ουσία για την ανίχνευσή του.

Αν επιτευχθεί, εν τέλει, η εκλεκτική αποδέσμευση, ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η χορήγηση μικρότερης δόσης, το οποίο μειώνει κι άλλο την εμφάνιση τυχόν παρενεργειών αλλά έχει και οικονομικά οφέλη.

Μη επιθυμητή, όμως, είναι η τάση τους για συσσωμάτωση, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους. Δυσκολεύει τη διαλυτότητά τους και αναιρεί τις ιδιότητες που οφείλονταν στο μέγεθος. Έτσι, πρέπει να ελέγχεται και να ρυθμίζεται (π.χ. με την πρόσδεση επιφανειοδραστικών ουσιών που απωθούν το ένα σωματίδιο από το άλλο στερεοχημικά ή ηλεκτροστατικά).

Τέλος, ένα άλλο μειονέκτημα των νανοσωματιδίων είναι η πιθανή τοξικότητά τους που οφείλεται στο μέγεθός τους. Όντας σε συγκρίσιμο μέγεθος με βιολογικά συστήματα και ιδιαίτερα με τα κύτταρα των οργανισμών, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτά, να εισέλθουν στο εσωτερικό τους όπου και θα συσσωρευθούν. Συνεπώς, κάθε ενδεχόμενη χρήση πρέπει να ελεγχθεί πολύ προσεκτικά ως προς τις ενδεχόμενες παρενέργειες.^{3, 7}

1.1.4. Εγκλεισμός δραστικής ουσίας και απελευθέρωσή της

Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι σύνθεσης, από τις οποίες επιλέγεται κάθε φορά η καταλληλότερη ανάλογα το προς εγκλεισμό μόριο, την εφαρμογή και το χρόνο παραμονής μέσα στον οργανισμό. Το μέγεθος και η κατανομή μεγεθών επηρεάζονται άμεσα από τη μέθοδο παρασκευής και ακόμα περισσότερο από τη μήτρα εγκλεισμού. Αυτά τα δύο μεγέθη παίζουν σημαντικό ρόλο στην *in vivo* συμπεριφορά των νανοσωματιδίων, καθώς καθορίζουν την πρόσληψή τους από τα κύτταρα και τη δυνατότητα προσπέρασης βιολογικών εμποδίων.

Οι μέθοδοι εγκλεισμού κατανέμονται σε 2 βασικές κατηγορίες. Αυτές διαφοροποιούνται με τη χρονική στιγμή που γίνεται ο εγκλεισμός της δραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, μπορεί να γίνεται ταυτόχρονα με τη σύνθεση των NPs, ή προστίθεται μετά την παρασκευή τους.⁸

Επίσης, η επιθυμητή ένωση μπορεί να παγιδεύεται, προσροφάται, προσκολλάται ή εγκλείεται εντός ή επάνω σε μια νανο-μήτρα. Ανάλογα με το μοντέλο που ακολουθείται, μπορεί να απαιτείται κατά τη διεργασία εγκλεισμού, η προσθήκη επιπλέον βοηθητικών μορίων, για την πρόσδεση των επιθυμητών ενώσεων, ή τη σταθεροποίηση των τελικών συμπλόκων. Παράδειγμα αυτών είναι η χρήση παραγόντων διασταύρωσης (cross-linkers), που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις πολυμερών για την δικτύωση των πολυμερικών αλυσίδων και συνεπώς την αύξηση της σταθερότητάς τους. Η χρήση αυτών των προσθέτων επηρεάζει και τη μετέπειτα απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας.^{3,9}

Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις δε χρησιμοποιούνται πρόσθετα μόρια για το σχηματισμό ομοιοπολικών ή ιοντικών δεσμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κυκλοδεξτρίνη, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις σχηματίζει σύμπλοκα ξενιστή - ξενιζομένου (host - guest), όπου επικρατούν υπερμοριακές δυνάμεις συγκράτησης της μεταφερόμενης ουσίας.¹⁰

Σε πολλές περιπτώσεις, ο συνδυασμός φορέων μπορεί να οδηγήσει στη βελτίωση των ιδιοτήτων του τελικού συμπλόκου και στην καλύτερη προστασία της δραστικής ουσίας.

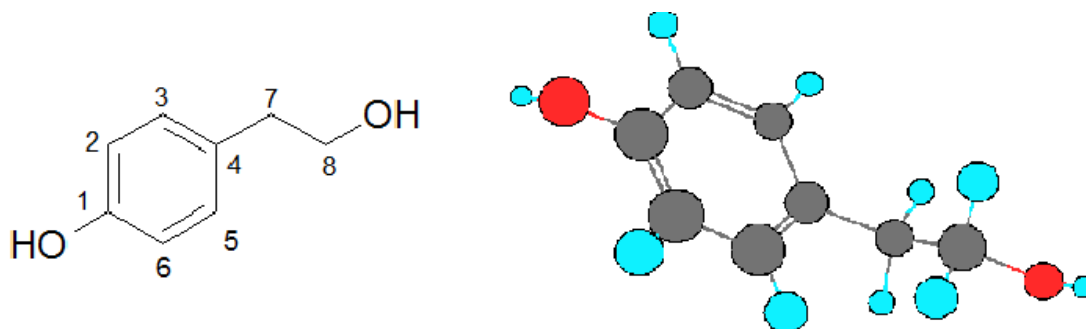
Τέλος, σημαντική είναι και η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, όσον αφορά το χρόνο, το ρυθμό και τις συνθήκες στις οποίες θα αποδεσμευτεί. Συνεπώς, μελετάται ο μηχανισμός και το προφίλ απελευθέρωσης που φαίνεται, επίσης, να επηρεάζονται από τους παραπάνω παράγοντες.³

1.2. Δραστική ουσία και νανοφορείς της παρούσας έρευνας

1.2.1. Τυροσόλη (TYR)

1.2.1.1. Δομή και Ονομασία

Η 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλη [τυροσόλη (TYR), μοριακός τύπος $C_8H_{10}O_2$] είναι μία φαινόλη υποκατεστημένη στον C4 με μία 2-υδροξυαιθυλο-ομάδα¹¹. Η δομή της καθώς και η 3D απεικόνιση φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 1: Η δομή της TYR σε διδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση.

1.2.1.2. Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές Ιδιότητες TYR.¹²⁻¹³

Ιδιότητα	Τιμή	Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό Βάρος	138,16 g/mol	Διαλυτότητα	H ₂ O: 106,9 ± 1,5 g/L
Σημείο Τήξης	90,0 °C	Κατάσταση	Στερεό (σκόνη)
Σημείο Βρασμού	139 °C	Χρώμα	Λευκό

1.2.1.3. Φυσική Προέλευση

Η τυροσόλη είναι μία ένωση φυσικής προέλευσης και συναντάται ιδιαίτερα ως συστατικό μεσογειακών τροφών. Απαντάται στο **ελαιόλαδο**, ως φυσικό αντιοξειδωτικό, αλλά και στο λευκό και κόκκινο κρασί, το βερμούτ και την μπύρα.

Πιο συγκεκριμένα, η τυροσόλη και η **υδροξυτυροσόλη** (HTYR) είναι από τις πιο διαδεδομένες βιοφαινόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και είναι υπεύθυνες για τις ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητές του ελαιόλαδου, όπου εμφανίζονται είτε στην ελεύθερη μορφή τους είτε εστεροποιημένες.¹⁴⁻¹⁶

Η τυροσόλη μπορεί να απομονωθεί είτε από απευθείας εκχύλιση του καρπού της ελιάς, είτε από τα απόβλητα που προκύπτουν από την επεξεργασία της ελιάς και του ελαιόλαδου.¹⁷⁻¹⁸

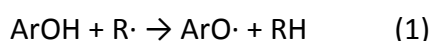
1.2.1.4. Αντιοξειδωτική δράση, βιοχημικός ρόλος και άλλες εφαρμογές

Η φαρμακευτική δράση της TYR σε συνδυασμό με τη βιοδιαθεσιμότητά της, την θέτουν στο επίκεντρο πολλών ερευνών με σκοπό την ανάπτυξη φαρμάκων. Οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες σχετίζονται με την πρόληψη ή θεραπεία παθήσεων όπως διάφορους τύπους καρκίνων, καρδιαγγειακά προβλήματα, παχυσαρκία, υπεργλυκαιμία και διάφορα άλλα προβλήματα που σχετίζονται με το μεταβολισμό, ενώ ακόμα μπορεί να δράσει και ως αντιφλεγμονώδης και αντιμικροβιακός παράγοντας.¹⁹⁻²²

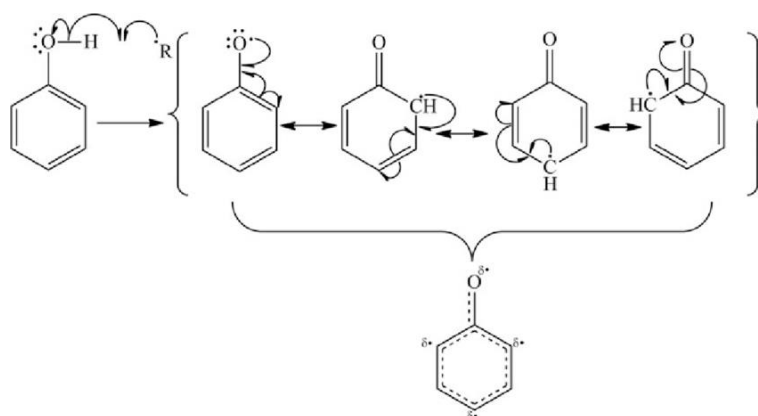
Σχέση δομής-δράσης:

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της TYR οφείλονται στη δομή της. Η TYR ανήκει στην οικογένεια των φαινολών, δηλαδή στη δομή της υπάρχει ένας αρωματικός δακτύλιος ενωμένος με μια υδροξυλομάδα (ArOH). Σε αυτό το τμήμα, υπάρχουν απεντοπισμένα ηλεκτρόνια, και δημιουργείται έτσι ένα εκτεταμένο ηλεκτρονιακό σύστημα. Το σύστημα αυτό είναι σε θέση να σταθεροποιήσει ελεύθερες ρίζες.

Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης που λαμβάνει χώρα στην περίπτωση των φαινολών, είναι κατά κύριο λόγο ο μηχανισμός **μεταφοράς πρωτονίου**. Σύμφωνα με αυτόν, το H της υδροξυλομάδας μπορεί εύκολα να μεταφερθεί σε μία ελεύθερη ρίζα από το περιβάλλον του (R·) και να την απενεργοποιήσει:



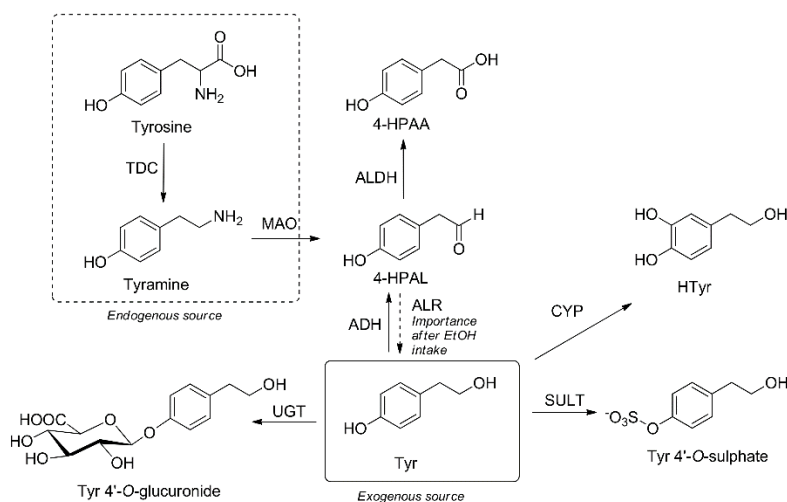
Ο λόγος που συμβαίνει αυτό, είναι γιατί ο φαινολικός δακτύλιος, μέσω δομών συντονισμού, μπορεί να σταθεροποιήσει καλύτερα τη ρίζα, όπως φαίνεται στο σχήμα:



Σχήμα 2: Σταθεροποίηση ρίζας στο φαινολικό δακτύλιο λόγω συντονισμού.²³

Στην προκειμένη περίπτωση, λόγω της ύπαρξης επιπλέον υδροξυλομάδας, η αντιοξειδωτική δράση ενισχύεται.

Όπως αναφέρθηκε, η HTYR είναι ένα ακόμα συστατικό του ελαιόλαδου, που μάλιστα έχει πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από την TYR. Έχουν αναφερθεί μηχανισμοί *in vivo*, όπου η TYR μπορεί να μεταβληστεί προς HTYR ή και άλλες παράγωγες ενώσεις, προσδίδοντας επιπλέον πλεονεκτήματα.



Τέλος, έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά, ότι οι δεσμοί H που αναπτύσσονται μεταξύ των υδροξυλίων της TYR και γειτονικών μορίων, όπως π.χ. με τα -OH της β-κυκλοδεξτρίνης (βCD) και της χιτοζάνης (CS), αυξάνουν την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Αυτός ο παράγοντας θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω.²³⁻²⁵

1.2.2. β-Κυκλοδεξτρίνη (βCD)

1.2.2.1. Κυκλοδεξτρίνες

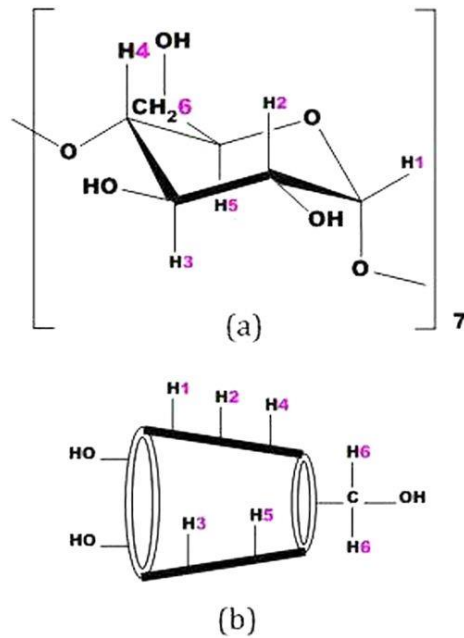
Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μία οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών, που αποτελούνται από μόρια D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με α-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό. Εναλλακτικά λέγονται και κυκλοαμυλόζες ή κυκλογλυκάνες. Συνήθως αποτελούνται από 6, 7 ή 8 μόρια σακχάρου, με ονομασία α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα. Είναι σταθερά μόρια και το σχήμα τους θυμίζει σχήμα **κόλουρου κώνου** και το μέγεθος της εσωτερικής κοιλότητας και της εξωτερικής περιμέτρου αυτού σχετίζεται με την κατηγορία της κυκλοδεξτρίνης.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μεγέθη CD.²⁶

Χαρακτηριστικό	αCD	βCD	γCD
Μονάδες γλυκοπυρανόζης	6	7	8
Μοριακό Βάρος (g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο H ₂ O (% w/v, 25°C)	14,5	1,85	23,2
Εξωτερική Διάμετρος (Å)	14,6	15,4	17,5
Διάμετρος Κοιλότητας (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Ύψος κώνου (Å)	7,9	7,9	7,9
Όγκος κοιλότητας (Å ³)	174	262	427

Η εσωτερική κοιλότητα, όπου υπάρχουν μόνο δεσμοί C-H και C-C είναι υδρόφοβη, ενώ εξωτερικά που προσανατολίζονται οι υδροξυλομάδες, της προσδίδουν υδρόφιλο χαρακτήρα.

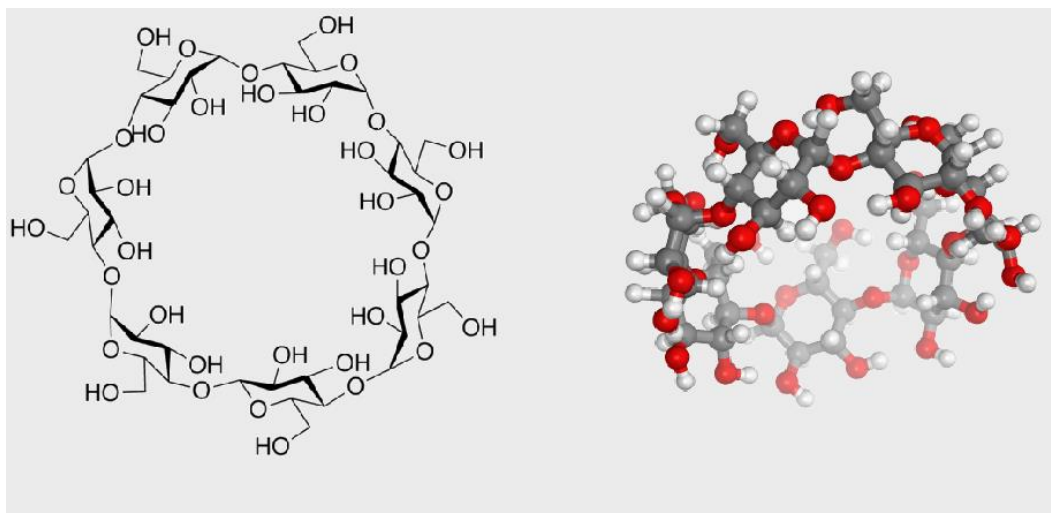
Στο Σχήμα 4 φαίνεται και ο προσανατολισμός των H σε ένα μόριο κυκλοδεξτρίνης (εδώ βCD), όπου τα H3 και H5 βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας, ενώ τα H2, H4, H6a,b κατευθύνονται προς τα έξω.²⁶⁻²⁷



Σχήμα 4: Προσανατολισμός των H στο μόριο της CD.²⁸

1.2.2.2. Δομή της βCD

Η δομή της βCD φαίνεται πιο παραστατικά παρακάτω. Ο μοριακός της τύπος είναι: $C_{42}H_{70}O_{35}$.



Σχήμα 5: 2D και 3D απεικόνιση του μορίου της βCD.²⁹⁻³⁰

1.2.2.3. Φυσικοχημικές Ιδιότητες βCD

Πίνακας 3: Φυσικοχημικές Ιδιότητες βCD.³¹⁻³³

Ιδιότητα	Τιμή	Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό Βάρος	1134,98 g/mol	Διαλυτότητα	H ₂ O: 18,5 g/L
Σημείο Τήξης	290,0°C	Κατάσταση	Κρυσταλλικό στερεό
Σημείο Βρασμού	1541,2±600 °C	Χρώμα	Λευκό

1.2.2.4. Φυσική Προέλευση βCD και άλλα χαρακτηριστικά

Σημαντικός λόγος που επιλέγεται ευρέως η βCD ως φορέας εγκλεισμού είναι η **διαθεσιμότητά** της. Οι κυκλοδεξτρίνες παράγονται από αποικοδόμηση του αμύλου, όπου το ένζυμο γλυκανοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (CGTase) προκαλεί ενδομοριακή τρανς-γλυκοζυλίωση.

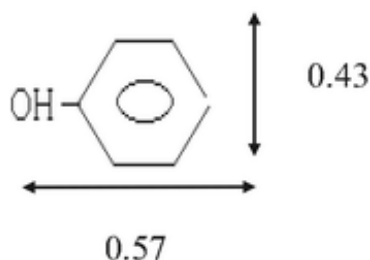
Επίσης, όσον αφορά την τοξικότητά της, δεν θεωρείται επικίνδυνο μόριο, επειδή δυσκολεύεται να διεισδύσει στις λιπόφιλες βιολογικές μεμβράνες. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι δεν είναι τοξική όταν γίνεται χορήγηση από το στόμα, λόγω αδυναμίας απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα. Γενικά, όμως, σε πολύ υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσει εντερικές διαταραχές.²⁶

Τέλος, η μη τροποποιημένη βCD έχει μελετηθεί και ως προς τη βιοαποικοδομησιμότητά της, και έχει δείξει ότι βιοαποικοδομείται μέχρι και 100% και σε σύντομο χρονικό διάστημα (εντός ολίγων ημερών). Ενισχύεται λοιπόν, η κατάλληλότητά της για φαρμακευτική χρήση.³⁴

1.2.2.5. βCD ως φορέας εγκλεισμού

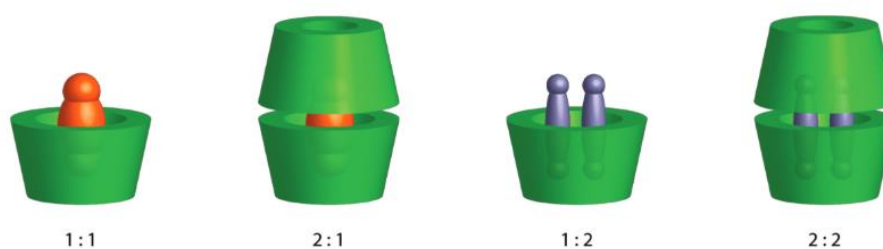
Οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με άλλα μόρια ή ιόντα, είτε σε διάλυμα είτε σε στερεή φάση, ενώ αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους (π.χ. οι υδροξυλομάδες τους με δεσμούς H) και σχηματίζουν νανοσωματίδια. Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες μιας χημικής αντίδρασης ή ως φορείς ουσιών. Η δεύτερη περίπτωση θα αναλυθεί και περισσότερο στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας. Ως φορέας, χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη φαρμακευτική βιομηχανία, με σκοπό την προστασία της ένωσης, την κάλυψη δυσάρεστης γεύσης και οσμής, την μεταφορά της στο μόριο/όργανο στόχο ή/και τη διαλυτοποίησή της όταν πρόκειται για μη υδατοδιαλυτό μόριο.³⁵⁻³⁶

Οι κυκλοδεξτρίνες τείνουν να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού τύπου **ξενιστή-ξενιζομένου** (host-guest). Κατά τη δημιουργία αυτών των συμπλόκων δε σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί, αλλά αναπτύσσονται υπερμοριακές δυνάμεις ή δυνάμεις λόγω υδροφιλικότητας/υδροφοβικότητας. Η κοιλότητα της βCD, επιλέχθηκε για την συγκεκριμένη περίπτωση, λόγω του μεγέθους της. Μικρότερος χώρος, όπως αυτός της αCD, πιθανότατα θα παρεμπόδιζε την είσοδο της TYR, ενώ σε μεγαλύτερο χώρο (γCD) θα δημιουργούνταν ασθενέστερες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.³⁷



Σχήμα 6: Διαστάσεις φαινολικού δακτυλίου (nm).³⁸

Δεν μπορεί να προβλεφθεί απόλυτα η στοιχειομετρία εγκλεισμού. Μερικοί βασικοί τρόποι αλληλεπίδρασης φαίνονται παρακάτω, στο σχήμα 7:



Σχήμα 7: Πιθανές στοιχειομετρίες εγκλεισμού σε CD.³⁹

Να σημειωθεί, ότι σε μη συμμετρικά μόρια μπορεί να παίζει ρόλο και ο προσανατολισμός του μορίου προς εγκλεισμό. Για παράδειγμα, ενώσεις που έχουν και υδρόφιλα και υδρόφοβα μέρη, το τελευταίο θα προτιμήσει να προστατευτεί μέσα στην κοιλότητα της βCD.

Παρ' όλα αυτά υπάρχουν και άλλες αλληλεπιδράσεις που μπορεί να λαμβάνουν χώρα, όπως ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου των υδροξυλομάδων της TYR με αυτές της βCD, στο εξωτερικό του μορίου-ξενιστή. Σε μεγαλύτερα μόρια, ο τρόπος που αλληλοεπιδρούν τα μόρια ξενιστή-ξενιζομένου μπορεί να γίνει ακόμα πιο περίπλοκος και, κατά συνέπεια, και η στοιχειομετρία τους.

Άλλοι τρόποι με τους οποίους μπορεί να χρησιμοποιηθεί η βCD ως φορέας κάποιας ένωσης, είναι η χημική τροποποίησή της και η δημιουργία ομοιοπολικού ή ιοντικού δεσμού με το άλλο μόριο ή με ενδιάμεσο μόριο διασταύρωσης.

Τέλος, η βCD ως φορέας της TYR δύναται να βελτιώσει τις αντιοξειδωτικές της ικανότητες, λόγω των δεσμών H που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο μορίων.²⁵

1.2.2.6. Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων εγκλεισμού σε βCD

Για την παρασκευή των συμπλόκων εγκλεισμού σε βCD (βCD-ICs) έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά διάφορες μέθοδοι όπως η μέθοδος συγκαταβύθισης, λειοτρίβησης (ή πάστας), εκβολής, πηκτού εναιωρήματος, στερεής ανάμειξης κ.ά. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας θα αναπτυχθούν οι δύο πρώτες, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.

Συγκαταβύθιση:

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για το σχηματισμό βCD-ICs.

Η βCD διαλύεται στο νερό ή άλλο διαλύτη και κατά την ανάδευση προστίθεται και η ουσία προς εγκλεισμό. Τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν και το τελικό σύμπλοκο πέφτει ως ίζημα. Παραλαμβάνεται με απόχυση, διήθηση ή φυγοκέντρηση και εκπλένεται.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διαλυτότητα της βCD και του προϊόντος. Η αρχική συγκέντρωση της βCD πρέπει να είναι τόσο υψηλή ώστε κατά το σχηματισμό του συμπλόκου η συγκέντρωσή του να ξεπεράσει τη διαλυτότητά του και να καθιζάνει ως ίζημα. Για αυτό το λόγο, ορισμένες φορές χρειάζεται θέρμανση αρχικά ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα της βCD, ή/και ψύξη μετά την ανάδευση ώστε να πέσει το προϊόν ως ίζημα.

Λειοτρίβηση:

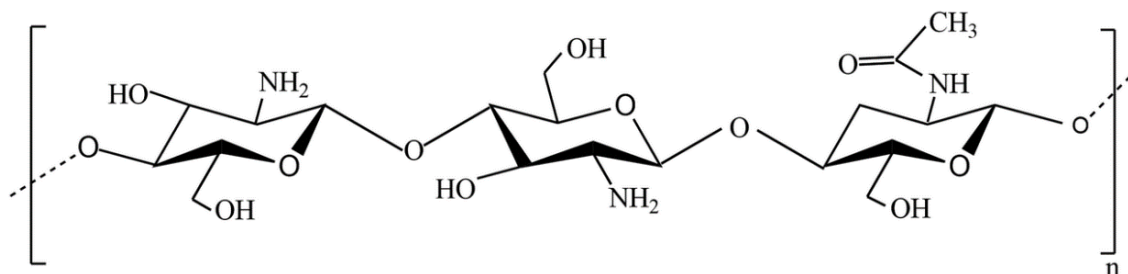
Κατά τη σύνθεση με τη μέθοδο της λειοτρίβησης, η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε γουδί. Προστίθεται ελάχιστος όγκος νερού ή κατάλληλου μείγματος διαλυτών στα στερεά αντιδρώντα και η πάστα που προκύπτει αναδεύεται και επεξεργάζεται με το γουδί. Ο χρόνος επεξεργασίας ποικίλλει και εξαρτάται από το μόριο προς εγκλεισμό. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το προϊόν ξηραίνεται κατευθείαν ή μετά από έκπλυση. Ενδέχεται το προϊόν να μην παραληφθεί σε μορφή σκόνης, αλλά ως χοντρόκοκκο στερεό.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ελαχιστοποίηση της ποσότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται.²⁶

1.2.3. Χιτοζάνη (CS)

1.2.3.1. Δομή

Η χιτοζάνη είναι ένα **βιοπολυμερές** με επαναλαμβανόμενες μονάδες 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζης (N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη) και 2-αμινο-2-δεοξυ-β-D- γλυκοπυρανόζης (D-γλυκοζαμίνη) ενωμένες με β-(1-4)-γλυκοζιτικό δεσμό. Οι μονοσακχαρίτες είναι τυχαία καταναμημένοι και η αναλογία τους δεν είναι συγκεκριμένη.⁴⁰⁻⁴¹



Σχήμα 8: Η δομή της CS.⁴²

1.2.3.2. Ιδιότητες και χαρακτηριστικά CS

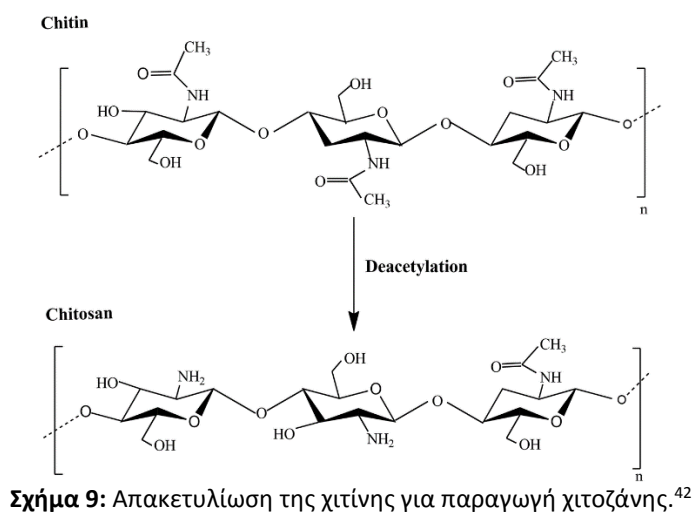
Ο χαρακτηρισμός του μακρομορίου σχετίζεται κυρίως με το μοριακό του βάρος (Μέσο Μοριακό Βάρος) και το βαθμό πολυμερισμού. Άλλα χαρακτηριστικά που προσδιορίζονται είναι οι ρεολογικές ιδιότητες, η σταθερότητα σε διάλυμα (διαλυτότητα, συσσωμάτωση και φιλτράρισμα) και η μορφολογία του στερεού (σκόνη, νιφάδες κλπ.)⁴³

Αν και θεωρείται αδιάλυτη σε κοινούς οργανικούς διαλύτες και γενικότερα δυσδιάλυτο υλικό, μπορεί να διαλυθεί σε υδατικά διαλύματα χαμηλού pH, αφού πρωτονιώνονται οι αμινομάδες σε αυτές τις συνθήκες. Σε αυτό το χαρακτηριστικό οφείλονται και οι αντιμικροβιακές της ιδιότητες μιας και το κατιονικό πολυμερές μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών.

Τέλος, από τις πιο σημαντικές ιδιότητες της CS για τη χρήση της ως φορέα φαρμάκου, είναι η βιοαποικοδομησιμότητά της, η χαμηλή τοξικότητα και η δυνατότητα απορρόφησής της από βιολογικά συστήματα.⁴⁴

1.2.3.3. Φυσική Προέλευση CS

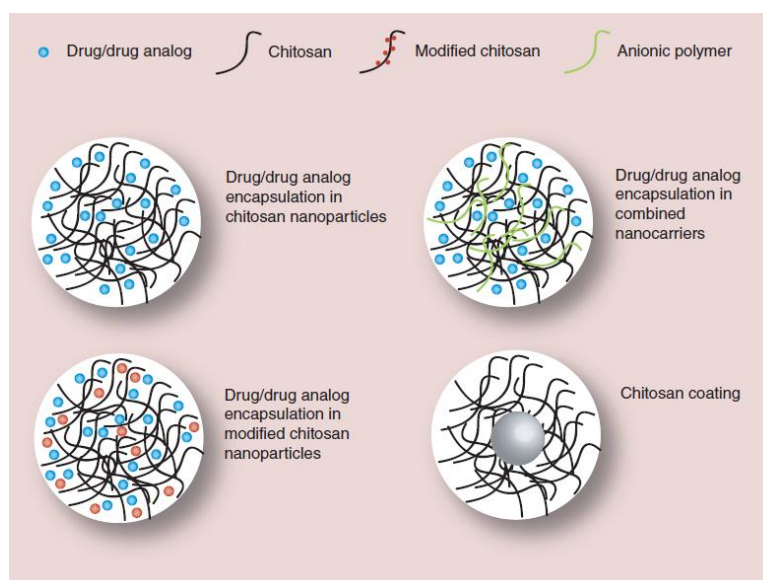
Η χιτοζάνη προέρχεται από την **χιτίνη**, έναν φυσικό πολυσακχαρίτη που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση, δεύτερη σε σειρά μετά την κυτταρίνη. Απακετυλίωση της χιτίνης σε αλκαλικές συνθήκες δίνει ως προϊόν τη CS. Ο λόγος που οι δομικές μονάδες δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένες ή αποκλειστικά D-γλυκοζαμίνες, είναι γιατί η απακετυλίωση γίνεται κατά τυχαίο τρόπο και ο βαθμός απακετυλίωσης εξαρτάται από τη μέθοδο και τις συνθήκες της διεργασίας. Η φυσική προέλευση της πρόδρομης ένωσης χιτίνη, είναι ο εξωσκελετός των εντόμων, των καρκινοειδών (κυρίως γαρίδων και καβουριών) και τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων. Μπορεί να παραληφθεί από τα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά υπάρχει και συνθετική CS.⁴⁵⁻⁴⁶



Σχήμα 9: Απακετυλίωση της χιτίνης για παραγωγή χιτοζάνης.⁴²

1.2.3.4. CS ως φορέας εγκλεισμού

Στην αλληλεπίδραση της CS με τα μόρια προς εγκλεισμό, άλλες πρόσθετες ουσίες ή το περιβάλλον του στόχου, σημαντικό ρόλο παίζουν οι 3 χαρακτηριστικές ομάδες του μονοσακχαρίτη, D-γλυκοζαμίνη. Αυτές είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες και οι πρωτοταγείς αμίνες του μορίου. Η χιτοζάνη μπορεί να τροποποιηθεί χημικά για να βελτιώσει τις ιδιότητές της (π.χ. διαλυτότητα) ή να δημιουργήσει δεσμό με μόριο που θα βοηθήσει στην αλληλεπίδραση με την ουσία προς εγκλεισμό.

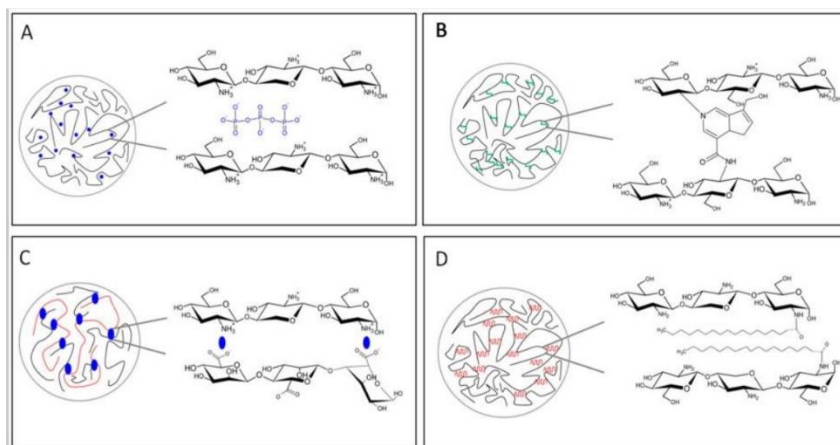


Σχήμα 10: Δυνατοί τρόποι δημιουργίας νανοσυστημάτων CS. ⁴¹

Οι κύριοι μηχανισμοί παρασκευής νανοσωματιδίων χιτοζάνης βασίζονται σε διεργασίες προσθήκης **παράγοντα διασταύρωσης** (cross-linker, C-L), σχηματισμό συμπλεγμάτων πολυηλεκτρολυτών ή σε συσσωμάτωση λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων ύστερα από χημική τροποποίηση της χιτοζάνης. Άλλοι μηχανισμοί που επιλέγονται λιγότερο είναι αυτοί της καταβύθισης, γαλακτωματοποίησης, αντίστροφων μυκκυλίων κ.ά. ⁴¹

1.2.3.5. Μέθοδοι Παρασκευής Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης (CS-NPs)

Οι μέθοδοι παρασκευής CS-NPs βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Η διεργασία με προσθήκη cross-linker είναι χαρακτηριστική των μεθόδων **πηκτωμάτωσης**, που στο σύνολό τους απεικονίζονται στο σχήμα 11.



Σχήμα 11: Μέθοδοι πηκτωμάτωσης: Α) ιοντική διασταύρωση, Β) ομοιοπολική διασταύρωση, C) σύμπλεγμα πολυηλεκτρολυτών, D) συσσωμάτωσης⁴³

Συνήθεις παράγοντες που χρησιμοποιούνται στις δύο πρώτες κατηγορίες, είναι το τριπολυφωσφορικό νάτριο (Sodium Tripolyphosphate, TPP) για την **ιονοτροπική πηκτωμάτωση** και η γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde) για την ομοιοπολική, μέσω αντίδρασης Schiff.

Από τις παραπάνω διεργασίες θα αναλυθεί η υποκατηγορία της ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης (ΙΠ), η οποία και χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διεργασία της παρούσας έρευνας.⁴³

Η ΙΠ είναι η μέθοδος παρασκευής νανοσωματιδίων CS που κυρίως επιλέγεται. Η αρχή της βασίζεται στην προσθήκη ανιοντικού C-L, ο οποίος αλληλεπιδρά λόγω φορτίων με την κατιοντική CS. Ο πιο διαδεδομένος C-L αυτής της κατηγορίας, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι το TPP, το οποίο συνήθως βρίσκεται υπό τη μορφή άλατος νατρίου. Τα O^- του TPP αλληλεπιδρούν με τις αμινομάδες της CS, και έτσι τμήματα της αλυσίδας της CS συγκρατούνται σε πολύ κοντινή απόσταση δημιουργώντας τα νανο- ή μικρο-σωματίδια CS. Το TPP προστίθεται στο διάλυμα CS, μετά την προσθήκη του προς εγκλεισμό μορίου, με αργή ταχύτητα.

Έχει αποδειχθεί ότι τα μεγέθη των σωματιδίων μπορούν να αναπαραχθούν σε σταθερές συνθήκες συγκέντρωσης CS, TPP και διαλύτη. Επίσης, ακόμα και με την εισαγωγή των προσθέτων, πρόκειται για μία μη τοξική μέθοδο.⁴¹

1.3. Μέθοδοι χαρακτηρισμού και ανάλυσης των συμπλόκων

1.3.1. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Νανοσωματιδίων

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

Σε περιπτώσεις εγκλεισμού ενός οργανικού μορίου μέσα σε έναν φορέα είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα ή το ποσοστό της ουσίας που εγκλείστηκε αποτελεσματικά. Υπάρχουν άμεσοι και έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού.

Οι άμεσες μέθοδοι έχουν ως αρχή την εκχύλιση της εγκλεισμένης ουσίας και εν συνεχεία τον προσδιορισμό της ποσότητάς της. Συνήθως, χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες που διευκολύνουν την απελευθέρωσή της σε συνδυασμό με παροχή ενέργειας (ανάδευση, θέρμανση, υπέρηχοι κλπ.). Ανάλογα με την ένωση επιλέγεται και ο προσδιορισμός της στο τελικό διάλυμα, όπως για παράδειγμα η μέτρηση της απορρόφησής της με φασματοφωτομετρία UV-Vis και κατά συνέπεια ο υπολογισμός της συγκέντρωσής της.

Στις έμμεσες μεθόδους μετράται η ποσότητα της ουσίας που δεν εγκλείστηκε και έτσι, από την αρχική υπολογίζεται το ποσοστό εγκλεισμού. Αυτό μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους, όπως μέτρηση φθορισμού, χρωματογραφία, φασματοφωτομετρία κ.ά.⁴⁷⁻⁴⁸

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) είναι μία απλή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την περιγραφή κολλοειδών νανοσωματιδίων. Μέσω αυτής μπορεί να προσδιοριστούν τα μεγέθη των σωματιδίων, η διασπορά αυτών και η σταθερότητά τους. Η μέθοδος βασίζεται στη σκέδαση του φωτός, δηλαδή στην αλλαγή της κατεύθυνσης της διάδοσης του φωτός λόγω των ανομοιογενειών στο μέσο που διαδίδεται. Με τον όρο ανομοιογένειες στην προκειμένη περίπτωση, εννοούνται τα σωματίδια τα οποία υπάρχουν στο μέσο και θεωρούνται ως “εμπόδιο” για τη διάδοση του φωτός. Με το DLS μετρούνται τρία βασικά μεγέθη:

Μέγεθος των Σωματιδίων (size)

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των νανοσωματιδίων βασίζεται στη μέτρηση της κίνησης Brown. Το δείγμα ακτινοβολείται με laser και αναλύονται οι διακυμάνσεις της έντασης τους σκεδαζόμενου φωτός με τη βοήθεια ψηφιακού συσχετιστή. Πρόκειται για μία συσκευή της διάταξης που μετρά το βαθμό ομοιότητας δύο σημάτων σε συγκεκριμένο χρόνο.

Τα σωματίδια σε ένα διάλυμα κινούνται συνεχώς, λόγω της τυχαίας σύγκρουσης με τα μόρια του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικό της τυχαίας κίνησης Brown είναι ότι τα μικρότερα σωματίδια κινούνται πιο γρήγορα, ενώ τα μεγαλύτερα πιο αργά. Η εξίσωση Stokes-Einstein (1) περιγράφει τη συσχέτιση μεγέθους-ταχύτητας:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (1)$$

όπου D : ο συντελεστής διάχυσης, k : η σταθερά Boltzmann, T : η θερμοκρασία, η : το ιξώδες, R_H : η υδροδυναμική ακτίνα.

Ως υδροδυναμική ακτίνα ορίζεται η φαινομενική διάμετρος του σωματιδίου κατά τη διάχυσή του σε ένα υγρό μέσο.

Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων – Δείκτης Πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI)

Ύστερα από τον υπολογισμό των μεγεθών, και βάση της συνάρτησης συσχέτισης των σημάτων, προκύπτει η κατανομή των μεγεθών των NPs. Ο δείκτης PDI χρησιμοποιείται ως μέτρο ομοιογένειας ενός δείγματος με βάση τα μεγέθη. Συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα αδιάστατο στατιστικό μέγεθος που μετρά το εύρος της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων και παίρνει τιμές από 0 έως 1. Τιμές κοντά στο 0 εκφράζουν πλήρη ομοιογένεια του δείγματος, ενώ τιμές κοντά στο 1 λαμβάνουν τα δείγματα με πολυδιάσπαρτα σωματίδια. Οι τιμές στο εύρος 0,08-0,7 αφορούν το μέσο εύρος τιμών του PDI, ενώ είναι και η περιοχή όπου ο αλγόριθμος της κατανομής εφαρμόζεται με βέλτιστο τρόπο.

Δυναμικό ζ (zeta-potential, ζ-potential)

Το ζ-δυναμικό, ή αλλιώς ηλεκτροκινητικό δυναμικό, είναι το μέγεθος που περιγράφει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων. Ουσιαστικά, είναι το δυναμικό που αναπτύσσεται μεταξύ της επιφάνειας του νανοσωματιδίου και του διαλύτη, όταν εφαρμοσθεί στο σύστημα ηλεκτρικό πεδίο. Υπολογίζεται με την τεχνική «Ηλεκτροφόρησης Laser Doppler», όπου μετράται η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων, η οποία είναι ανάλογη του επιφανειακού τους φορτίου, της εφαρμοζόμενης τάσης, της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου και του ιξώδους.

Το ζ-δυναμικό είναι ένδειξη σταθερότητας του συστήματος, αφού πολύ μεγάλες απόλυτες τιμές έχουν ως αποτέλεσμα την απόθεση των σωματιδίων (σταθερά σωματίδια), ενώ τιμές κοντά στο μηδέν δείχνουν ότι υπάρχει τάση συσσωμάτωσης.

Το ζ-δυναμικό εξαρτάται από το pH και την αγωγιμότητα του διαλύματος, αλλά και τη συγκέντρωση ενός ορισμένου θεμελιώδους συστατικού στο δείγμα που μπορεί να προστίθεται για να προσαρμόσει τη σταθερότητα αυτού.⁴⁹

Προφίλ Απελευθέρωσης (Release Profile, RP)

Σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξετάζεται στα νανοσωματίδια είναι η απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας. Εξετάζεται, δηλαδή, αν η ουσία είναι εφικτό να απελευθερωθεί, υπό ποιες συνθήκες και με τι ρυθμό. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, τη θερμοκρασία, τη διαλυτότητα της δραστικής ουσίας αλλά και του συμπλόκου, τη διόγκωση του φορέα και από λοιπά φαινόμενα διάχυσης.

Για τη συγκεκριμένη μελέτη *in vitro*, πραγματοποιούνται πειράματα προσομοίωσης του περιβάλλοντος-στόχου των νανοσωματιδίων. Συνήθως, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα για προσαρμογή του pH, σταθερή θερμοκρασία και τυχόν άλλες παράμετροι. Η ποσοτικοποίηση της ουσίας που απελευθερώνεται μπορεί να πραγματοποιηθεί με φασματοφωτομετρία UV-Vis ή άλλη μέθοδο ανάλογα τα μόρια προς μελέτη.⁵⁰

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) είναι μία τεχνική απεικόνισης της επιφάνειας και της μορφολογίας των νανοσωματιδίων, που επιπλέον μπορεί να δώσει πληροφορίες για το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη στερεών δειγμάτων

και ανήκει στην κατηγορία της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Είναι μετεξέλιξη τόσο του οπτικού μικροσκοπίου όσο και του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (TEM). Συγκρινόμενη με την οπτική μικροσκοπία, έχει τα πλεονεκτήματα ότι φτάνει σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις, με τη δυνατότητα μεγαλύτερης ανάλυσης και ευκρίνειας.

Βασική αρχή της είναι η χρησιμοποίηση δέσμης ηλεκτρονίων, έναντι φωτονίων (οπτική μικροσκοπία) ώστε να φτάσει σε μεγαλύτερη ανάλυση μέχρι και 0,2 nm. Η διακριτική ικανότητα είναι ανάλογη του μήκους κύματος λ της δέσμης. Εκτός από τη δέσμη e^- , βασικός παράγοντας για την πραγματοποίηση των μετρήσεων είναι η εφαρμογή υψηλού κενού και η χρήση μεγεθυντικών φακών.

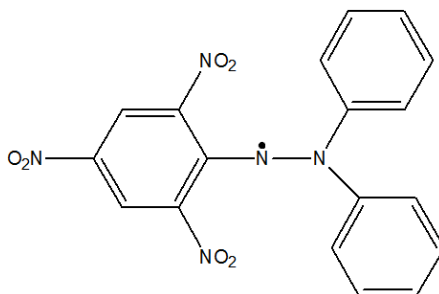
Μια ακτινοβολία ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος, τα οποία συγκρούονται ανελαστικά με τα άτομα/μόρια του υλικού. Τα πρωτογενή e^- , συγκεκριμένα, συγκρούονται με e^- των ατόμων/μορίων της επιφάνειας, εκτοπίζοντάς τα (δευτερογενή e^- , χαμηλής ενέργειας). Το σήμα αυτό είναι το πιο συνηθισμένο που ανιχνεύεται, αν και καταγράφονται και άλλες αλληλεπιδράσεις και οι αντίστοιχες ακτινοβολίες (οπισθοσκεδαζόμενα e^- , ακτίνες X). Για καλύτερη απεικόνιση, το δείγμα επικαλύπτεται αρχικά με ένα στρώμα χρυσού ή πλατίνας, ώστε να ενισχυθεί ο λόγος σήμα προς θόρυβο, άρα και η αντίθεση κατά την απεικόνιση.^{48, 51-52}

1.3.2. Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων με πιθανή φαρμακευτική χρήση είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται σε διάφορα βιολογικά συστήματα ή προσλαμβάνονται από το εξωτερικό περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές δυσλειτουργίες και κατ' επέκταση διάφορες ασθένειες. Τα αντιοξειδωτικά μόρια έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη διαδικασία παραγωγής των ριζών (στο στάδιο της έναρξης, της διάδοσης ή του τερματισμού), με αποτέλεσμα να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ή επέκτασης των βλαβών που προκαλούνται από αυτές.

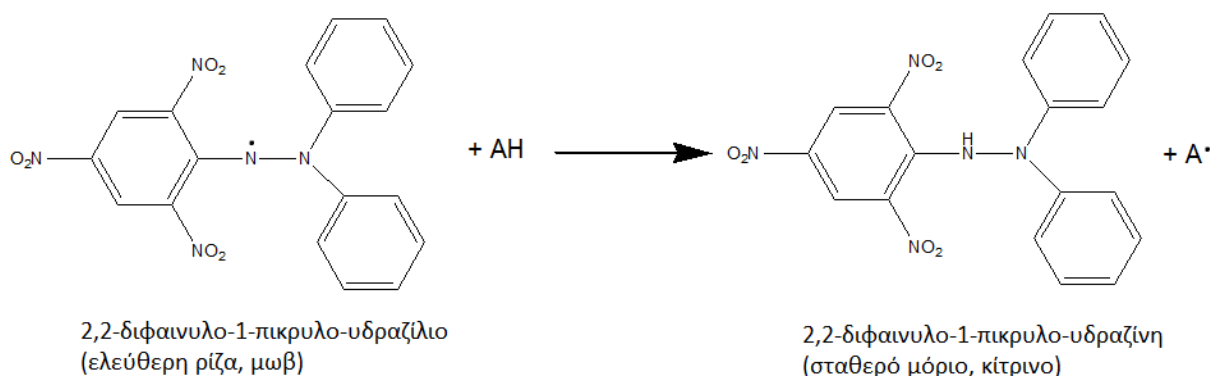
Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης ευρέως διαδεδομένη είναι η μέθοδος DPPH. Το μόριο 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζίλιο (DPPH), είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα με δομή:



Σχήμα 12: Δομή DPPH.

Στη μέθοδο DPPH, η οποία είναι μια χρωματομετρική μέθοδος, η ουσία προς εξέταση αναμιγνύεται με διάλυμα DPPH. Ο μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών (AH) στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι να μετατρέψουν το DPPH στην αντίστοιχη υδραζίνη

παραχωρώντας ένα άτομο υδρογόνου. Οι νέες ρίζες (A·) που προκύπτουν συχνά αντιδρούν μεταξύ τους και απενεργοποιούνται. Η αρχική ρίζα προκαλεί μωβ χρωματισμό του διαλύματος και ως αιθανολικό διάλυμα απορροφά έντονα στα περίπου 520nm. Αντίθετα, η υδραζίνη δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος και από τη διαφορά της απορρόφησης μπορεί να υπολογιστεί και η διαφορά στη συγκέντρωση, δηλαδή το ποσοστό της ρίζας που απενεργοποιήθηκε. Σε περίπτωση που όλη η ποσότητα DPPH αναχθεί, το διάλυμα γίνεται κίτρινο.



Σχήμα 13: Αντίδραση δέσμησης της ελεύθερης ρίζας του DPPH.

Για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται ο δείκτης IC₅₀, που εκφράζει τη συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται για να ανασταλεί η εξεταζόμενη βιολογική δράση κατά 50%. Η τιμή του εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης.⁵³

1.3.3. Μέθοδοι εκτίμησης της δομής και της στοιχειομετρίας

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

Η φασματοσκοπία NMR είναι από τις πιο χρήσιμες μεθόδους μελέτης της δομής οργανικών ενώσεων, το σχηματισμό ή την καταστροφή δεσμού και γενικά των αλληλεπιδράσεων των πυρήνων.

Πιο συγκεκριμένα, αφορά τις ιδιοπεριστροφές (spin) των πυρήνων. Απουσία μαγνητικού πεδίου, οι καταστάσεις spin των πυρήνων είναι εκφυλισμένες. Όταν, όμως, οι πυρήνες βρεθούν εντός μαγνητικού πεδίου αίρεται ο εκφυλισμός και συντονίζονται. Ο κάθε πυρήνας, όμως, περιβάλλεται από ηλεκτρόνια τα οποία τον προασπίζουν, δημιουργώντας γύρω του ένα αντιπαράλληλο μαγνητικό πεδίο. Συνεπώς, το πραγματικό μαγνητικό πεδίο που στην πράξη, “αισθάνεται” κάθε πυρήνας, είναι μειωμένο ανάλογα το ηλεκτρονιακό του περιβάλλον. Η απόκλιση από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο θα είναι διαφορετική, οπότε κάθε πυρήνας θα συντονίζεται σε διαφορετικές συχνότητες.

Οι κύριες παράμετροι που εξετάζονται σε ένα πείραμα NMR είναι η χημική μετατόπιση (δ, ppm), από όπου λαμβάνονται πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον του εξεταζόμενου μορίου ή συμπλόκου και η σταθερά σύζευξης, που παρέχει πληροφορίες για τις ευνοϊκές διαμορφώσεις τους. Επίσης, σε ¹H NMR, από την ολοκλήρωση των κορυφών εξάγονται

ποσοτικοποιημένα συμπεράσματα για τους πυρήνες του μορίου, ή τη στοιχειομετρία ενός συμπλόκου. Τέλος, με τη χρήση NMR 2D μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη χωρική εγγύτητα διαφόρων πυρήνων.

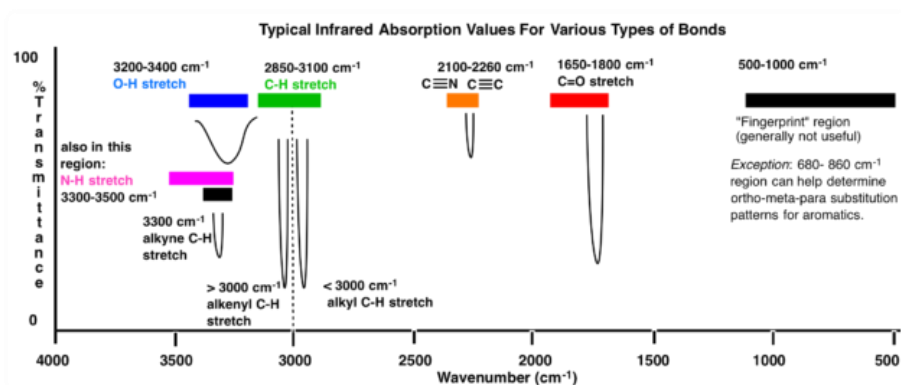
Στην πράξη, μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για ένα σύμπλοκο εγκλεισμού μέσω φασματοσκοπίας NMR, αφού σε έναν επιτυχημένο εγκλεισμό μεταβάλλεται το περιβάλλον ενός πυρήνα και άρα και η χημική του μετατόπιση. Επίσης, από το εμβαδό των κορυφών μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη στοιχειομετρία φορέα-εγκλεισμένης ουσίας ή και για το τμήμα της τελευταίας που είναι προστατευμένο μέσα στο φορέα.⁵⁴⁻⁵⁵

Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)

Το IR είναι άλλη μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη μελέτη οργανικών ενώσεων, ως μέρος των αναλύσεων της δομής των μορίων, με σκοπό την παρακολούθηση των χαρακτηριστικών ομάδων.

Η περιοχή του IR στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα έπεται της περιοχής του ορατού, και συγκεκριμένα στη φασματοσκοπία IR διερευνάται η περιοχή $2,5 \cdot 10^{-4} \text{cm} - 2,5 \cdot 10^{-3} \text{cm}$. Ουσιαστικά, σε αυτά τα μήκη κύματος ανιχνεύονται οι δονήσεις και οι κάμψεις των δεσμών. Κάθε συχνότητα που απορροφάται από το μόριο αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη μοριακή κίνηση και το σύνολο αυτών των κινήσεων των δεσμών αποτυπώνεται στο φάσμα IR.

Μια βασική κατανομή των δεσμών στην ηλεκτρομαγνητική περιοχή του IR φαίνεται παρακάτω:



Σχήμα 14: Κατανομή των δεσμών σε 4 κύριες περιοχές στην ηλεκτρομαγνητική περιοχή του IR.⁵⁶

Η τελευταία περιοχή συχνοτήτων από τα $\sim 1500 \text{cm}^{-1}$ μέχρι τα 500cm^{-1} ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος και εκεί εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε απλούς δεσμούς (εκτός αυτών με H).

Στη συγκεκριμένη εργασία, η χρήση των φασμάτων IR ενδείκνυται κυρίως για να παρακολουθούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των καθαρών ενώσεων. Σε περίπτωση, που δεν εμφανίζονται κορυφές συγκεκριμένων ομάδων, είναι μία ένδειξη εγκλεισμού του μορίου ή έστω του συγκεκριμένου τμήματος στο φορέα εγκλεισμού.⁵⁵

Φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR):

Οργανολογικά, η κωδικοποίηση επιτυγχάνεται με διαμοιρασμό της ακτινοβολίας της πηγής σε δύο δέσμες, των οποίων το μήκος της οπτικής διαδρομής μπορεί να μεταβάλλεται περιοδικά, ώστε να παραχθεί το συμβολόγραμμα. Τα δεδομένα επεξεργάζονται με μετασχηματισμό Fourier. Ο μετασχηματισμός Fourier μετασχηματίζει το σήμα που λαμβάνει στην περιοχή του χρόνου, σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων.

Η FT-IR απαριθμεί πολλά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής, ως προς την ακρίβεια, την ταχύτητα, τη μείωση του θορύβου, την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα.⁵²

Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση είναι μία μέθοδος εκτίμησης σταθερότητας του συμπλόκου και της δομής, ως προς την προστασία της εγκλεισμένης ένωσης. Ως γενική αρχή, είναι η παρατήρηση της μεταβολής της μάζας του δείγματος κατά την αύξηση, ή μείωση σπανιότερα, της θερμοκρασίας, σε ορισμένες συνθήκες.

Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα της ουσίας τοποθετείται σε θάλαμο συγκεκριμένης ατμόσφαιρας (π.χ. με ροή N₂), αρχικά συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου. Η θερμοκρασία αρχίζει να αυξάνεται με σταθερό ρυθμό και παρατηρείται η μεταβολή της μάζας του δείγματος ως προς τη θερμοκρασία και το χρόνο. Οι συνήθεις μεταβολές που παρατηρούνται είναι αρχικά η εξάτμιση του νερού ή άλλου διαλύτη και αργότερα η διάσπαση της ένωσης. Ανάλογα το δείγμα μπορούν να λαμβάνουν χώρα και άλλα φαινόμενα, όπως οξειδωση, πυρόλυση κ.ά.

Από τη διαφορά της θερμοκρασίας διάσπασης μιας ένωσης συμπλοκοποιημένης σε σχέση με αυτή της καθαρής ένωσης, μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των μορίων στο σύμπλοκο. Αν για παράδειγμα, η ένωση που πρόκειται να εγκλειστεί έχει προστατευθεί επιτυχημένα μέσα στο φορέα θα παρατηρηθεί και καθυστέρηση της διάσπασής της.⁵⁷

1.4. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

1.4.1. Σκοπός και χρήσεις

Τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία όσο και στον κλάδο της μηχανικής, γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη η σύνθεση υλικών, φαρμάκων, κ.ά. βασισμένη σε πειραματικό σχεδιασμό. Ως **πειραματικός σχεδιασμός** (DoE) εννοείται η ανάπτυξη κάποιου στατιστικού μοντέλου, βασισμένου σε πειραματικά αποτελέσματα, με σκοπό την οργάνωση και την ανάλυσή τους για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την επίδραση των παραγόντων στις αποκρίσεις που μελετώνται. Ως **παράγοντες** ορίζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές του συστήματος, ενώ οι **αποκρίσεις** είναι οι εξαρτημένες μεταβλητές των οποίων οι τιμές προσδιορίζονται. Η χρήση του DoE συνοψίζεται στο τρίπτυχο «Σχεδιασμός, Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση». Ταυτόχρονα, όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πρόβλεψη σημείων που δεν έχουν μελετηθεί πειραματικά. Η χρήση DoE, έχει ως βασικά πλεονεκτήματα την εξοικονόμηση χρόνου, κόπου και πόρων.

Στη νανοτεχνολογία συγκεκριμένα επιλέγεται ολοένα και περισσότερο η χρήση πειραματικού σχεδιασμού, ώστε να ελεγχθούν οι διαστάσεις των παραγόμενων υλικών και άλλες ιδιότητες τους, οι οποίες επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων. Είναι ένας σχετικά καινούριος κλάδος, που τώρα γνωρίζει ανάπτυξη και δεν έχουν εδραιωθεί ακόμα βελτιστοποιημένες συνθήκες παραγωγής.

Στην πράξη, μπορεί να κατασκευαστεί ένα μοντέλο όπου συμμετέχουν παραπάνω από μία ανεξάρτητες μεταβλητές. Το πλεονέκτημα έναντι της μελέτης ενός παράγοντα τη φορά, είναι ότι μπορούν να παρατηρηθούν και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να εξεταστούν ταυτόχρονα ως προς συγκεκριμένες αποκρίσεις και να εξαχθεί συμπέρασμα για το ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τη διεργασία και το τελικό αποτέλεσμα. Ο τρόπος που τα επηρεάζουν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσα από συναρτήσεις και τα αντίστοιχα γραφήματα.⁵⁸⁻⁶²

1.4.2. Πειραματική Διεργασία

Για την επιλογή του κατάλληλου σχεδιαστικού μοντέλου, πρέπει αρχικά να προσδιοριστεί το πρόβλημα και ο στόχος του πειράματος, καθώς και να επιλεγθούν οι κατάλληλοι παράγοντες (ανεξάρτητες μεταβλητές) και αποκρίσεις. Αφού συλλεχθούν αυτές οι πληροφορίες, μπορεί να σχεδιαστεί ο πειραματικός σχεδιασμός.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται μία σειρά πειραμάτων που πρέπει να πραγματοποιηθούν και να καταγραφούν τα αποτελέσματα των αποκρίσεων. Κάθε απόκριση αναλύεται και μελετάται ξεχωριστά και επιλέγεται το κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή της. Η ανάλυση γίνεται μέσω στατιστικής ανάλυσης διακυμάνσεων (Analysis of Variance, **ANOVA**).

Στη συνέχεια, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μερικά ακόμα πειράματα τυχαίων σημείων για την **επιβεβαίωση** του μοντέλου που επιλέχθηκε.

Τέλος, έχουν αναπτυχθεί κατάλληλα λογισμικά για τη διευκόλυνση της στατιστικής μελέτης, τα οποία ορίζουν τα απαραίτητα πειράματα και επεξεργάζονται τα αποτελέσματα.⁶²

1.4.3. Είδη Πειραματικού Σχεδιασμού

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπάρχουν διάφοροι τύποι DoE, και κάθε φορά επιλέγεται ο καταλληλότερος ανάλογα τις συνθήκες. Στη συγκεκριμένη ενότητα, θα αναφερθούν τα ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη, αλλά θα αναλυθούν οι υποκατηγορίες που σχετίζονται με την παρούσα εργασία.

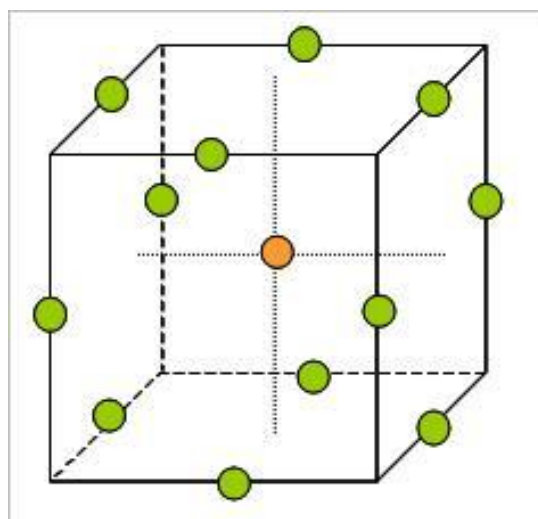
Οι δύο κυριότερες κατηγορίες σχεδιασμών είναι οι «Παραγοντικοί Σχεδιασμοί» και οι «Αποκριτικές Επιφάνειες», στο οποίο και βασίστηκε ο σχεδιασμός που χρησιμοποιήθηκε.

Αποκριτικές Επιφάνειες (Response Surface Methodologies, RSM)

Οι σχεδιασμοί Αποκριτικών Επιφανειών είναι μία συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών για την κατασκευή ενός εμπειρικού μοντέλου. Ποσοτικοποιούν τη σχέση των διαφόρων μεταβλητών μεταξύ τους, αλλά και με τις αποκρίσεις. Μπορούν να προσαρμόζουν τα δεδομένα σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού, ή άλλο μαθηματικό ή γεωμετρικό μοντέλο. Σημαντικές υποκατηγορίες των RSM, είναι οι «Κεντρικοί Σύνθετοι Σχεδιασμοί» και οι «Σχεδιασμοί Box-Behnken». ⁶³⁻⁶⁴

Σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD)

Ο σχεδιασμός Box-Behnken που ανήκει στις RSM, και είναι ίσως ο πιο διαδεδομένος από αυτές, αφού παράγει τις λιγότερες απαιτούμενες πειραματικές δοκιμές. Γενικά, είναι ένας σχεδιασμός τριών επιπέδων (ή στάθμεων, εναλλακτικά), με k ανεξάρτητες μεταβλητές (factors). Προκύπτει από το συνδυασμό 2^k παραγοντικών σχεδιασμών με ισορροπημένους μη πλήρεις σχεδιασμούς και για την κατασκευή του χρησιμοποιεί τα μέσα των ακμών που δημιουργούν τα επίπεδα των μεταβλητών (Σχήμα 15) . Παρέχει αξιόλογη πρόβλεψη για την περιοχή κοντά στο κεντρικό σημείο, αλλά ασθενέστερη για τις περιοχές κοντά στα ακραία σημεία. Πρόκειται για έναν περιστρεφόμενο, ή σχεδόν περιστρεφόμενο σχεδιασμό. Τέλος, είναι σφαιρικός σχεδιασμός και για αυτό το λόγο απαιτούνται από 3 έως 5 δοκιμές του κεντρικού σημείου. ⁶⁵



Σχήμα 15: Box-Behnken σχεδιασμός 3 επιπέδων, 3 μεταβλητών. ⁶⁶

Τα τρία επίπεδα συχνά συμβολίζονται με **-1, 0, +1** που αντιστοιχούν στη χαμηλότερη, τη μεσαία και την υψηλότερη τιμή της κάθε μεταβλητής. Οι τιμές -1, +1 είναι ισαπέχουσες από την τιμή 0. Ως «κεντρικό σημείο» ορίζεται αυτό που έχει τη συντεταγμένη 0 για κάθε μεταβλητή.

Στη συγκεκριμένη εργασία, κατασκευάστηκαν BBD της μορφής 3^3 , δηλαδή μελετήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση 3 μεταβλητών. Οι αποκρίσεις που εξετάστηκαν ήταν δύο κάθε φορά.⁶⁰

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Αντιδραστήρια

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών.

Αντιδρών	Προμηθευτής	Παρατηρήσεις
tyrosol	fluorochem	-
β-cyclodextrin	Fluka	Assay ≥99% (HPLC)
chitosan	TCI	5-20mPa·s, 0,5% in 0,5% Acetic Acid at 20°C
Polysorbate 80 (TWEEN 80)	Alfa Aesar	-
Sodium Tripolyphosphate (TPP)	ACROS ORGANICS	-
acetic acid	Carlo Erba Reagents	-
glutaraldehyde	PENTA	25%
HCl	Fisher Chemical	d=1,18 (~37%)
NaOH	Panreac	-
EtOH	PanReac-AppliChem	99,8%
H ₂ O	ΕΜΠ	απιονισμένο

2.2. Οργανολογία

Πίνακας 5: Οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα.

Μέτρηση-Ανάλυση	Όργανο	Λογισμικό Επεξεργασίας	Εργαστήριο
UV-Vis	V-770 UV/Vis/NIR	SpectraManage, JASCO	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
	Κυψελίδα: Χαλαζία		
NMR	Varian, 600 MHz	MestReNova	Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
FT-IR	Jasco FT-IR 4000	SpectraManager, JASCO	Τομέας Ι, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
DLS	Zetasizer Nano ZS, Malvern	Zetasizer 7.12, Malvern Instruments Ltd.	Γενικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
	Κυψελίδα: DTS1070		
TGA	TGA/DSC 1 STAR ^e System, Mettler Toledo	STAR ^e Software	Τεχνολογίας Πολυμερών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
SEM	PhenomWorld Desktop SEM, Phenom-World, Eindhoven	Phenom Pro Suite/ ParticleMetric	Φαρμακογνωσίας και Χημ. Φυσικών Προϊόντων, Φαρμακευτική, ΕΚΠΑ
Λουτρό υπερήχων	2210 Ultrasonic Bath, Branson	-	Οργανικής Χημείας, Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Πεχάμετρο	PH 127, XENON	-	Γενικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Φυγόκεντρος	3200, Zentrifuge	-	Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Υπερφυγόκεντρος	Optima LE-80K Ultracentrifuge, BECKMAN-COULTER	-	Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Λυοφιλοποιητής	Alpha RVC, Christ	-	Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Επίσης, για το σχεδιασμό μορίων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MDL ISIS/Draw 2.5 και το ChemDraw Ultra 7.0. Για την εξαγωγή του μοντέλου πρόβλεψης με πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design-Expert 12 (Stat-Ease Inc. – Trial Version).

Λοιπά σκεύη και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν: Ζυγός ακριβείας (μέχρι 110g, Explorer, OHAUS), ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g, M2P, Sartorius), περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Rotavapor R-114/ Waterbath B-480, Buchi), Γουδί (από γυαλί ή αχάτη), πεχαμετρικό χαρτί, πιπέτες μεταβλητού όγκου, μαγνητικός αναδευτήρας, θερμαντικός μανδύας, θερμομέτρο, ηθμός, χωνί Büchner, αντλία κενού, σφαιρικές φιάλες (μονόλαιμες, δίλαιμες), ψυκτήρας, μαγνήτες ανάδευσης, πλαστικές σύριγγες διαφόρων όγκων κ.ά.

2.3. Σύμπλοκα εγκλεισμού τυροσόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη (TYR-βCD)

2.3.1. Παρασκευή των Συμπλόκων

Για τον εγκλεισμό της τυροσόλης στην β-κυκλοδεξτρίνη ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές διεργασίες:

2.3.1.1. Μέθοδος της συγκαταβύθισης (co-precipitation method)

Η διεργασία παρασκευής των νανοσωματιδίων βασίστηκε στη μέθοδο που περιγράφεται στην εργασία των *Kotronia et.al.*³⁷

Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη προστίθεται η ποσότητα της βCD και 5mL διαλύτη. Το μείγμα θερμαίνεται στους 55°C υπό ανάδευση για περίπου 20 λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η ουσία προς εγκλεισμό (TYR) διαλύεται στον ελάχιστο όγκο διαλύτη (~1mL) και μεταφέρεται στη σφαιρική φιάλη. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 4h (r.t.) και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο (για ολονύκτια ψύξη) ώστε να καταβυθιστεί το σύμπλοκο. Μετά από 24h, το ίζημα απομονώνεται με διήθηση σε ηθμό (πορώδους 4), ξηραίνεται σε αντλία κενού και ζυγίζεται. Το τελικό προϊόν είναι λευκό στερεό σε μορφή σκόνης.

Σύμπλοκα ΚοΕ1, ΚοΕ39

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση με στοιχειομετρία TYR/βCD 1:1,2. Ως διαλύτης στη συγκεκριμένη διεργασία χρησιμοποιήθηκε το μείγμα H₂O/EtOH 2/1.

Πίνακας 6: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ1. Για τη σύνθεση του συμπλόκου ΚοΕ39 χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι διπλάσιες ποσότητες.

Αντιδραστήριο	MW	Ποσότητα	mmol	eq.
TYR	138,166	50,3 mg	0,364	1
β-CD	1134,98	500,2 mg	0,441	1,2
EtOH		~2mL		αναλογία
H ₂ O		~4mL		EtOH/H ₂ O 1/2

Σύμπλοκο ΚοΕ5

Η σύνθεση αυτή αφορούσε στοιχειομετρική αναλογία βCD:TYR 2:1. Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διεργασία με τις παραπάνω και επιτεύχθηκε η απομόνωση του προϊόντος μέσω διήθησης.

Πίνακας 7: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ5.

αντιδραστήριο	MW	ποσότητα (mg)	mmol	eq.
TYR	138,166	69,2	0,501	1
β-CD	1134,98	1136	1,00	2
EtOH				αναλογία
H ₂ O				EtOH/H ₂ O 1/2



Εικόνα 4: Παρασκευή συμπλόκου ΚοΕ39.

2.3.1.2. Μέθοδος λειοτρίβησης (kneading method)

Η δεύτερη συνθετική μέθοδος που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε σε στερεή φάση με τη χρήση γουδιού από αχάτη.⁶⁷

Σύμπλοκο ΚοΕ6

Πίνακας 8: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοΕ6.

Αντιδραστήριο	MW	Ποσότητα	mmol	εγ.
TYR	138,166	69,9mg	0,506	1
β-CD	1134,98	569,2 mg	0,502	1
EtOH				αναλογία
H ₂ O				EtOH/H ₂ O 3/7

Οι ποσότητες των στερεών ουσιών τοποθετούνται στο γουδί και ανακατεύονται με την προσθήκη σταγόνων διαλύτη, προκύπτοντας, έτσι, μία λευκή πάστα. Η κατεργασία διαρκεί για περίπου μισή ώρα, με προσθήκη επιπλέον σταγόνων διαλύτη όταν το μείγμα είναι αρκετά στεγνό. Ύστερα από 24h ξήρανσης σε αντλία κενού, το προϊόν ζυγίζεται. Το τελικό προϊόν είναι λευκό στερεό σε μορφή σκόνης.



Εικόνα 5: Παρασκευή συμπλόκου ΚοΕ6.

2.3.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-βCD

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

[επιφανειακός και συνολικός]

Χρησιμοποιήθηκε άμεση μέθοδος προσδιορισμού, με παροχή ενέργειας στο σύμπλοκο, τέτοια ώστε η εγκλεισμένη ουσία να αποδεσμευτεί και να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Για τον προσδιορισμό αυτό προηγήθηκε η κατασκευή καμπύλης αναφοράς της TYR, από πρότυπα διαλύματα σε διάφορες συγκεντρώσεις, με απορρόφηση στο διάστημα 0,1-1 (Παράρτημα 5.1).

Η συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για τα σύμπλοκα που προέκυψαν από τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, καθώς για τη μέθοδο της λειοτρίβησης η EE% θεωρείται κατά προσέγγιση 100%. Στη μέθοδο της λειοτρίβησης το προϊόν που παραλαμβάνεται δεν εκπλένεται και έτσι πρακτικά όλη η ποσότητα της TYR που έχει προστεθεί αρχικά παραμένει εκεί.

Η απόδοση εγκλεισμού για τα σύμπλοκα ΚοΕ1, ΚοΕ39 προσδιορίστηκε με δύο τρόπους.

Απλή ανάδευση

Ποσότητα του στερεού συμπλόκου ζυγίζεται και διαλύεται σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη. Το μείγμα αφήνεται για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, διηθείται σε φίλτρο 450nm και μετράται η απορρόφηση του διηθήματος (αραιωμένου) στο UV, εστιάζοντας στην κορυφή της TYR στα 222 nm. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές, με διαφοροποίηση στο διαλύτη και τη διάρκεια ανάδευσης. Αναλυτικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 19.

Με αυτόν τον τρόπο θεωρείται ότι αποχωρίζεται κυρίως η ποσότητα της ουσίας που αλληλεπιδρά με τη βCD εξωτερικά και είναι χαλαρά προσδεδεμένη σε αυτή (Απόδοση Επιφανειακού Εγκλεισμού).⁶⁸

Υπέρηχοι

Ακολουθείται αντίστοιχη πειραματική διαδικασία με αυτή που αναλύθηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι η ενέργεια που απαιτείται για να εξαναγκαστεί η TYR να εξέλθει από την κοιλότητα της βCD, να παρέχεται μέσω υπερήχων. Έτσι, το διάλυμα του συμπλόκου τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων, θερμοκρασίας ~60°C και στη συνέχεια διηθείται, αραιώνεται και τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) - Πίνακας 18.

Με αυτή τη διαδικασία, όλη η ποσότητα της εγκλεισμένης ουσίας θεωρείται ότι αποδεσμεύεται, τόσο από το εξωτερικό όσο και από το εσωτερικό της κοιλότητας (Απόδοση Συνολικού Εγκλεισμού).⁶⁸

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Τα νανοσωματίδια TYR-βCD που παρασκευάστηκαν μετρήθηκαν με DLS, ως προς το μέγεθός τους, το δείκτη πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) και το ζ-δυναμικό. Για τη διάλυση του προϊόντος χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό, και στη συνέχεια τοποθετείται στην κυψελίδα και μετρούνται τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Επιπλέον, εξετάστηκαν και τα διηθήματα, ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες (Standar Operation Procedure, SOP):

Πίνακας 9: Συνθήκες μέτρησης DLS.

Μέτρηση	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση	Θερμοκρασία	Χρόνος σταθεροποίησης	Διηλεκτρική Σταθερά
Μέγεθος	1,332	0,001	25°C	60sec	-
PDI					
ζ- δυναμικό	1,332	0,001	25°C	60sec	78,5

Προφίλ Απελευθέρωσης (Release Profile, RP)

Το προφίλ απελευθέρωσης μελετήθηκε για τα σύμπλοκα **KoE1** και **KoE6**, όπου παρακολούθηθηκε ο ρυθμός απελευθέρωσης της TYR από τη βCD.

Οι συνθήκες του πειράματος, με σκοπό να προσομοιάζουν το περιβάλλον του δέρματος, προσαρμόστηκαν σε T=37°C και pH=5,5. Για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 5,5 και τη διατήρησή του, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών K₂HPO₄/KH₂PO₄.

Σε 25mL ρυθμιστικού διαλύματος που βρίσκεται σε κωνική φιάλη, προστίθεται ποσότητα του δείγματος. Σε χρονική στιγμή t₀ λαμβάνονται 2mL από το διάλυμα και φυγοκεντρώνται (Φυγόκεντρος 3200-Zentrifuge, 3200 rpm, 2min) για την απομάκρυνση της βCD. Το υπερκείμενο υγρό απομονώνεται, αραιώνεται και καταγράφεται η απορρόφησή του. Στο υπόλοιπο διάλυμα, μετά από κάθε αφαίρεση όγκου προστίθεται ίση ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να μη μεταβάλλεται ο συνολικός όγκος. Η ίδια διαδικασία

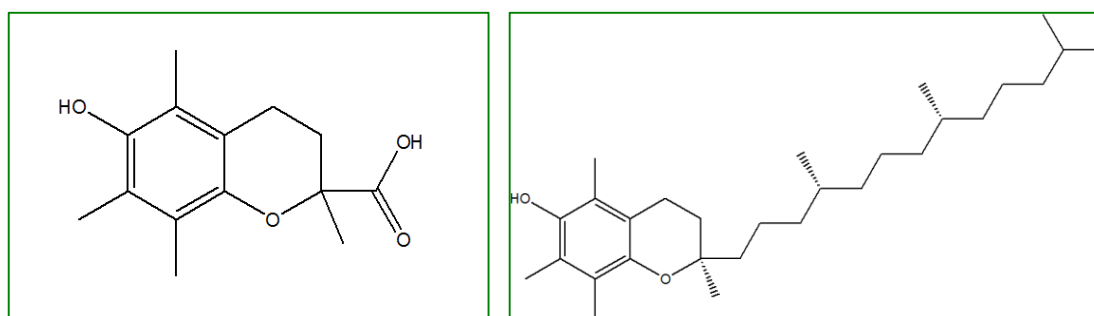
επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, με αφαίρεση 1mL διαλύματος, μέχρι τελικά να προκύψει το γράφημα του προφίλ απελευθέρωσης για κάθε δείγμα.

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Για την πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των νανοσωματιδίων, παρασκευάζεται διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης το οποίο προστίθεται σε διάλυμα DPPH.

Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάζεται διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 25mg/L σε διαλύτη EtOH καθώς και διάλυμα της ένωσης ή του συμπλόκου που πρόκειται να μετρηθεί – C₀ (η συγκέντρωση μεταβάλλεται σε κάθε περίπτωση ανάλογα τη διαλυτότητα και την αντιοξειδωτική δράση της ουσίας). Η αρχική απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 515nm μετράται σε χρόνο t₀, ώστε να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συγκέντρωσή του. Στη συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 3,9mL DPPH, καθώς και 100μL του δείγματος προς μέτρηση σε διαφορετική αραιώση κάθε φορά (Πίνακας 10). Τα τελικά διαλύματα αφήνονται σε σκοτεινό σημείο και μετράται η απορρόφησή τους σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στο ίδιο μήκος κύματος. Από την απορρόφηση μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση DPPH (από καμπύλη αναφοράς που έχει κατασκευαστεί) τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή και, συνεπώς, η μεταβολή της και το IC₅₀.

Μετρήθηκε επίσης και το IC₅₀ της ένωσης trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ), για συγκριτικούς σκοπούς. Το trolox είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, και συγκεκριμένα το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E.⁶⁹



Σχήμα 16: Δομή του Trolox (αριστερά) και της Βιταμίνη E (δεξιά).⁷⁰

Πίνακας 10: Συνθήκες πειράματος DPPH.

	TYR	KoE1	KoE6		trolox
C ₀ (g/L)	0,5	0,5	0,5	1,0	0,20
0,8C ₀ (g/L)	0,4	0,4	0,4	0,8	0,16
0,6C ₀ (g/L)	0,3	0,3	0,3	0,6	0,12
0,4C ₀ (g/L)	0,2	0,2	0,2	0,4	0,08
0,2C ₀ (g/L)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,04
διαλύτης	H ₂ O:EtOH 7:3	H ₂ O:EtOH 7:3	H ₂ O:EtOH 7:3		EtOH
t (min)	20/60/120	60	50	20/60/120	20/60/120

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Λήφθηκαν φάσματα των συμπλόκων καθώς και των αρχικών ενώσεων, τόσο σε D₂O όσο και σε DMSO-d₆. Σύγκριση των φασμάτων των TYR-βCD με αυτά των καθαρών ενώσεων, έχει ως σκοπό τη μελέτη των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, όπου θα μπορέσει να εκτιμηθεί αν η TYR εγκλείστηκε στο φορέα και πιθανόν να προσδιοριστεί ποιο τμήμα της συγκεκριμένα.

Στη συνέχεια, λήφθηκαν επιπλέον φάσματα για το σύμπλοκο **KoE6**, ύστερα από έκθεσή του σε υπερήχους για 20min και 40min, με σκοπό να παρατηρηθεί αν υπάρχει κάποια μετατόπιση κορυφής ή μεταβολή στην ολοκλήρωση, που θα οφείλονταν στην αποδέσμευση της TYR από τη βCD.

Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

Φάσματα FT-IR λήφθηκαν για την TYR, τη βCD και τα σύμπλοκα **KoE1**, **KoE6**, **KoE39**. Για τη μέτρηση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος δισκίων KBr. Και από αυτή τη μέθοδο μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη δομή του συμπλόκου, βασιζόμενα στο ποιες κορυφές από τις αρχικές ενώσεις εξακολουθούν να εμφανίζονται και ποιες μεταβάλλονται ή και εξαφανίζονται.

Μικρή ποσότητα από την κάθε ουσία ξηραίνεται καλά και λειοτριβείται μαζί με ποσότητα ξηρού KBr. Το ομοιογενές δίσκιο που παρασκευάζεται με τη χρήση πρέσας, τοποθετείται στο όργανο του FT-IR για την λήψη του αντίστοιχου φάσματος.

Θερμοβαρυστική ανάλυση (Thermogravimetric analysis, TGA)

Προκειμένου να εξαχθεί συμπέρασμα για την προστασία της TYR στην κοιλότητα της βCD, πραγματοποιήθηκε θερμοβαρυστική ανάλυση των καθαρών ενώσεων TYR και βCD και του συμπλόκου **KoE6**.

Σε αυτή τη μέθοδο ανάλυσης, η ουσία σε στερεή μορφή ζυγίζεται και τοποθετείται σε καψίδιο. Το δείγμα εναποτίθεται σε ζυγό μέσα στο όργανο σε αδρανή ατμόσφαιρα (N₂). Το δείγμα θερμαίνεται με σταθερό ρυθμό και υπολογίζεται η απώλεια μάζας του κατά την αποικοδόμησή του.

Πίνακας 11: Συνθήκες πειραμάτων TGA.

Δείγμα	Αρχική μάζα (mg)	T έναρξης (°C)	T λήξης (°C)	Ρυθμός Θέρμανσης (°C/min)
βCD	8,1300	25	600	10
TYR	5,0700	25	500	10
KoE6	15,8200	25	500	10

2.4. Εγκλεισμός της τυροσόλης στη χιτοζάνη (TYR-CS)

2.4.1. Παρασκευή των Νανοσωματιδίων

Για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων TYR-CS εφαρμόστηκε η μέθοδος της **ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης (ΙΠ)**.

Με σκοπό την βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιήθηκαν αρκετά **προκαταρκτικά πειράματα** μεταβάλλοντας τις συνθήκες ανάδευσης, χρόνου αντίδρασης, συγκέντρωσης των συστατικών, παρουσίας/συγκέντρωσης του **επιφανειοδραστικού παράγοντα (TWEEN 80)** και του **π παράγοντα διασταύρωσης (TPP)**. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων, μετρήθηκαν με το DLS το μέγεθος, το PDI και το ζ-δυναμικό τους. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο με τη βοήθεια του λογισμικού Design-Expert®, όπου μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της CS, της ποσότητας της TYR και της συγκέντρωσης του TPP στο μέγεθος, το PDI και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων. Η ταχύτητα ανάδευσης (στροφές/λεπτό, rpm), ο χρόνος αντίδρασης και η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα παρέμεναν σταθερά σε όλα τα πειράματα. Αφού ολοκληρώθηκαν οι δοκιμές που υπέδειξε το λογισμικό, πραγματοποιήθηκαν κάποια επιπλέον πειράματα ενδιάμεσων σημείων, με σκοπό την περαιτέρω βελτιστοποίηση του μοντέλου.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Διάλυμα CS:

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα CS επιθυμητής συγκέντρωσης σε οξικό οξύ (CH_3COOH) 1% v/v (συγκεντρώσεις 0,05-0,35% w/v). Το μείγμα αφήνεται για ανάδευση σε r.t. για μερικές ώρες ή ολονύκτια, μέχρι να διαλυθεί η CS. Παράλληλα, παρασκευάζεται διάλυμα Tween 5% w/v με απλά ανάδευση. Για το διάλυμα CS-Tween, υπολογίζεται η ποσότητα της CS που υπάρχει στο διάλυμα, και έπειτα υπολογίζεται ο όγκος του διαλύματος tween που αντιστοιχεί σε ίσα mg Tween με CS. Αφού, προστεθεί αυτός ο όγκος, η θερμοκρασία προσαρμόζεται στους 45°C και το μίγμα αναδεύεται για 2h, μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του.

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χωρίς Tween 80, παρασκευάστηκε αντίστοιχο διάλυμα CS, Επειδή ο όγκος tween που προστίθεται είναι πολύ μικρός, τυχόν διαφορά στη συγκέντρωση της CS θεωρείται αμελητέα.

Παρασκευή Νανοσωματιδίων:

Σε σφαιρική φιάλη (25mL) τοποθετείται διάλυμα CS (5mL) και προστίθεται η ποσότητα της ουσίας προς εγκλεισμό, σε στερεά μορφή. Σε χρόνο t_0 , αρχίζει να προστίθεται στάγδην το διάλυμα TPP. Μετά το πέρας της χρονικής διάρκειας που ορίζει το εκάστοτε πείραμα, η ανάδευση σταματά και το διάλυμα των νανοσωματιδίων μεταφέρεται σε φιαλίδιο. Τα νανοσωματίδια σε αυτή τη φάση παραμένουν σε διάλυμα. Συνήθως το διάλυμα είναι άχρωμο ή με μια ελαφριά άσπρη ή κίτρινη απόχρωση, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μεγάλων σωματιδίων καταβυθίζεται λευκό ίζημα. Παράλληλα παρασκευάστηκαν με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία και νανοσωματίδια CS χωρίς κάποια ουσία προς εγκλεισμό (blank), για συγκριτικούς σκοπούς.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ώστε να υπάρχει ακριβής επανάληψη των συνθηκών σύνθεσης, ώστε να μειωθούν τυχόν σφάλματα .

Απομόνωση Νανοσωματιδίων:

Σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε **φυγοκέντρηση** και **λυοφιλοποίηση** των νανοσωματιδίων. Σκοπός ήταν η λήψη αυτών σε καθαρότερη μορφή, απαλλαγμένα από διαλύτες, Tween και περίσσειας αντιδραστηρίων.

Το διάλυμα νανοσωματιδίων που έχει παραχθεί, αρχικά φυγοκεντρείται (30.000 rpm, 2×45min, 4°C), εκπλένεται και φυγοκεντρείται ξανά. Το τελικό διάλυμα λυοφιλοποιείται (0,065mbar, T=-53°C) και τελικά προκύπτει «κέικ» νανοσωματιδίων, λευκού χρώματος.



Εικόνα 6: Διάφορα «κέικ» CS NPs.

2.4.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-CS

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

Η απόδοση εγκλεισμού σε αυτά τα NPs προσδιορίζεται με έμμεσο τρόπο. Σε δείγματα που φυγοκεντρώνται, συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό ύστερα από κάθε φυγοκέντρηση, και σε αυτά μέσω απορρόφησης στο UV προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε TYR. Στη συνέχεια, ανάγεται η ποσότητα στο συνολικό δείγμα, και η διαφορά με την αρχική ποσότητα ισούται με την ποσότητα που εγκλείστηκε. Άρα:

$$EE\% = \frac{mg\ TYR\ (αρχικά) - mg\ TYR\ (ελεύθερα)}{mg\ TYR\ (αρχικά)} \quad (2)$$

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Τα νανοσωματίδια TYR-CS που παρασκευάστηκαν μετρήθηκαν με DLS, ως προς το μέγεθός τους, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό.

Για τη αραιώση του προϊόντος, ή διάλυση αν πρόκειται για τα στερεά νανοσωματίδια που προέκυψαν από τη φυγοκέντρηση, χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό, και στη συνέχεια τοποθετείται στην κυψελίδα και μετρούνται τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες (Standar Operation Procedure, SOP):

Πίνακας 12: Συνθήκες μέτρησης DLS.

Μέτρηση	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση	Θερμοκρασία	Χρόνος σταθεροποίησης	Διηλεκτρική Σταθερά
Μέγεθος PDI	1,332	0,003	25°C	120sec	-
ζ- δυναμικό	1,332	0,003	25°C	120sec	78,5

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Τα στερεά που προέκυψαν από τη λυοφιλοποίηση παρατηρήθηκαν με SEM, όπου τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζιο μικροσκόπιο σάρωσης με νήμα βολφραμίου (10 kV) και δειγματοφορέα μείωσης φορτίου.

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Στα νανοσωματίδια TYR-CS έγιναν πειράματα εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης σε στερεά δείγματα που απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση/λυοφιλοποίηση.

Τα δείγματα που είναι σε στερεή μορφή, διαλύονται σε ποσότητα CH₃COOH 1% v/v, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,2 g/L. Το αρχικό διάλυμα αραιώνεται άλλες 4 φορές και προστίθεται σε διάλυμα DPPH όπως προηγουμένως. Για λόγους σύγκρισης πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία και με CS-NPs, που έχουν προκύψει με την ίδια σειρά διεργασιών (C₀=0,25g/L). Οι χρόνοι μέτρησης ήταν: 30 και 90 min.

Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

Ακολουθήθηκαν 2 μεθοδολογίες για τη λήψη φασμάτων των CS-NPs, με τη χρήση KBr και στις 2 περιπτώσεις.

Αρχικά, δοκιμάστηκε η λήψη φάσματος με την προσθήκη 1 σταγόνας του προς μέτρηση δείγματος στο στερεό KBr. Το μείγμα λειοτριβείται, όπως και παραπάνω για την παρασκευή δισκίου, το οποίο και μετράται στο FT-IR. Εναλλακτικά, παρασκευάζονται δισκία με την προσθήκη ποσότητας στερεών («κέικ») νανοσωματιδίων. Παράλληλα, παρασκευάζονται και δισκία με κενά νανοσωματίδια CS (και με τις 2 τεχνικές).

2.5. Εγκλεισμός της τυροσόλης σε συνδυασμό φορέων (TYR-βCD/CS)

2.5.1. Παρασκευή των Νανοσωματιδίων

Ο εγκλεισμός της TYR σε συνδυασμό φορέων επιχειρήθηκε με δύο βασικές μεθοδολογίες. Η πρώτη αφορούσε τον αρχικό εγκλεισμό της TYR στη βCD και ακολούθως τον εγκλεισμό του συμπλόκου TYR-βCD στη CS. Εναλλακτικά, δοκιμάστηκε η χημική τροποποίηση της CS με μόρια βCD, όπου και στη συνέχεια εγκλείστηκε η TYR.

2.5.1.1. Διαδοχικός εγκλεισμός (coating) , TYR-βCD/CS

Παρασκευή Νανοσωματιδίων:

Για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων TYR-βCD/CS με διαδοχικό εγκλεισμό χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο **ΚοΕ6**.

Για τον εγκλεισμό του TYR-βCD στην CS εφαρμόστηκε και πάλι η μέθοδος της **ΙΠ**, ακολουθώντας την ίδια πειραματική διεργασία με τη σύνθεση των συμπλόκων TYR-CS (3.3.). Συνήθως το διάλυμα που προκύπτει είναι άχρωμο ή με μια ελαφριά λευκή ή κίτρινη απόχρωση, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μεγάλων σωματιδίων καταβυθίζεται λευκό ίζημα.

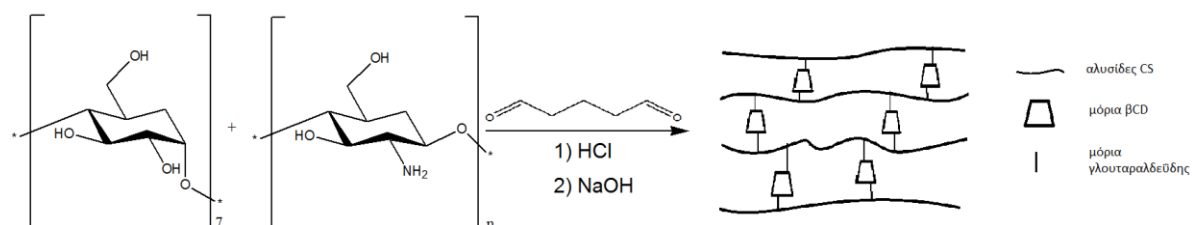
Απομόνωση Νανοσωματιδίων:

Για ορισμένα σύμπλοκα (κεντρικά σημεία του Πειραματικού Σχεδιασμού), πραγματοποιήθηκε απομόνωση μέσω υπερφυγοκέντρησης (30.000 rpm, 2×45min, 4°C) και λυοφιλοποίησης (0,065mbar, T=-53°C). Το τελικό προϊόν ήταν στη μορφή λευκού στερεού – «κέικ».

2.5.1.2. Εγκλεισμός TYR σε χημικά τροποποιημένη CS με βCD

Χημική τροποποίηση της CS με βCD με χρήση γλουταραλδεΐδης (glutaraldehyde, GL), (ΚοΕ81)

Σύνθεση τροποποιημένης χιτοζάνης, ΚοΕ81:



Σχήμα 17: Σύνθεση χημικά τροποποιημένης CS με τη χρήση GL.

Πίνακας 13: Πίνακας αντιδρώντων για τη σύνθεση συμπλόκου ΚοE81.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Συγκέντρωση/ Περιεκτικότητα
CS	0,25 g	
β-CD	1,50 g	
GL	0,625 mL	25%
HCl	30 mL	1M
NaOH	~30 mL	1M
EtOH	για έκπλυση	
H ₂ O		

Πειραματική Διεργασία⁷¹:

1,5g βCD και 0,25g CS προστίθενται σε υδατικό διάλυμα HCl (30mL, 1M), σε δίλιμη σφαιρική φιάλη (100mL). Το μείγμα αφήνεται για ανάδευση μέχρι να προκύψει ομογενές διάλυμα και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται στους 85°C. Μετά από μισή ώρα, προστίθεται η γλουταραλδεΐδη (0,625mL, 25%) και αφήνεται να αντιδράσουν για 1,5h, όπου προκύπτει κίτρινο διάλυμα. Ακολούθως, διάλυμα NaOH 1M προστίθεται μέχρι αύξησης του pH στο 8-9 (έλεγχος με πεχαμετρικό χαρτί), και η αντίδραση τερματίζεται μετά από 30min. Προκύπτει καφέ ίζημα, το οποίο συλλέγεται με διήθηση σε χωνί Buchner, εκπλένεται και ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Παρασκευή Νανοσωματιδίων:

Πραγματοποιήθηκε παρασκευή σωματιδίων με τη χρήση της τροποποιημένης CS ως φορέα για εγκλεισμό της TYR. Η διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε σε προηγούμενες παραγράφους. Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα **ΚοE81** σε CH₃COOH 1% v/v. Μετά την προσθήκη του επιφανειοδραστικού παράγοντα, το διάλυμα χρησιμοποιείται για την παρασκευή των σωματιδίων. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα TYR και στη συνέχεια TPP στάγδην. Σε μερικές περιπτώσεις προέκυψε καφέ ίζημα, ή θολό καφέ διάλυμα. Οι ποσότητες των αντιδρώντων βασίστηκαν στο DoE των άλλων νανοσωματιδίων, αλλά δε δημιουργήθηκε καινούριο μοντέλο για αυτόν το φορέα, για λόγους που θα αναλυθούν παρακάτω.

2.5.2. Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων TYR-βCD/CS

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

Η απόδοση εγκλεισμού μετρήθηκε μόνο για τα NPs που προέκυψαν από διαδοχικό εγκλεισμό. Η απόδοση εγκλεισμού προσδιορίστηκε με έμμεσο τρόπο, με μέτρηση της συγκέντρωσης TYR στο υπερκείμενο υγρό που συλλέγεται κατά τη φυγοκέντρηση.

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Τα νανοσωματίδια TYR-βCD/CS που παρασκευάστηκαν μετρήθηκαν με DLS, ως προς το μέγεθός τους, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες SOP με τις οποίες μετρήθηκαν τα σύμπλοκα TYR-CS.

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Τα «κείκ» που προέκυψαν από τη λυοφιλοποίηση παρατηρήθηκαν με SEM (μόνο δείγματα από το διαδοχικό εγκλεισμό), όπου τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζιο μικροσκόπιο σάρωσης με νήμα βολφραμίου (10 kV) και δειγματοφορέα μείωσης φορτίου.

Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Στα νανοσωματίδια TYR-βCD/CS έγιναν πειράματα εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, σε στερεά δείγματα που απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση/λυοφιλοποίηση.

Τα δείγματα διαλύονται σε ποσότητα CH₃COOH 1% v/v, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,25 g/L και αυτό αραιώνεται άλλες 4 φορές. Τα τελικά διαλύματα με DPPH παρασκευάζονται όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Οι χρόνοι μέτρησης ήταν: 30 και 90 min.

Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

Ακολουθήθηκαν δύο μεθοδολογίες για τη λήψη φασμάτων για τα NPs που αφορούν το διαδοχικό εγκλεισμό.

Θερμοβαρυστική ανάλυση (Thermogravimetric analysis, TGA)

Για να επιβεβαιωθεί ο εγκλεισμός του συμπλόκου TYR-βCD στο πλέγμα των αλυσίδων της CS, πραγματοποιήθηκε θερμοβαρυστική ανάλυση των καθαρών ή πρόδρομων ενώσεων και του συμπλόκου TYR-βCD/CS, που βρισκόταν σε μορφή στερεού. Μελετήθηκε, τέλος, και η mCS.

Χρησιμοποιήθηκε αδρανής ατμόσφαιρα (N₂) και οι παρακάτω συνθήκες:

Πίνακας 14: Συνθήκες πειραμάτων TGA.

Δείγμα	Αρχική μάζα (mg)	T έναρξης (°C)	T λήξης (°C)	Ρυθμός Θέρμανσης (°C/min)
CS (καθ. ουσία)	9,65	25	700	10
TYR-βCD/CS	2,32	25	700	10
mCS	27,56	25	600	10

2.6. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

2.6.1. TYR-CS

Ύστερα από τις προκαταρκτικές μελέτες, επιλέχθηκαν το κεντρικό σημείο και τα όρια των παραγόντων. Ως κεντρικό σημείο επιλέχθηκε για τη CS η συγκέντρωση **0,2%** και ως ακραία σημεία τα ισαπέχοντα **0,05%** και **0,35%**. Η ποσότητα του **TPP** επιλέχθηκε να είναι σε αναλογία **1:6 w/w** ως προς αυτή της CS. Για να μην επηρεάζεται η τελική συγκέντρωση των αντιδρώντων, από το TPP προστίθεται κάθε φορά όγκος 1mL αλλά διαφορετικής αρχικής συγκέντρωσης (κατά αντιστοιχία: 0,42g/L, 1,67g/L, 2,92g/L). Η ποσότητα της **TYR** αφορά την αναλογία **1:1 w/w** ως προς τη CS, για κάθε ένα σημείο. Τα επίπεδα των παραγόντων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 15: Συνθήκες, παράγοντες και αποκρίσεις για το DoE των TYR-CS NPs.

Παράγοντες	Επίπεδα			Αποκρίσεις	
	-1	0	+1	R ₁	μέγεθος (nm)
A CS (%)	0,05	0,20	0,35	R ₂	Z-δυναμικό (mV)
B TPP (mg)	0,42	1,67	2,92		
C TYR (mg)	2,5	10,0	17,5		
T=25°C, ταχύτητα ανάδευσης=700rpm, t=10min					

Πραγματοποιήθηκαν **17 πειράματα** σύμφωνα με το σχεδιασμό Box-Behnken, στα οποία περιλαμβανόταν 5 επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0,0,0). Στη συνέχεια, με σκοπό την επιβεβαίωση του μοντέλου, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον δοκιμές ενδιάμεσων σημείων εντός πειραματικού χώρου.

2.6.2. TYR-βCD/CS (coated)

Τα σημεία που επιλέχθηκαν ήταν τα ίδια με αυτά του προηγούμενου DoE, που αφορούσε τα TYR-CS NPs, για συγκριτικούς λόγους. Αναλυτικά φαίνονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Συνθήκες, παράγοντες και αποκρίσεις για το DoE των TYR-βCD/CS NPs.

Παράγοντες	Επίπεδα			Αποκρίσεις	
	-1	0	+1	R ₁	μέγεθος (nm)
A CS (%)	0,05	0,20	0,35	R ₂	Z-δυναμικό (mV)
B TPP (mg)	0,42	1,67	2,92		
C TYR-βCD (mg)	2,5	10,0	17,5		
T=25°C, ταχύτητα ανάδευσης=700rpm, t=10min					

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προήλθαν από το σχεδιασμό Box-Behnken, ενώ ακολούθησαν μερικές ακόμα δοκιμές επιβεβαίωσης και βελτιστοποίησης του μοντέλου.

3. Αποτελέσματα: ανάλυση και συζήτηση

3.1. Απόδοση Διεργασίας (Yield, α%)

Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται ως εξής:

$$\alpha\% = \frac{\text{ποσότητα προϊόντος (πραγματικά)}}{\text{ποσότητα προϊόντος (θεωρητικά)}} \times 100\% \quad (3)$$

Η ζύγιση αντιδρώντων και προϊόντων πραγματοποιείται 3 φορές και λαμβάνεται ο μέσος όρος τους.

Πίνακας 17: Απόδοση διεργασίας για τα διάφορα προϊόντα.

Προϊόν	TYR:βCD	α%
Μέθοδος Συγκαταβύθισης		
ΚοΕ1	1:1,2	43,70
ΚοΕ5	1:2	11,28
ΚοΕ39	1:1,2	34,7
Μέθοδος Λειοτριβήσης		
ΚοΕ6	1:1	89,4

Τα σύμπλοκα **ΚοΕ1** και **ΚοΕ39**, αν και έχουν ίδια στοιχειομετρία, παρουσιάζουν μια μικρή διαφορά στην απόδοση διεργασίας. Η ανακλιμάκωση της διεργασίας φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση.

Όσον αφορά την τροποποιημένη χιτοζάνη (**ΚοΕ81**), η απόδοση διεργασίας της σύνθεσης, υπολογίστηκε στο 13,9%.

3.2. Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

Σύμπλοκο εγκλεισμού TYR-βCD

Η μέτρηση απόδοσης εγκλεισμού για σύμπλοκα TYR-βCD, πραγματοποιήθηκε μόνο σε νανοσωματίδια που προέκυψαν από τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, και συγκεκριμένα στα **KoE1** και **KoE39**.

Η απόδοση εγκλεισμού αφορά την ποσότητα της ουσίας (TYR) που εγκλείστηκε σε σχέση με την αρχική ποσότητα ως αντιδρών (4), ενώ μπορούμε να μετρήσουμε και το loading capacity (LC), που σχετίζεται με την ποσότητα του συμπλόκου (5).

$$EE\% = \frac{mg\ TYR\ (εγκλεισμένα)}{mg\ TYR\ (αρχικά)} \quad (4) \quad LC\% = \frac{mg\ TYR\ (εγκλεισμένα)}{mg\ TYR-βCD\ (τελ.σύνμπλ.)} \quad (5)$$

Πίνακας 18: EE% και LC% για τα σύμπλοκα KoE1 και KoE39 σε διάφορες συνθήκες διεργασίας.

Δείγματα	Διεργασία	EE%	LC%
KoE1.1	20' ανάδευση, H ₂ O	9,5	2,0
KoE1.2	3d ανάδευση, H ₂ O	10,1	2,1
KoE1.3	20' υπέρηχοι, H ₂ O	11,5	2,4
KoE1.4	3d ανάδευση, H ₂ O:EtOH 7:3	14,2	3,0
KoE1.5	20' ανάδευση, H ₂ O:EtOH 7:3	16,2	3,4
KoE1.6	1d ανάδευση, H ₂ O:EtOH 7:3	11,5	2,4
KoE1.7	20' υπέρηχοι, H ₂ O:EtOH 7:3	11,8	2,5
KoE1.8	20' ανάδευση, H ₂ O:EtOH 7:3	12,1	2,5
KoE39.1	20' ανάδευση, H ₂ O:EtOH 7:3	14,0	1,8
KoE39.2	20' υπέρηχους, H ₂ O:EtOH 7:3	14,2	3,7

Όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω παροχής υψηλότερης ενέργειας, η χρήση υπέρηχων έχει σε γενικές γραμμές ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο EE%. Αν εξετάσουμε το EE% σε σχέση με τις συνθήκες διαλύτη, παρατηρούμε ότι με το H₂O έχουμε χαμηλότερες τιμές, ενώ υπάρχει μια γενική τάση αύξησης όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης το μίγμα H₂O:EtOH 7:3. Σε αυτήν την περίπτωση, όμως, οι τιμές μεταξύ των δύο μεθόδων (ανάδευση-υπέρηχοι) δε διαφοροποιούνται ιδιαίτερα. Αυτό είναι, ήδη, μία ένδειξη ότι η TYR πιθανόν να βρίσκεται σε μία ισορροπία μεταξύ της εσωτερικής κοιλότητας και του περιβάλλοντος, συγκρατούμενη με ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις.

Επίσης, κατά την παρασκευή του προϊόντος **KoE39**, παρατηρήθηκε μείωση της απόδοσης διεργασίας που πιθανόν να οφείλεται στην ανακλιμάκωση. Παρ' όλα αυτά, οι τιμές του EE% που προέκυψαν από το **KoE39** είναι αυξημένες σε σχέση με του **KoE1**.

Αν ληφθούν υπόψιν οι τιμές που αντιστοιχούν σε διεργασίες με απλή ανάδευση και διαλύτη το H₂O, μπορεί να υπολογιστεί ένας μέσος όρος που αφορά την ποσότητα TYR που βρίσκεται

συνδεδεμένη στην εξωτερική επιφάνεια της βCD . Αντίστοιχα λαμβάνοντας τις υπόλοιπες τιμές, μπορεί να εξαχθεί μέσος όρος για το συνολικό εγκλεισμό TYR στο σύμπλοκο.

Πίνακας 19: Μέση τιμή επιφανειακού και ολικού εγκλεισμού.

Μέση τιμή ΕΕ% επιφανειακής πρόσδεσης	9,8%
Μέση τιμή ΕΕ% συνολικού εγκλεισμού	13,2%

Σύμπλοκα TYR-CS και TYR-βCD/CS

Η ΕΕ% για τα σύμπλοκα της CS υπολογίστηκε εμμέσως. Κατά την κατεργασία για την απομόνωση των NPs, συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση και στο οποίο μετρήθηκε η συγκέντρωση της TYR, μέσω της απορρόφησης ($\lambda=221,4\text{nm}$). Αυτή η ποσότητα αφορά την TYR που δεν εγκλείστηκε στα CS NPs. Παρ' όλα αυτά, ενδέχεται, λόγω της φυγοκέντρησης σε έντονες συνθήκες, μέρος της TYR που αρχικά είχε εγκλειστεί να απελευθερώθηκε.

Πίνακας 20: ΕΕ% για τα CS NPs.

Δείγμα	mg TYR αρχικά	mg που εγκλείστηκαν	ΕΕ%
TYR-CS	30,5	2,14	7,0
TYR-βCD/CS (με ΚοΕ6)	3,28	0,11	3,3

Στα δείγματα που εγκλείστηκε το σύμπλοκο ΚοΕ39, δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστεί το ΕΕ%, λόγω του ότι εξαρχής δεν ήταν γνωστή η ποσότητα TYR που προστίθεται. Η προσπάθεια υπολογισμού του, μέσω του αρχικού ΕΕ% του ΚοΕ39 ήταν επισφαλής.

3.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Σύμπλοκα TYR-βCD

Πίνακας 21: Πίνακας αποτελεσμάτων DLS για τα σύμπλοκα TYR-βCD, όπου «μ.ό.» ο μέσος όρος του αντίστοιχου μεγέθους και «std» η τυπική απόκλιση.

σύμπλοκο (TYR:βCD)	μέγεθος (nm)	μ.ό.	std	PDI	μ.ό.	std	ζ-δυναμικό (mV)	μ.ό.	std
Μέθοδος Συγκαταβύθισης									
KoE1 (1:1,2)	521,3	483,1	33,2	0,544	0,457	0,076	-6,61	-5,95	1,78
	466,6			0,421			-3,93		
	461,4			0,405			-7,31		
KoE5 (1:2)	448,2	453,5	6,1	0,467	0,564	0,085	-18,0	-18,8	0,71
	452,1			0,607			-19,4		
	460,2			0,619			-18,9		
KoE39 (1:1,2)	526,8	490,5	101,2	0,568	0,520	0,107	-21,20	-20,87	1,72
	568,5			0,595			-19,00		
	376,2			0,398			-22,40		
Μέθοδος Λειοτρίβησης									
KoE6 (1:1)	495,4	478,1	16,2	0,476	0,494	0,026	-6,78	-7,18	1,43
	463,3			0,481			-8,77		
	475,7			0,524			-6,00		
KoE6 (4 μήνες μετά)	695,2	753,4	100,5	0,511	0,662	0,150	-3,97	-4,51	0,49
	695,6			0,810			-4,62		
	869,4			0,665			-4,93		

Σύμφωνα με τον Πίνακα 21, τα **KoE1** και **KoE39** αν και έχουν διαφορές σε άλλες μετρήσεις λόγω ανακλιμάκωσης, τα μεγέθη των NPs και τα αντίστοιχα PDI είναι συγκρίσιμα. Δεν ισχύει, όμως, το ίδιο για το ζ-δυναμικό. Φαίνεται πως η υδατική διασπορά του KoE39 είναι αρκετά πιο σταθερή (ζ-δυναμικό -20,87mV),.

Το **KoE5** εμφανίζει μεγέθη παρόμοια με αυτά των **KoE1**, **KoE39**. Φαίνεται, δηλαδή, ότι η αύξηση της στοιχειομετρίας βCD:TYR δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, το PDI και το ζ-δυναμικό.

Το σύμπλοκο **KoE6**, που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της λειοτρίβησης, εμφανίζει παρόμοιες τιμές μεγέθους PDI και ζ-δυναμικού με το KoE1 (που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης). Μέτρηση DLS της υδατικής διασποράς του KoE6 λήφθηκε και περίπου 4 μήνες μετά την παρασκευή του. Σε αυτή την περίπτωση τα μεγέθη και η κατανομή τους είχαν αυξηθεί αισθητά, γεγονός που υποδεικνύει ότι έχει συμβεί συσσωμάτωση, φαινόμενο που είναι αναμενόμενο σε υδατικές διασπορές κυκλοδεξτρίνης.

Σύμπλοκα TYR-CS, TYR-βCD/CS

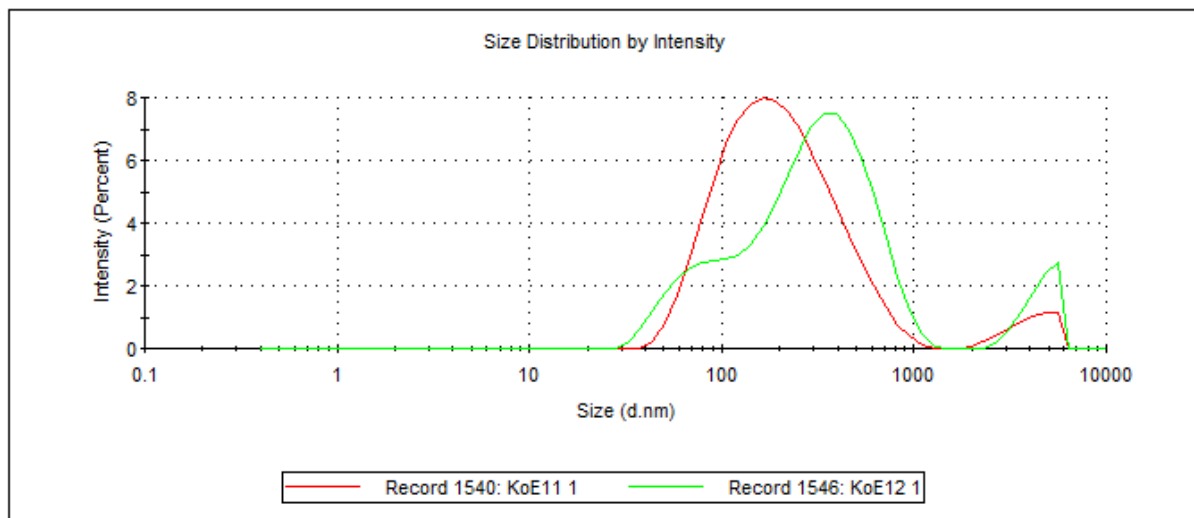
Σε αυτή την παράγραφο θα αναφερθούν μερικά γενικά συμπεράσματα των προκαταρκτικών δοκιμών, γενικές παρατηρήσεις και αποτελέσματα που αφορούν τα υλικά που απομονώθηκαν με υπερφυγοκέντρηση / λυοφιλοποίηση.

Συγκέντρωση CS

Τα διαλύματα CS που παρασκευάστηκαν ήταν συγκεντρώσεων **0,05%** έως **0,35% w/v**. Διαλύματα υψηλότερων συγκεντρώσεων δεν είναι δυνατόν να παρασκευαστούν λόγω χαμηλής διαλυτότητας. Σε συγκέντρωση, όμως, **~3% w/v** η CS παρουσιάζει μία ιδιομορφία, και μπορεί να διαλυτοποιηθεί, σχηματίζοντας ένα κίτρινο διάλυμα αυξημένου ιξώδους, **ζελατινώδους μορφής**. Η ιδιαιτερότητα αυτή οφείλεται στην επίδραση μη κοινού ιόντος (diverse salt effect), κατά τη διάλυση της CS στο οξικό διάλυμα. Ουσιαστικά, δεν πρόκειται για κανονική διαλυτοποίηση, αλλά την συσσωμάτωση των αλυσίδων δημιουργώντας ένα τζελ αντί για ίζημα.⁷²⁻⁷³ Στην παρούσα έρευνα, πραγματοποιήθηκαν μερικές δοκιμές με αυτή τη σύσταση, χωρίς, όμως, να μελετηθεί διεξοδικά.

Επίδραση επιφανειοδραστικού παράγοντα (TWEEN 80)

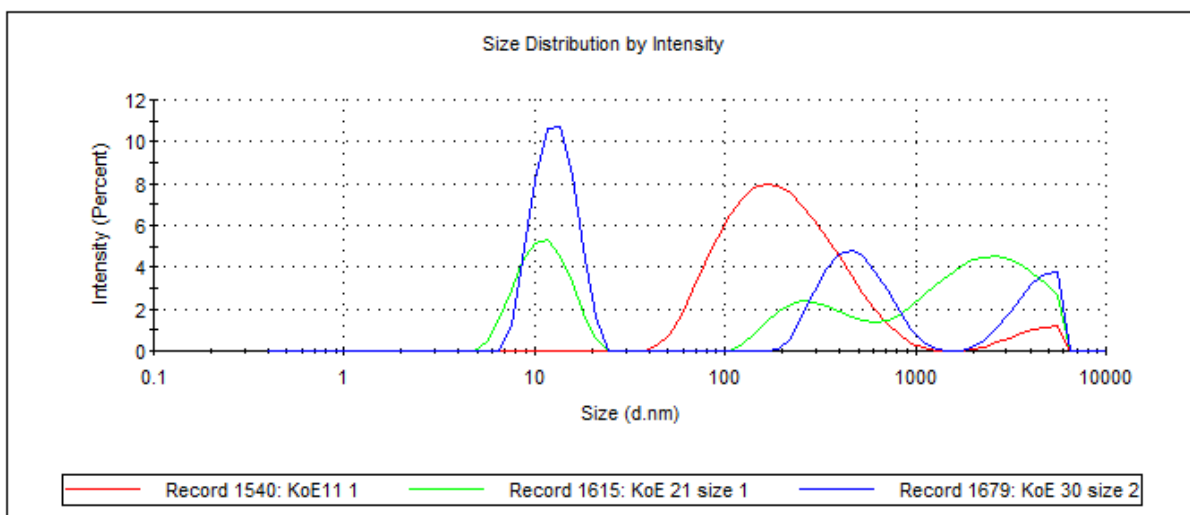
Χωρίς την προσθήκη TWEEN 80, οι κορυφές παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανομοιομορφία και μεγαλύτερα μεγέθη. Συνεπώς, τα τελικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με **προσθήκη TWEEN 80**.



Διάγραμμα 1: Επίδραση επιφανειοδραστικού παράγοντα. DLS μέτρησης μεγέθους νανοσωματιδίων με (κόκκινο) και χωρίς TWEEN (πράσινο).

Παράγοντας διασταύρωσης (TPP)

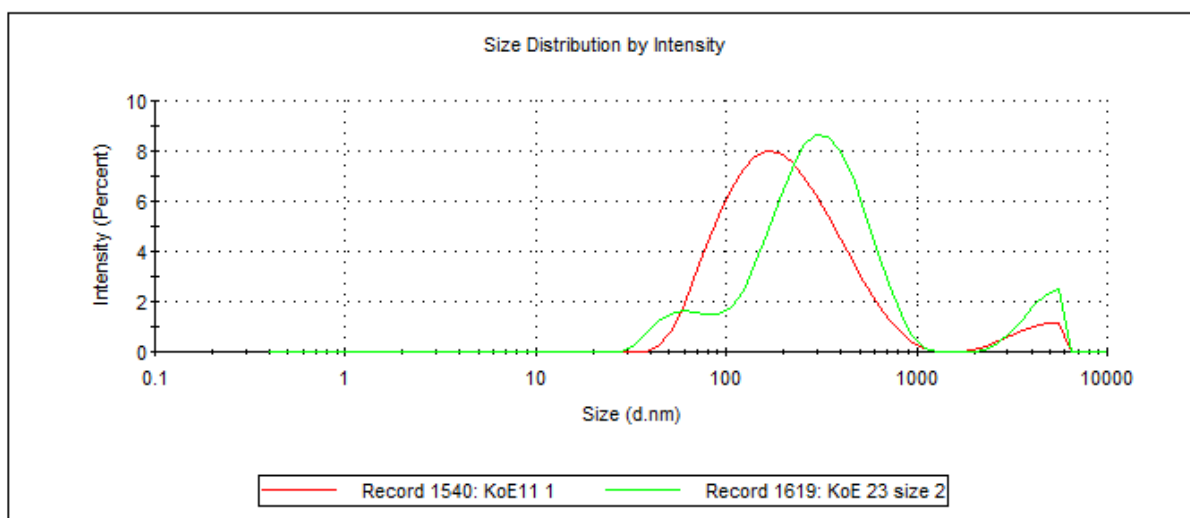
Απουσία του παράγοντα TPP, σε κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης, τα σωματίδια που υπάρχουν δεν παρουσιάζουν ομοιομορφία ως προς το μέγεθος, και πιθανόν να μην είναι σταθερά. Όταν επιχειρήθηκε να προστεθεί TYR απουσία TPP και μετρήθηκε το μέγεθος, εμφανίστηκαν 3 οικογένειες κορυφών, εκ των οποίων η μία σε πολύ μικρά μεγέθη. Γενικά, και λόγω δομής, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η **TYR** μπορεί να παίξει μερικώς το ρόλο του TPP, **συγκρατώντας τις αλυσίδες με δεσμούς Η**. Παρ' όλα αυτά, η δράση της δεν επαρκεί και είναι απαραίτητη η **προσθήκη του παράγοντα TPP**.



Διάγραμμα 2: Επίδραση TPP και TYR ως παράγοντες διασταύρωσης. Σύγκριση δειγμάτων με προσθήκη TPP (κόκκινο), με προσθήκη TYR αντί TPP (μπλε) και χωρίς προσθήκη παράγοντα διασταύρωσης (πράσινο).

Χρόνος

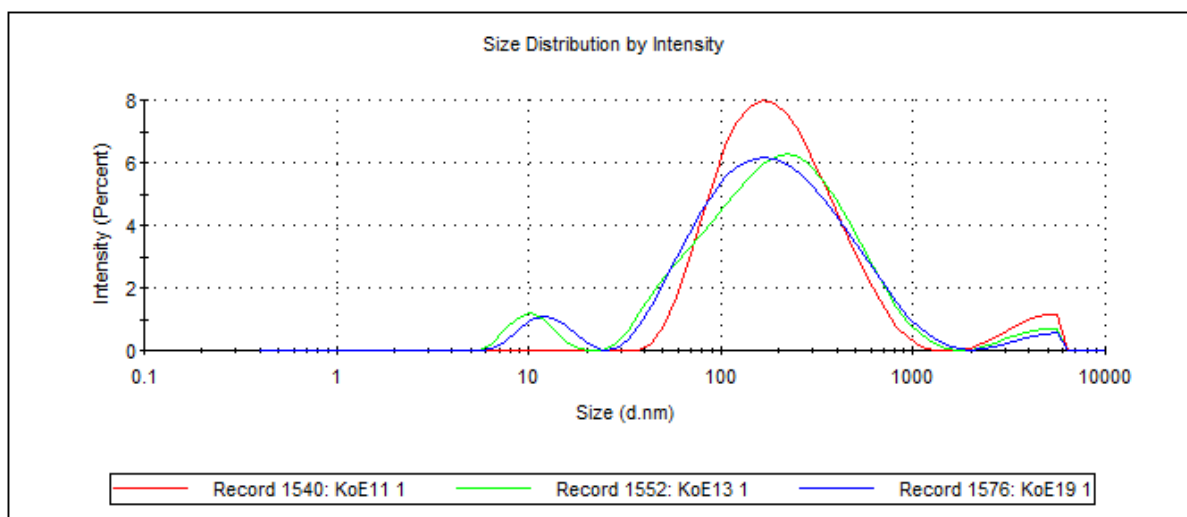
Πραγματοποιώντας πειράματα με τις ίδιες συνθήκες αλλά για διαφορετικό χρόνο, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκε αισθητά το μέγεθος των σωματιδίων όταν διπλασιάστηκε ο χρόνος από τα 10 στα 20min.



Διάγραμμα 3: Επίδραση χρόνου στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Σύγκριση δειγμάτων που προέκυψαν από ανάδευση 10min (κόκκινο) και 20min (πράσινο).

Ταχύτητα ανάδευσης

Η ταχύτητα ανάδευσης φάνηκε να επηρεάζει το μέγεθος των NPs αλλά όχι πολύ σημαντικά. Έγιναν δοκιμές στα 300, 700 και 1100 rpm. Αυξάνοντας την ταχύτητα από τα 300rpm, εμφανίστηκε και μια ομάδα μικρότερου μεγέθους, όχι, όμως, σε σημαντικό ποσοστό. Η μεγαλύτερη ταχύτητα (1100 rpm) προκαλούσε συχνά προβλήματα στην ομοιογένεια της ανάδευσης. Τελικά, επιλέχθηκε η μεσαία ταχύτητα ως βέλτιστη.



Διάγραμμα 4: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης στο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Σύγκριση δειγμάτων που προέκυψαν από ανάδευση με 300rpm (κόκκινο), 700rpm (μπλε) και 1100rpm (πράσινο).

Μαγνήτης ανάδευσης

Συγκρίθηκαν μαγνήτες δύο διαφορετικών μεγεθών, οι οποίοι παρουσίαζαν διαφορές στα αποτελέσματα. Επιλέχθηκε ο μικρότερος, με διαστάσεις 0,5x1cm.

Δοκιμές Απομόνωσης

Πραγματοποιήθηκαν ορισμένες δοκιμές απομόνωσης των NPs. Στους παρακάτω πίνακες, όλα τα δείγματα αφορούν τις **συνθήκες των κεντρικών σημείων** του πειραματικού σχεδιασμού (0,2% CS, 1,67mg TPP, 10mg TYR ή ΚοΕ6 – βλ. §2.6.1, 2.6.2), αλλά σε ανακλιμάκωση (2x και 3x αντίστοιχα).

Πίνακας 22: 1^η σειρά πειραμάτων: Αποτελέσματα DLS πριν και μετά την υπερφυγόκεντρο (ανακλιμάκωση 2x από συνήθεις συνθήκες).

Δείγμα	Πριν τη φυγοκέντρηση			Μετά τη φυγοκέντρηση		
	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)
CS (blank)	152,4	0,365	33,0	370,5	0,352	-0,139
TYR-CS	220,3	0,418	35,8	228,5	0,353	48,5
TYR-βCD/CS	391,9	0,538	28,5	218,2	0,313	50,6
TYR-CS (pH=5,0)	512,8	0,496	30,7	171,6	0,465	34,4

Στον παραπάνω πίνακα αναφέρονται τα μέσα μεγέθη των μετρήσεων. Για τα CS NPs χωρίς εγκλεισμένη ουσία, μετρήθηκαν επίσης και το υπερκείμενο υγρό μετά την πρώτη φυγοκέντρηση και το στερεό που προέκυψε μετά τη λυοφιλοποίηση (Πίνακας 23)

Πίνακας 23: Αποτελέσματα DLS για CS NPs (blank) στο υπερκείμενο υγρό και στο «κέικ».

Δείγμα	Υπερκείμενο υγρό			Μετά τη λυοφιλοποίηση		
	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)
CS (blank)	92,27	0,585	16,4	644,2	0,402	6,62

Αν και απομονώθηκε, εν τέλει, ποσότητα των NPs, δεν κατάφεραν να συλληχθούν νανοσωματίδια σε διαστάσεις μικρότερες των 100 nm. Από τα παραπάνω δείγματα, μόνο τα CS NPs (blank) αυξήθηκαν αισθητά σε **μέγεθος**. Το δείγμα TYR-CS θεωρητικά αυξήθηκε σε μέγεθος, αλλά η διαφορά είναι πολύ μικρή που θα μπορούσε να οφείλεται σε τυχαία σφάλματα, οπότε θα θεωρηθεί σταθερό το μέγεθος. Τα άλλα δύο δείγματα εμφάνισαν αισθητή μείωση μεγέθους μετά τη φυγοκέντρηση. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η TYR ενδεχομένως, να έχει παρόμοια δράση με το TPP, και έστω και ασθενέστερα μπορεί να παίζει το ρόλο του C-L. Από τις παραπάνω μετρήσεις θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί αυτός ο ισχυρισμός. Παράλληλα, και η βCD λόγω δεσμών H που μπορεί να σχηματίζει μέσω των υδροξυλομάδων, βοηθάει στη συγκράτηση των αλυσίδων CS. Επίσης, το φορτίο των βCD NPs είναι αρνητικό οπότε δημιουργούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και της κατιοντικής CS, που συγκρατούν ισχυρά τα επιμέρους μόρια ή τμήματα αυτών, και έτσι το μέγεθος τους παραμένει σταθερό ή/και μειώνεται.

Σε όλες τις περιπτώσεις ο δείκτης **PDI** μειώθηκε, και άρα τα σωματίδια εμφανίζουν πιο ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται και στην απομάκρυνση των πολύ μικρών σωματιδίων.

Το αυξημένο **pH** επηρέασε ιδιαίτερα το μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων στο αρχικό διάλυμα. Παρ' όλα αυτά, μετά την έκπλυση τα μεγέθη μειώθηκαν, και η τελική τιμή ήταν μικρότερη από αυτή των TYR-CS NPs σε πιο όξινο pH. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με το ζ-δυναμικό, όπου η τιμή του ήταν χαμηλότερη στο διάλυμα με pH=5,0. Και στα δύο δείγματα αυξήθηκε μετά την έκπλυση κατά τις φυγοκεντρήσεις, αλλά δεν επηρεάστηκε όσο το μέγεθος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δεύτερη σειρά πειραμάτων, όπου δεν επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις DLS μετά τις διεργασίες απομόνωσης. Μετρήθηκαν τα δείγματα στο DLS μόνο κατά την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά δόθηκε βάρος σε άλλες μελέτες αυτών. Παρ' όλα αυτά θα ακολουθήσει ένας σύντομος σχολιασμός.

Πίνακας 24: 2^η σειρά πειραμάτων: Αποτελέσματα DLS πριν την υπερφυγόκεντρο (ανακλιμάκωση 3× από συνήθεις συνθήκες).

Δείγμα	Πριν τη φυγοκέντρηση		
	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)
CS (blank)	159,4	0,282	38,4
TYR-CS	246,0	0,556	24,0
TYR-βCD/CS (με ΚοΕ6)	162,2	0,416	31,7
TYR-βCD/CS (με ΚοΕ39)	214,8	0,448	40,7

Τα δύο σύμπλοκα TYR-βCD/CS παρουσιάζουν μια μικρή διαφορά μεγέθους, που μπορεί και να οφείλεται στην ήδη υπάρχουσα διαφορά του **KoE39** με το **KoE6**. Σε σχέση με την πρώτη σειρά μετρήσεων το σύμπλοκο TYR-CS εμφανίζει αρκετά μεγαλύτερο μέγεθος. Ενδεχομένως οφείλεται στην 3× ανακλιμάκωση ή σε κάποιο πειραματικό σφάλμα. Αντιθέτως, το σύμπλοκο KoE6-CS εμφανίζει αρκετά μικρότερα μεγέθη. Αν συγκρίνουμε αυτά τα δεδομένα, με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το DoE, ένα πιθανό συμπέρασμα είναι ότι δεν υπάρχει καλή επαναληψιμότητα για το συγκεκριμένο σύμπλοκο (ανεξάρτητα των πειραματικών σφαλμάτων). Αντίθετα, τα κενά CS NPs εμφανίζουν καλή επαναληψιμότητα. Το PDI και το ζ-δυναμικό δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διακυμάνσεις.

Πίνακας 25: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS κυρίως δειγμάτων.

Δείγμα	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)
βCD	564,9	0,427	-1,16
CS (blank)	159,4	0,282	38,4
KoE1	483,1	0,457	-5,95
KoE39	490,5	0,520	-20,87
KoE6	478,1	0,494	-7,18
TYR-CS*	143,5	0,432	37,0
TYR-βCD/CS* (με KoE6)	190,5	0,521	22,9
TYR-βCD/CS (με KoE39)	214,8	0,448	40,7
TYR-βCD/mCS	807,2	0,698	24,8

* Για τα δείγματα αυτά λήφθηκαν οι μέσοι όροι από τις μετρήσεις του DoE.

Από τον πίνακα φαίνεται ότι σε κάθε περίπτωση εγκλεισμού TYR στην βCD, το μέγεθός της μειώνεται, σε σχέση με την καθαρή ένωση. Όπως εξηγήθηκε και παραπάνω, η TYR αλληλεπιδρά με τη βCD, και συγκρατεί γύρω της τα μόριά της. Στην περίπτωση που η TYR βρισκόταν μόνο εξωτερικά της βCD, τα συσσωματώματα που θα προέκυπταν θα ήταν πιο μεγάλα από αυτά της σκέτης βCD, αφού ουσιαστικά η TYR θα έμπαινε ενδιάμεσα στα μόρια της βCD, με αποτέλεσμα να μεγαλώνουν οι αποστάσεις. Συνεπώς, είναι αρκετά πιθανόν η TYR να βρίσκεται όντως εσωτερικά της κοιλότητας της βCD.

Αντίστοιχα, στην περίπτωση των συμπλόκων **TYR-CS**, παρατηρείται πάλι μείωση μεγέθους σε σχέση με αυτό του φορέα. Όταν εγκλειστεί το σύμπλοκο **TYR-βCD** ανάμεσα στις αλυσίδες της CS, δεν σχηματίζονται μικρότερα σωματίδια από τα CS (blank). Παρ' όλα αυτά είναι αρκετά μικρά, και αρκετά μικρότερα από τα αντίστοιχα σύμπλοκα TYR-βCD. Η εξήγηση είναι αντίστοιχη με αυτή που αφορά τα σύμπλοκα TYR-βCD και εξηγήθηκε παραπάνω.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και πείραμα εγκλεισμού TYR στην τροποποιημένη CS (**CS/GI/βCD**). Σε αυτήν την περίπτωση τα υλικά που σχηματίστηκαν ήταν αρκετά μεγαλύτερα (Πίνακας 26). Ενδεχομένως, όμως, αυτό το γεγονός να μην οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις των μορίων και το μη ικανοποιητικό βαθμό σύμπλεξης, αλλά στη διαλυτότητα της mCS. Η mCS παρουσίαζε δυσκολίες στη διαλυτοποίηση ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι δυσκολίες διαλυτοποίησης μπορεί να οφείλονται τόσο στη φύση της γλουταραλδεϋδης, όσο και στο ενδεχόμενο τμήματα των αλυσίδων της CS να ενώθηκαν μεταξύ τους μέσω αυτής. Η

GL είναι ένας παράγοντας που συνδέει ομοιοπολικά μόρια ή τμήματα μορίων, και όχι με ιοντικούς δεσμούς, όπως το TPP. Λόγω των παραπάνω δυσκολιών, το μόριο mCS δε μελετήθηκε εκτενώς στα σύμπλοκα.

Πίνακας 26: Πειράματα της mCS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα DLS.

δείγμα	CS % w/v	TPP (mg)	TYR (mg)	μέγεθος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό
KoE87*	0,20 (χωρίς TWEEN)	1,67	10,0	447,1	0,444	24,5
KoE89*	0,20	1,67	10,0	807,2	0,698	25,3
KoE92	0,20	0,42	10,0	566,3	0,763	27,6
KoE104*	0,05	0,42	10,0	149,7	0,242	13,1
KoE105*	0,05	1,67	17,5	132,0	0,782	3,57

* Τα δείγματα αυτά μετρήθηκαν είτε μετά από διήθηση, είτε λαμβάνοντας μόνο το υπερκείμενο υγρό, λόγω μεγάλης ποσότητας ιζήματος.

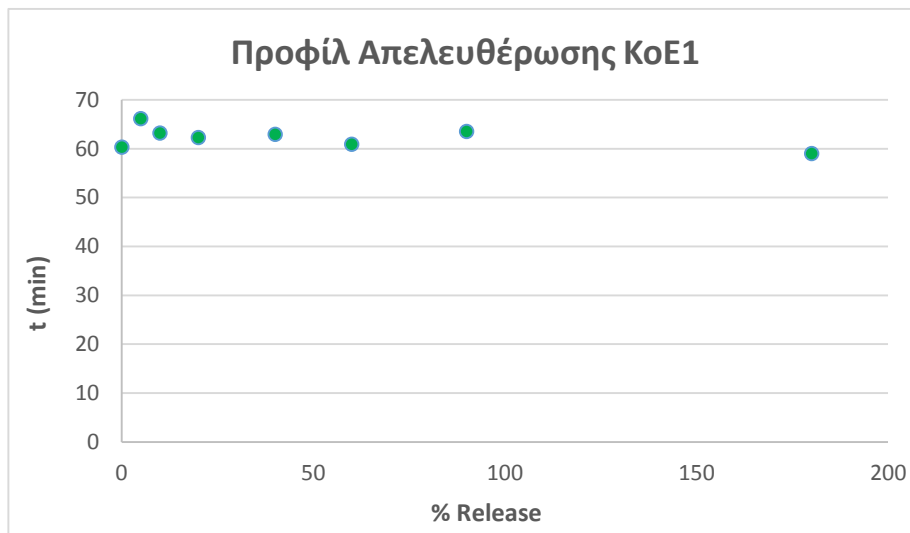
Στα περισσότερα δείγματα, όπως φαίνεται, ήταν απαραίτητη η διήθηση. Ακόμα και ύστερα από αυτή τη συμπληρωματική διεργασία μόνο τα KoE87 και KoE104 έδωσαν αποδεκτά αποτελέσματα.

3.4. Προφίλ Απελευθέρωσης (Release Profile, RP)

Το προφίλ απελευθέρωσης μελετήθηκε μόνο για σύμπλοκα TYR-βCD, και συγκεκριμένα για τα ΚοΕ1 και ΚοΕ6, σε συνθήκες $pH=5,5$ και $T=37^{\circ}C$.

Πίνακας 27: RP ΚοΕ1.

t (min)	Release %
0	60,31
5	66,17
10	63,20
20	62,25
40	62,93
60	60,87
90	63,50
180	58,97
300	25,09
1800	24,60
7200	15,09

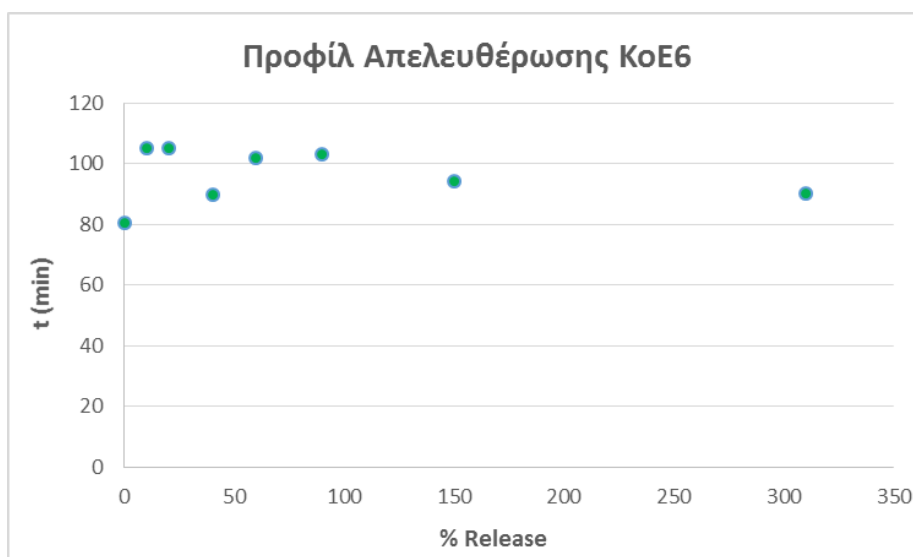


Διάγραμμα 5: Προφίλ απελευθέρωσης του ΚοΕ1 για $t=0-180min$.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι το σύμπλοκο **ΚοΕ1**, στις συγκεκριμένες συνθήκες στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, έχει ως μέγιστο ποσοστό απελευθέρωσης της TYR το ~66%. Το ποσοστό αυτό το προσεγγίζει ήδη από τη χρονική στιγμή t_0 . Τυχόν διακυμάνσεις οφείλονται σε τυχαία πειραματικά σφάλματα. Το σύμπλοκο δεν εμφανίζει το πιο συνηθισμένο προφίλ σταδιακής απελευθέρωσης, αλλά φτάνει κατευθείαν σε πλατό. Η πτώση που εμφανίζεται σε μετέπειτα χρονικές στιγμές πιθανόν να είναι αποτέλεσμα σφαλμάτων λόγω των συνεχών αραιώσεων, από τη συνεχή απομάκρυνση όγκου.

Πίνακας 28: RP ΚοΕ6.

t (min)	Release %
0	80,48
10	105,23
20	105,07
40	89,96
60	101,83
90	102,97
150	94,38
310	90,08
1500	89,28



Διάγραμμα 6: Προφίλ απελευθέρωσης για το ΚοΕ6 για $t=0-310min$.

Όσον αφορά το σύμπλοκο **KoE6** (Πίνακας 28, Διάγραμμα 6), ακολουθεί παρόμοιο προφίλ κατά την απελευθέρωση της TYR. Τη χρονική στιγμή t_0 δεν έχει φτάσει ακόμα στην τιμή του πλατό, αλλά είναι αρκετά κοντά. Σε χρόνο $t=10\text{min}$, η απελευθέρωση βρίσκεται ήδη στο 100%.

Τόσο στην περίπτωση του συμπλόκου **KoE1** όσο και του **KoE6** παρατηρήθηκε άμεση απελευθέρωση της μέγιστης κατά περίπτωση ποσότητας. Το διάλυμα στο οποίο προστίθεται το σύμπλοκο είναι όξινο, ενώ η TYR ως βάση κατά Lewis θα έχει την τάση να αλληλεπιδρά με την περίσσεια H^+ του περιβάλλοντος. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ανταγωνίζονται την σύμπλεξη της TYR με τη βCD και έτσι προκύπτει η άμεση απελευθέρωση της TYR από το σύμπλοκο.

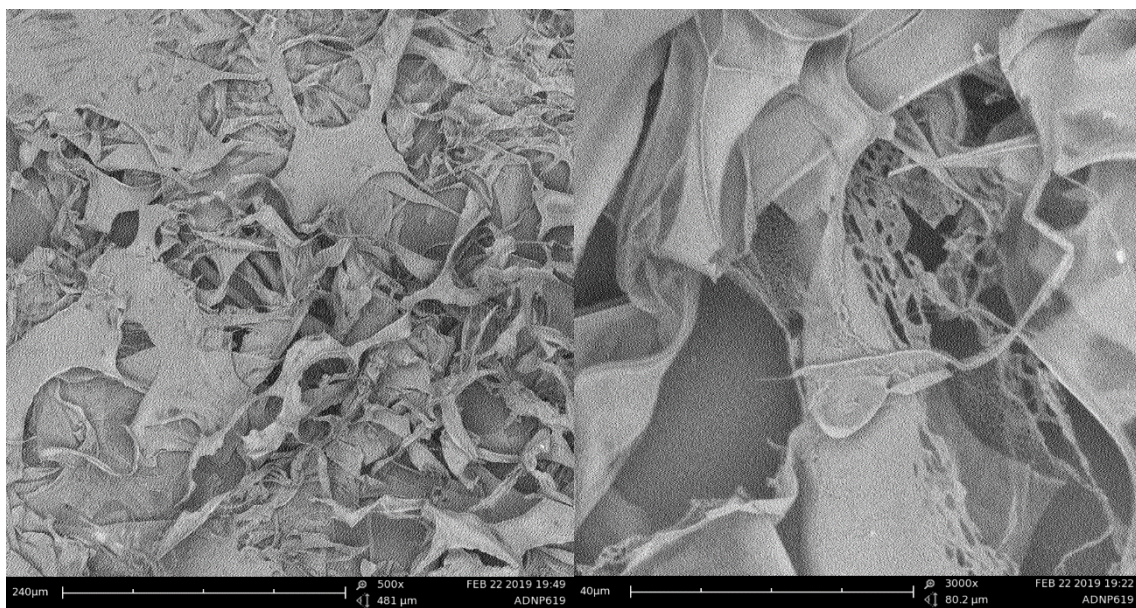
Η κύρια διαφορά μεταξύ της συμπεριφοράς των 2 συμπλόκων είναι η τιμή του πλατό. Για το **KoE6** ολοκληρώνεται η απελευθέρωση μέχρι και **100%**, ενώ για το **KoE1** η μέγιστη απελευθέρωση είναι σε ποσοστό μικρότερο του **70%**. Υπάρχει ενδεχόμενο η διαφορά να οφείλεται στη μέθοδο παρασκευής, συμπεραίνοντας ότι με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης η περισσότερη ποσότητα TYR εγκλείεται στο εσωτερικό βCD ενώ στην περίπτωση της λειοτρίβησης υπάρχει ποσότητα μη εγκλεισμένης ουσίας στο εξωτερικό της βCD, η οποία απελευθερώνεται αμέσως.

Ανάλογα την εφαρμογή που προορίζεται ένα υλικό, ενδείκνυται η άμεση ή η σταδιακή απελευθέρωση της δραστικής ουσίας. Για παράδειγμα, αν πρόκειται για φάρμακο που προορίζεται για επείγουσες καταστάσεις είναι απαραίτητο η δραστική ουσία να απελευθερώνεται άμεσα, ώστε να δράσει ταχύτερα. Όταν πρόκειται για φάρμακο χρόνιας χορήγησης, προτιμάται η σταδιακή απελευθέρωση, ώστε να μειώνονται οι δόσεις χορήγησης. Συνεπώς, το παραπάνω προφίλ θα ταίριαζε στην πρώτη ή αντίστοιχες περιπτώσεις.

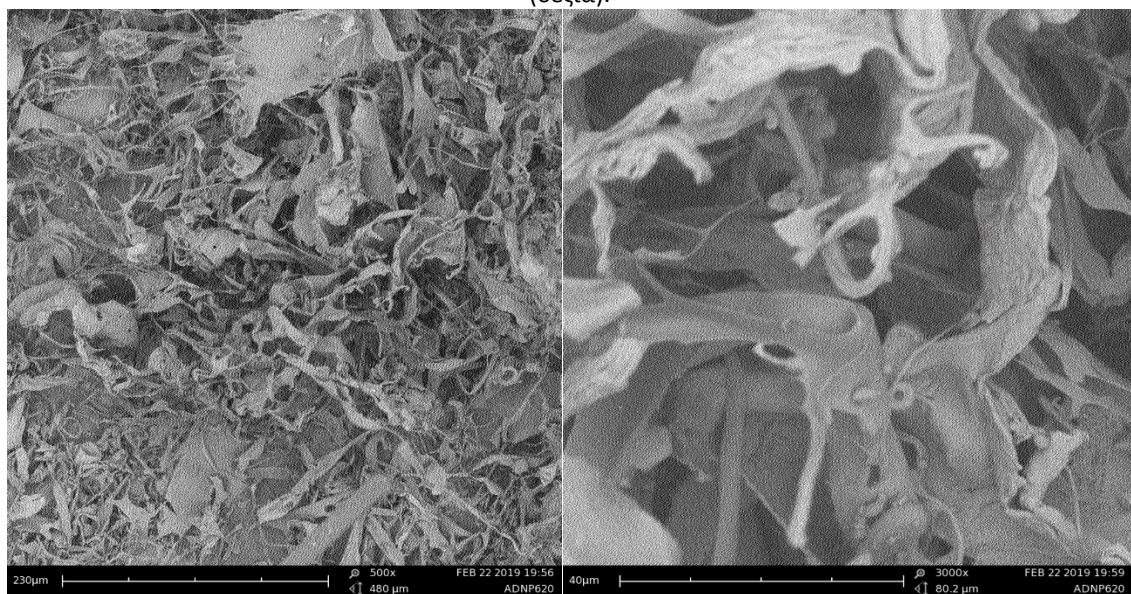
3.5. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Νανοσωματίδια **CS (blank)**, **TYR-CS** και **TYR-βCD/CS** παρατηρήθηκαν μέσω SEM. Τα NPs ήταν σε συνθήκες και αναλογίες κεντρικού σημείου, μετά από φυγοκέντρηση και ξήρανση με λυοφιλοποίηση. Εικόνες SEM λήφθηκαν για μέχρι και 5000 φορές μεγέθυνση. Παρακάτω παρουσιάζονται σε μικρή και μεγαλύτερη μεγέθυνση οι πιο καθαρές απεικονίσεις.

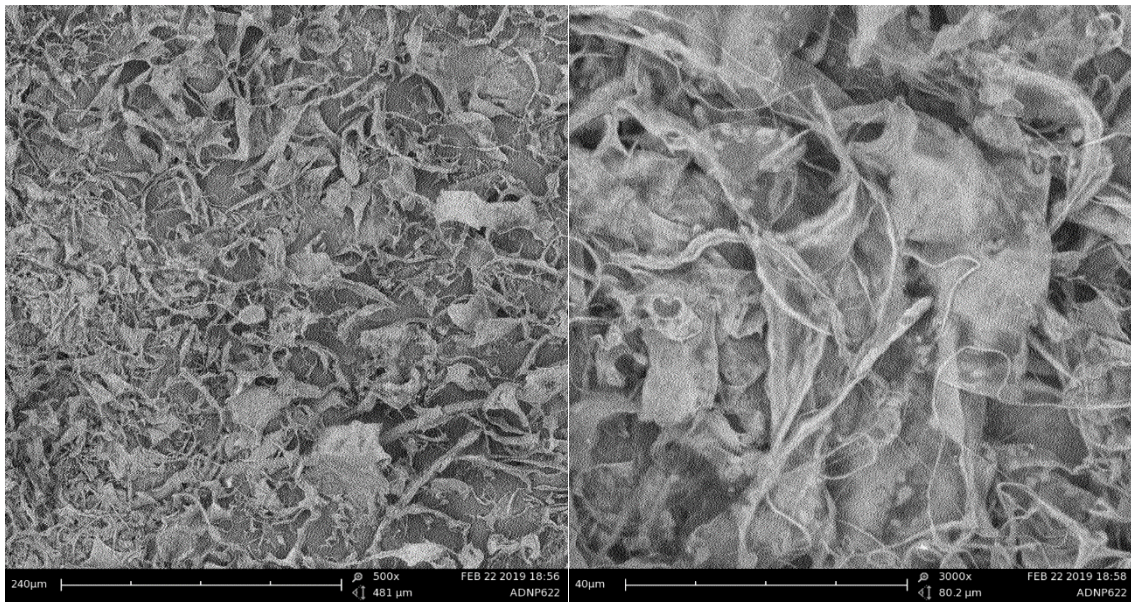
Στις μικρές μεγεθύνσεις φαίνεται μια πιο γενική εικόνα του συστήματος. Τα κενά που υπάρχουν οφείλονται στην εξάχνωση του νερού. Φαίνεται ότι στην περίπτωση των CS-blank τα σωματίδια ήταν πιο ενιαία και μεγαλύτερα συσσωματώματα. Ίσως πιο ομοιόμορφη δομή οπτικά θα μπορούσε να θεωρηθεί αυτή των TYR-βCD/CS NPs, αν και είναι αρκετά παρόμοια με αυτή των TYR-CS NPs.



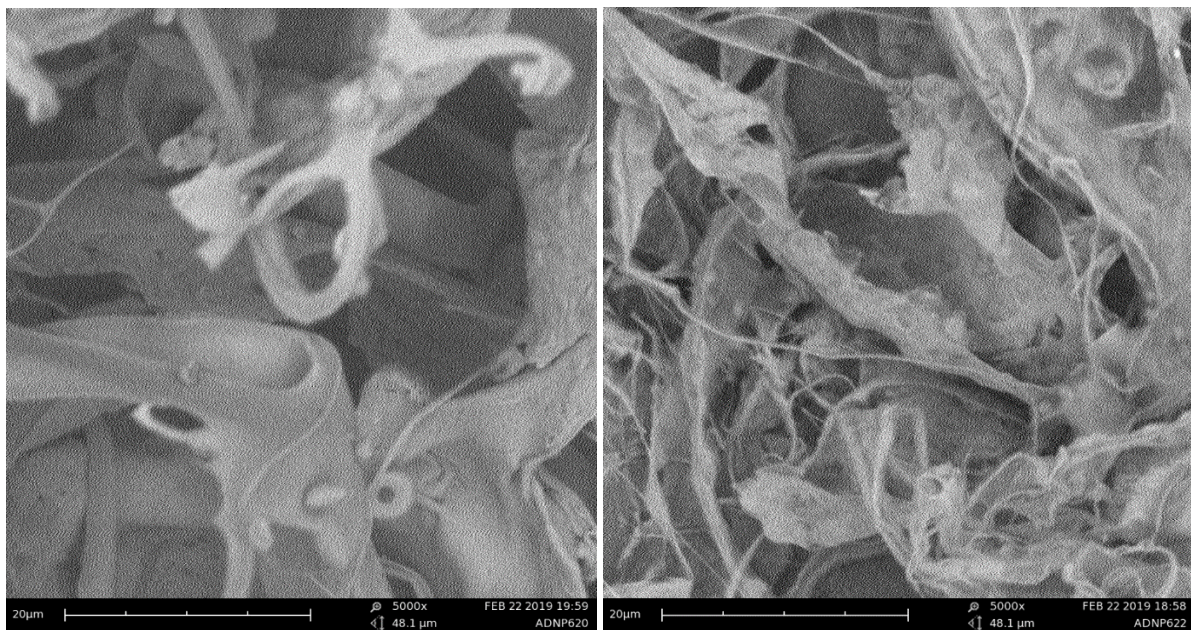
Εικόνα 7: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων CS (blank) σε μεγέθυνση 500x (αριστερά) και 3000x (δεξιά).



Εικόνα 8: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-CS σε μεγέθυνση 500x (αριστερά) και 3000x (δεξιά).



Εικόνα 9: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-βCD/CS σε μεγέθυνση 500x (αριστερά) και 3000x (δεξιά).



Εικόνα 10: Απεικόνιση με χρήση SEM νανοσωματιδίων TYR-CS (αριστερά) και TYR-βCD/CS (δεξιά) σε μεγέθυνση 5000x.

Σε πολύ μεγάλη μεγέθυνση παρατηρείται μια δομική ιδιομορφία στα TYR-βCD/CS NPs σε σχέση με τα TYR-CS NPs.

3.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Σύμφωνα με τη διεργασία που αναλύθηκε προηγουμένως, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε $\lambda=515\text{nm}$ για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DPPH σε διάφορους χρόνους και κατ' επέκταση του δείκτη IC_{50} για την κάθε ουσία ή σύμπλοκο. Χαμηλότερη τιμή IC_{50} είναι ενδεικτική αυξημένης αντιοξειδωτικής δράσης.

Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε για τη ρίζα DPPH, προέκυψε η εξίσωση:

$$y = 0,0358x + 0,0016 \quad (R^2 = 0,9521) \quad (6)$$

όπου $y = C$ (g/L) και $x = \text{Abs}$

Πίνακας 29: Δείκτης IC_{50} για την ελεύθερη ρίζα DPPH, συμπλόκων και καθαρών ουσιών σε διάφορους χρόνους.

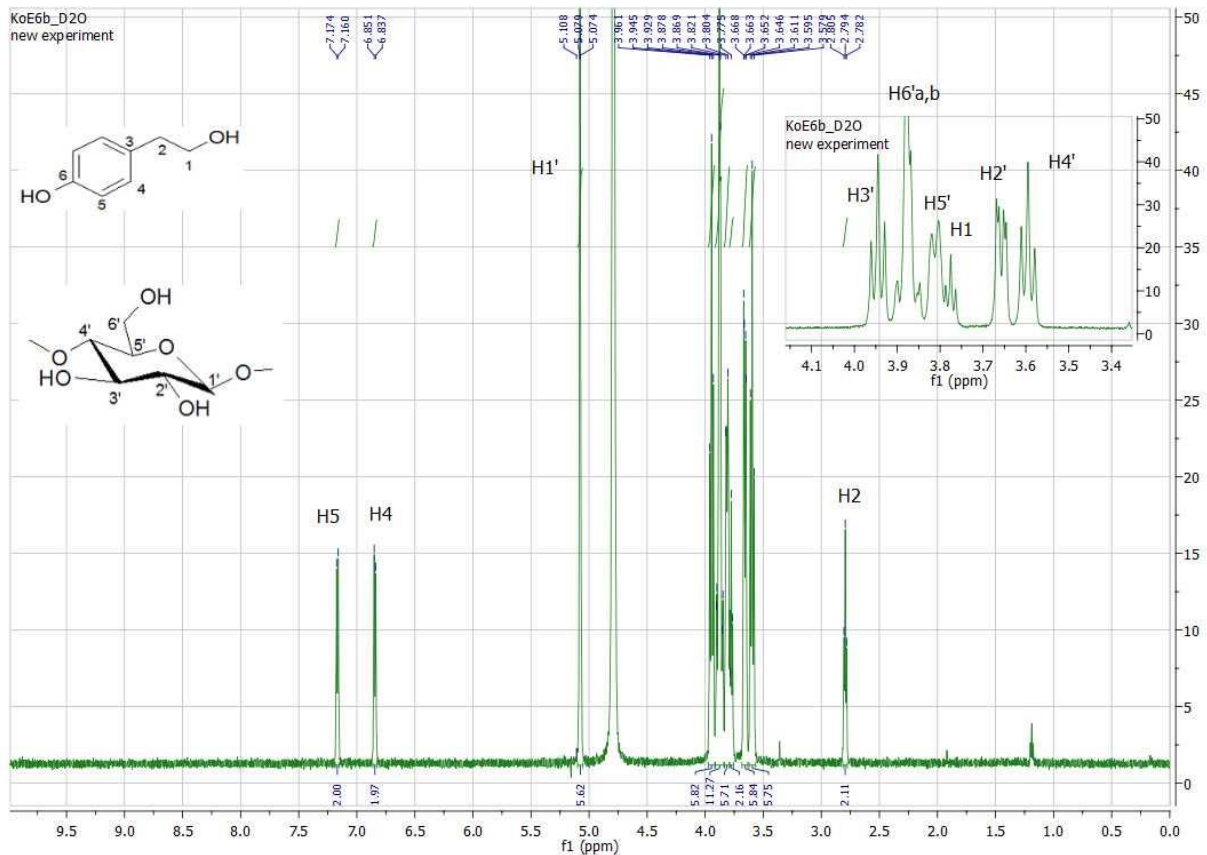
Δείγμα	IC_{50} (g/L)			
	20min	50min	60min	120min
TYR	5,58	14,82	1,17	0,99
KoE1	-	7,02	-	-
KoE6	13,47	28,43	-	-
	30min	90min		
CS	4,79	3,09		
CS NPs (blank)	7,05	6,41		
TYR-CS*	1,51	1,33		
TYR- β CD/CS*	26,40	31,24		
trolox	0,196	0,195		

* Σύμπλοκα σε αναλογίες κεντρικού σημείου, ύστερα από φυγοκέντρηση και λυοφιλοποίηση, διαλυμένα σε 1% v/v CH_3COOH .

Η β CD δεν εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH. Το σύμπλοκο εγκλεισμού της τυροσόλης σε β CD εμφάνισε ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας στα 20min ($IC_{50}=13,47\text{g/L}$), μικρότερη όμως από αυτή της καθαρής TYR ($IC_{50}=5,58\text{g/L}$).

Η CS παρουσίασε ικανοποιητική δράση ($IC_{50}=4,79\text{g/L}$). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα κενά νανοσωματίδια CS, εμφάνισαν IC_{50} 7,05g/L ενώ τα νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη τυροσόλη παρουσίασαν ιδιαίτερα αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση ($IC_{50}=1,51\text{g/L}$), καλύτερη από αυτή της ελεύθερης τυροσόλης.

3.7. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)



Διάγραμμα 7: Φάσμα NMR του συμπλόκου ΚοΕ6 σε D₂O.

Πίνακας 30: Χημικές μετατοπίσεις TYR, βCD στο ΚοΕ6 σε σχέση με τις αντίστοιχες καθαρές ενώσεις.

Πρωτόνια	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) πρωτονίων της β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) πρωτονίων της β-CD (ppm) στο ΚοΕ6	Δδ=(δ2-δ1)ppm
1'	5,081 (d, 7H)	5,077 (d, 6H)	-0,004
3'	3,975 (t, 7H)	3,945 (t, 6H)	-0,030
6'a,b	3,867-3,913 (m, 21H)	3,874 (t, 12H)*	-0,039
5'		3,813 (d, 6H)*	-0,100
2'	3,661 (dd, 7H)	3,658 (dd, 6H)	-0,003
4'	3,596 (t, 7H)	3,595 (t, 6H)	-0,001
Πρωτόνια	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) πρωτονίων της TYR (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) πρωτονίων της TYR (ppm) στο ΚοΕ6	Δδ=(δ2-δ1)ppm
5	7,189 (d, 2H)	7,167 (d, 2H)	-0,022
4	6,858 (d, 2H)	6,844 (d, 2H)	-0,014
1	3,794 (t, 2H)	3,775 (t, 2H)	-0,019
2	2,788 (t, 2H)	2,794 (t, 2H)	0,006

Πίνακας 31: Χημικές μετατοπίσεις TYR, βCD στο ΚοΕ39 σε σχέση με τις αντίστοιχες καθαρές ενώσεις.

Πρωτόνια	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) πρωτονίων της β-CD (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) πρωτονίων της β-CD (ppm) στο ΚοΕ39	Δδ=(δ2-δ1)ppm
1'	5,081 (d, 7H)	5,080 (d, 6,7H)	-0,001
3'	3,975 (t, 7H)	3,961 (t, 7H)	-0,014
6' a,b	3,867-3,913	3,882 (t, 14H)*	-0,031
5'	(m, 21H)	3,838 (d, 7H)*	-0,075
2'	3,661 (dd, 7H)	3,661 (dd, 7H)	0
4'	3,596 (t, 7H)	3,598 (t, 7H)	0,002
Πρωτόνια	Χημικές μετατοπίσεις (δ1) πρωτονίων της TYR (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις (δ2) πρωτονίων της TYR (ppm) στο ΚοΕ39	Δδ=(δ2-δ1)ppm
5	7,189 (d, 2H)	7,150 (d, 0,7H)	-0,039
4	6,858 (d, 2H)	6,837 (d, 0,7H)	-0,021
1	3,794 (t, 2H)	3,759 (t, 0,8H)	-0,035
2	2,788 (t, 2H)	2,803 (t, 0,8H)	0,015

* Επειδή οι κορυφές των H 6 και 5 εμφανιζόταν αρχικά ως μία πολλαπλή κορυφή, χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη μετατόπιση για τον υπολογισμό του Δδ.

Όσον αφορά το σύμπλοκο **ΚοΕ6**, παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν σε H της **βCD**, μετατοπίζονται λιγότερο ή περισσότερο προς υψηλότερα πεδία, δηλαδή τα H αυτά προασπίζονται καλύτερα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα ηλεκτροαρνητικότερα οξυγόνα αλληλεπιδρούν με τα ε' τους με την TYR και έτσι παύουν να αποπροασπίζουν τόσο έντονα τα γειτονικά τους πρωτόνια. Παρατηρείται, επίσης, ότι οι μεγαλύτερες μεταβολές χημικών μετατοπίσεων εντοπίζονται στα H3' και H5'. Τα H αυτά βρίσκονται στην εσωτερική κοιλότητα της βCD και αυτή η παρατήρηση είναι μια ισχυρή ένδειξη εσωτερικού εγκλεισμού της TYR. Επιπλέον, και η κορυφή των H6 παρουσιάζει μεγάλη μετατόπιση, το οποίο είναι λογικό, αφού τα H αυτά είναι χωρικά πιο ελεύθερα να έρθουν σε επαφή με γειτονικά μόρια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ αρχικά οι κορυφές H5' και H6' δεν είναι πολύ ξεκάθαρες, στο NMR του συμπλόκου είναι πλήρως διαχωρίσιμες.

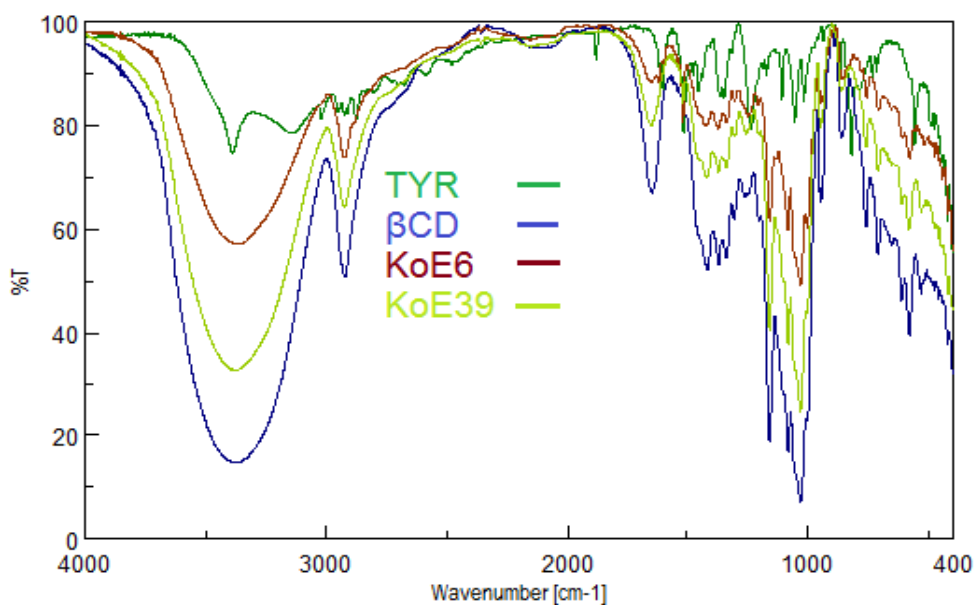
Οι κορυφές της **TYR** (εκτός της H2) παρουσιάζουν μια τάση προάσπισης και αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο ηλεκτρονιακό νέφος της βCD. Το H2 αποπροασπίζεται, υποδεικνύοντας αλληλεπίδραση με ηλεκτροαρνητικότερα άτομα, όπως για παράδειγμα τα οξυγόνα της βCD. Τα αρωματικά H της TYR μετατοπίζονται αρκετά, που υποδηλώνει ότι ποσότητα αυτών έχει εγκλειστεί στη βCD. Η χημική μετατόπιση του H1 επηρεάζεται άμεσα από την υδροξυλομάδα που βρίσκεται σε α- θέση. Κατά την ολοκλήρωση των κορυφών, φαίνεται μειωμένη η στοιχειομετρία της βCD στο σύμπλοκο. Ενδεχομένως η βCD αλληλεπιδρά εξωτερικά είτε με άλλα μόρια βCD είτε και με μόρια TYR, με αποτέλεσμα το NMR να μη «βλέπει» πλήρως τα μόριά της. Θα μπορούσε να διατυπωθεί ως γενικό συμπέρασμα, ότι μέρος της TYR βρίσκεται εσωτερικά της κοιλότητας της βCD, και συγκεκριμένα το υδρόφοβο αρωματικό τμήμα που είναι και αναμενόμενο λόγω του υδατικού περιβάλλοντος. Ενδεχομένως, τα H2 της TYR αλληλεπιδρούν με τα οξυγόνα στο άνοιγμα του κώνου. Σίγουρα υπάρχει ποσότητα TYR που αλληλεπιδρά με την εξωτερική πλευρά του κώνου της βCD.

Στο σύμπλοκο **KoE39**, παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο στις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων, με κάποιες μικρές μεταβολές στα Δδ. Στην περίπτωση των κορυφών H5' και H6', δε διαχωρίζονται όσο στην περίπτωση του KoE6, αλλά θυμίζει την εικόνα της βCD. Αυτό, όμως, που αξίζει να σημειωθεί είναι η έντονη διαφορά στην ολοκλήρωση των κορυφών. Συγκεκριμένα, για ολοκλήρωση των H της βCD προς 7H, τα αρωματικά H της TYR ολοκληρώνονται προς 0,7 και τα υπόλοιπα προς 0,8. Η αρχική στοιχειομετρία κατά την παρασκευή του συμπλόκου βCD:TYR 1,2:1, δεν αρκεί για να αιτιολογήσει αυτή τη διαφορά. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι έχει γίνει αρκετά πιο ικανοποιητικός εγκλεισμός στο σύμπλοκο που προέρχεται από τη μέθοδο της συγκαταβύθισης.

Συνεχίζοντας στο πείραμα με την επίδραση υπερήχων, η έκθεση του συμπλόκου KoE6 σε τέτοιο πεδίο είχε ως αποτέλεσμα μόνο πολύ μικρή διαφορά σε χημικές μετατοπίσεις και ολοκληρώσεις που δε θα μπορούσαν να παρέχουν αξιόπιστο αποτέλεσμα (Παράρτημα 5.2).

Τέλος, λόγω αδυναμίας διαλυτοποίησης της CS σε κοινούς διαλύτες, δεν ήταν δυνατόν να μελετηθούν τα σύμπλοκά της με αυτή τη μέθοδο.

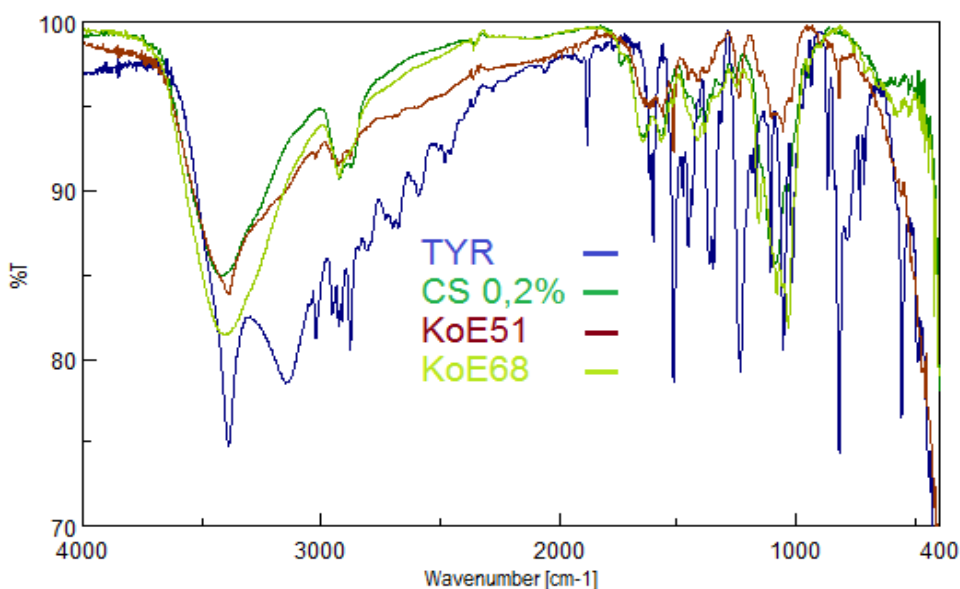
3.8. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)



Διάγραμμα 8: Φάσμα IR των συμπλόκων KoE6 και KoE39 συγκριτικά με τις καθαρές ενώσεις.

Τα φάσματα IR που λήφθηκαν για τα σύμπλοκα KoE1 και KoE39 (ανακλιμάκωση 2× του KoE1) ήταν πανομοιότυπα (παράρτημα 5.3), και για περαιτέρω συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το φάσμα του **KoE39**.

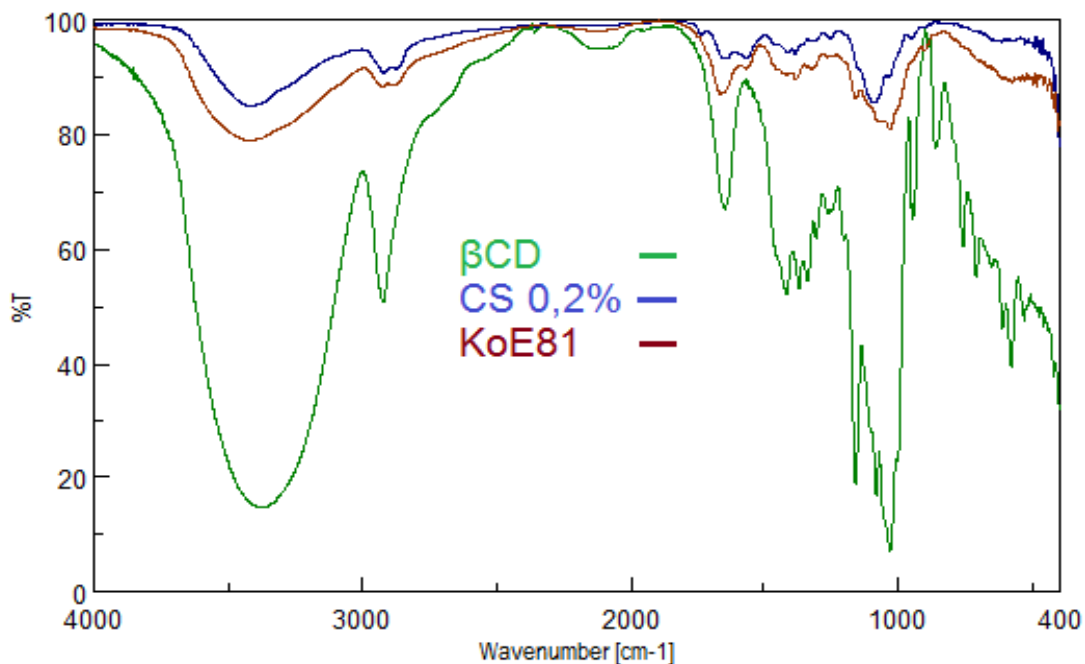
Στο φάσμα που φαίνεται παραπάνω, παρατηρούμε ότι η μορφή των φασμάτων των συμπλόκων παρουσιάζουν ομοιότητες κατά κύριο λόγο με αυτό της βCD. Στα $\sim 1507 \text{ cm}^{-1}$ τα σύμπλοκα εμφανίζουν χαρακτηριστική κορυφή της TYR, η οποία μάλιστα αντιστοιχεί στην αρωματική περιοχή. Συνολικά, επιβεβαιώνεται ότι η TYR εγκλείεται εσωτερικά της κοιλότητας της βCD, αλλά όχι σε ποσοστό 100%.



Διάγραμμα 9: Φάσμα IR των συμπλόκων KoE51, KoE68, του διαλύματος CS 0,2% και της TYR.

Στη συνέχεια λήφθηκαν φάσματα IR από τα δείγματα **KoE51** (κεντρικό σημείο DoE TYR-CS), **KoE 68** (κεντρικό σημείο DoE TYR-βCD/CS) και CS 0,2% w/v σε μορφή διαλύματος (Διάγραμμα 9).

Και σε αυτή την περίπτωση ο εγκλεισμός φαίνεται επιτυχημένος, εφόσον τα φάσματα των συμπλόκων έχουν τη μορφή του φάσματος του φορέα. Στα $\sim 1235\text{cm}^{-1}$, το σύμπλοκο KoE51 εμφανίζει τη φαινολική κορυφή της TYR, ενώ στην περιοχή $\sim 820\text{cm}^{-1}$ εμφανίζεται η κορυφή της πάρα-υποκατάσταση του δακτυλίου. Στο σύμπλοκο KoE68, δε φαίνεται οι κορυφές να συμπίπτουν με αυτές της βCD ή της TYR. Παρ' όλα αυτά, λόγω της πολυπλοκότητας της περιοχής του δακτυλικού αποτυπώματος, δεν μπορεί να θεωρηθεί απαραίτητα ως 100% εγκλεισμός.



Διάγραμμα 10: Φάσμα IR της χημικά τροποποιημένης χιτοζάνης, KoE81.

Στο φάσμα αυτό βλέπουμε μεταβολή των κορυφών και των δύο αρχικών ενώσεων στην περιοχή των πρωτοταγών αλκοολών ($1000-1075\text{cm}^{-1}$), ένδειξη που ενισχύει το σχηματισμό της mCS.

3.9. Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)

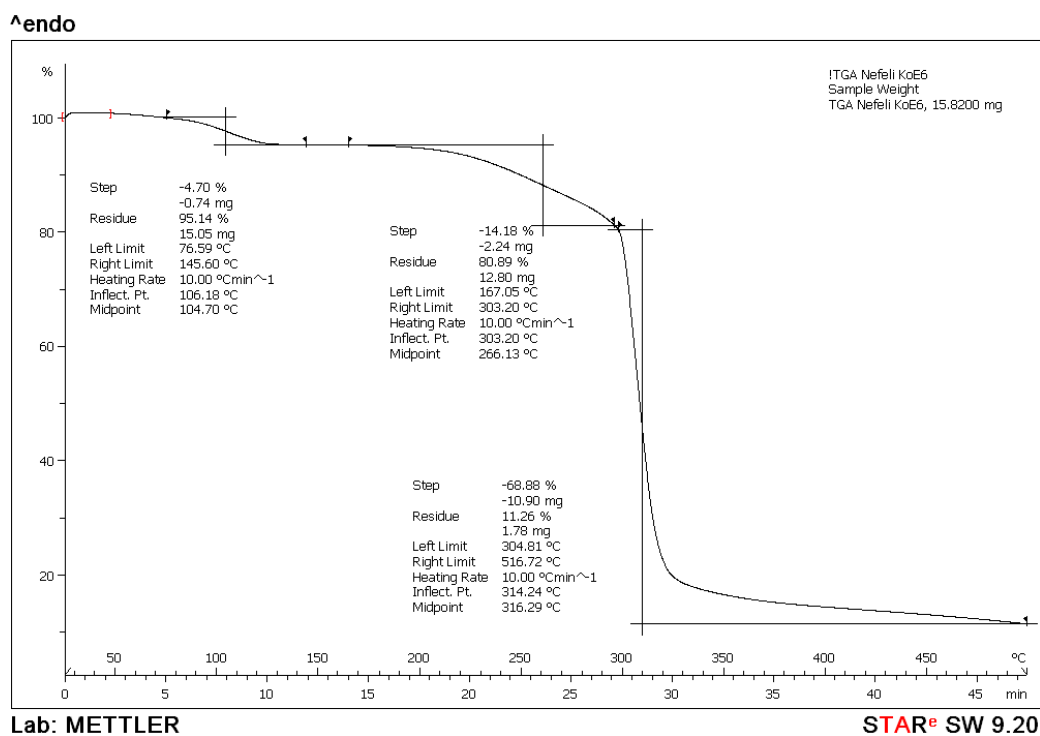
Πίνακας 32: Μεταβολές κατά τη TGA ανά δείγμα.

Δείγμα	T (°C)	Δm (mg)	% Δm	T (°C)	Δm (mg)	% Δm	T (°C)	Δm (mg)	% Δm
TYR	-	-	-	219,56	-4,97	-98,10	-	-	-
βCD	102,86	-0,93	-11,43	323,82	-5,88	-72,36	-	-	-
CS	91,94	-0,80	-8,29	300,11	-4,44	-46,02	-	-	-
ΚοΕ81	δεν προσδιορίζεται με ακρίβεια			257,82	-12,86	-46,64	443,53	-2,96	-10,74
ΚοΕ6	104,70	-0,74	-4,70	266,13	-2,24	-14,18	316,29	-10,90	-68,88
TYR-βCD/CS	54,48	-89,59 e-03	-3,86	279,79	0,67	-29,05	334,81	-0,22	-9,60
	387,12	-0,14	-5,84	592,10	-0,35	-14,98	319,57	-1,37	-59,00

Οι αρχικές μάζες και οι συνθήκες ανά πείραμα εμφανίζονται στους πίνακες 11 και 14.

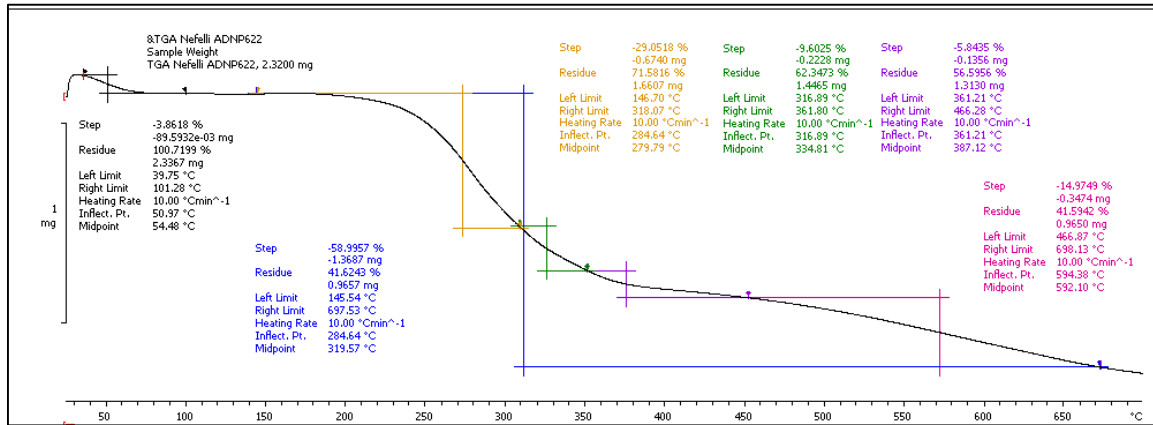
Όλα τα δείγματα ήταν σε στερεή μορφή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρώτη στήλη αφορά την εξάτμιση του H₂O (υγρασίας).

Συγκρίνοντας τα δεδομένα TGA για τις ενώσεις TYR, βCD και το σύμπλοκο **ΚοΕ6**, παρατηρούμε σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας διάσπασης της TYR από τους 220°C στους 266°C. Συνεπώς, ενισχύεται ο ισχυρισμός για προστασία της TYR στο εσωτερικό της κοιλότητας της βCD.



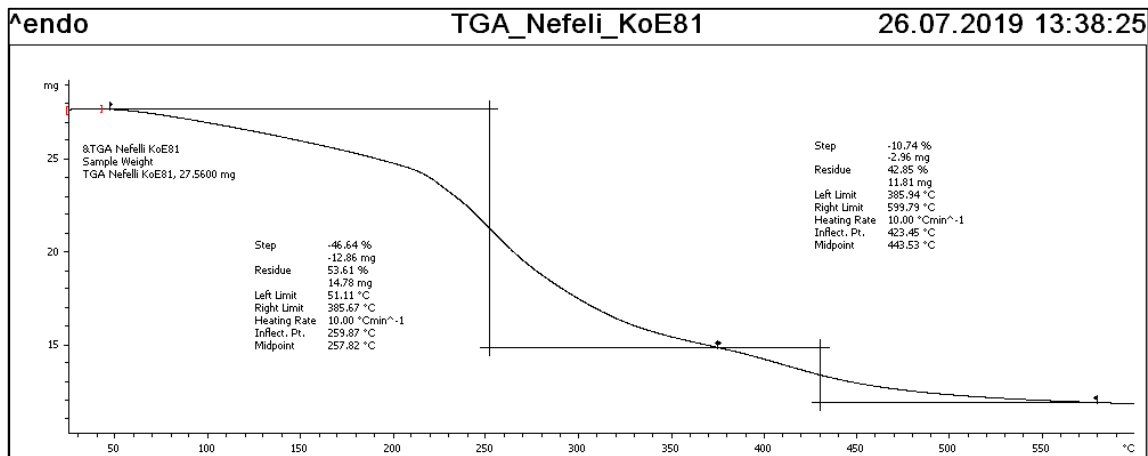
Διάγραμμα 11: TGA του συμπλόκου ΚοΕ6.

Στην περίπτωση του συμπλόκου **TYR-βCD/CS**, οι μεταβολές δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρες. Το πρώτο βήμα εμφανίζεται ιδιαίτερα νωρίς, ενώ τα υπόλοιπα θα μπορούσαν να περιγραφούν και ως ένα ενιαίο βήμα. Παρ' όλα αυτά, παρατηρούμε και εδώ προστασία της TYR με αύξηση της θερμοκρασίας αποικοδόμησης, αλλά και της βCD.



Διάγραμμα 12: TGA TYR-βCD/CS.

Για την **mCS** (KoE81), παρατηρούμε το κύριο βήμα να λαμβάνει χώρα νωρίτερα (257,82°C) από τη διάσπαση των επιμέρους συστατικών όταν αυτά είναι στη μορφή της καθαρής ένωσης. Αυτό μπορεί να σχετίζεται και με τη γλουταραλδεϋδη. Ένα μικρό ποσοστό αποσυντίθεται αρκετά αργότερα.



Διάγραμμα 13: TGA KoE81.

3.10. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

3.10.1. TYR-CS

Ύστερα από υπόδειξη του λογισμικού, ακολουθώντας το σχεδιασμό **Box-Behnken (BBD)**, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα που αφορούν το **μέγεθος** και το **ζ-δυναμικό**. Με βάση αυτά, έγινε στατιστική ανάλυση και προσδιορίστηκε το καταλληλότερο μοντέλο για την περιγραφή της κάθε απόκρισης.

Πίνακας 33: Πειράματα DoE για το σύμπλοκο TYR-CS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

Std	Run	Δείγμα	Παράγοντας 1 A:CS % w/v	Παράγοντας 2 B:TPP mg	Παράγοντας 3 C:TYR mg	Απόκριση 1 μέγεθος nm	Απόκριση 2 ζ-δυναμικό mV
6	1	KoE54	0,35	1,67	2,5	168,8	41,6
2	2	KoE52	0,35	0,42	10	574,6	46,4
3	3	KoE49	0,05	2,92	10	13230	4,3
9	4	KoE50	0,20	0,42	2,5	679,6	41,7
13	5	KoE48	0,20	1,67	10	175,5	39,1
17	6	KoE77	0,20	1,67	10	127,2	24,8
10	7	KoE57	0,20	2,92	2,5	139,4	32
16	8	KoE76	0,20	1,67	10	144,7	14,9
11	9	KoE45	0,20	0,42	17,5	474,8	36,4
8	10	KoE53	0,35	1,67	17,5	199,3	43,3
14	11	KoE42	0,20	1,67	10	139,8	36,4
15	12	KoE51	0,20	1,67	10	115,3	35,5
12	13	KoE56	0,20	2,92	17,5	148,9	37,5
1	14	KoE47	0,05	0,42	10	393,4	28,6
5	15	KoE43	0,05	1,67	2,5	3697,7	8,7
7	16	KoE46	0,05	1,67	17,5	5159	12,7
4	17	KoE55	0,35	2,92	10	206,1	37

Απόκριση R₁: Μέγεθος νανοσωματιδίων

Το μοντέλο που επιλέχθηκε για την μελέτη του μεγέθους ήταν **απλοποιημένο τετραγωνικό μοντέλο (reduced quadratic model)**. Η στατιστική ανάλυση ANOVA περιγράφεται στον Πίνακα 34. Από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο αφαιρέθηκαν οι όροι AC, BC, C² για την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου (F-value=9,43). Η επιλογή αυτού φαίνεται να είναι η κατάλληλη. Οι σημαντικότεροι όροι είναι αυτοί με p<0,05, δηλαδή οι A, B, AB, A². Ο όρος C (TYR) δεν είναι τόσο σημαντικός κατά την ανάλυση. Το μειονέκτημα του μοντέλου αυτού είναι ο αρκετά υψηλός όρος "Lack of Fit F-value".

Πίνακας 34: ANOVA για την R₁ (TYR-CS).

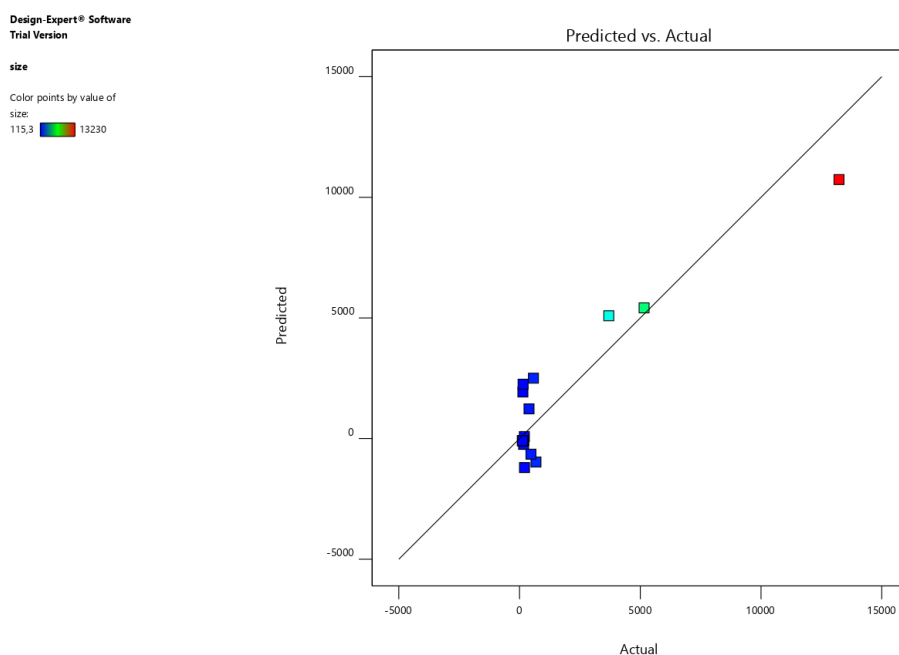
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1,510E+08	6	2,516E+07	9,43	0,0012	significant
A-CS	5,688E+07	1	5,688E+07	21,31	0,0010	
B-TPP	1,683E+07	1	1,683E+07	6,30	0,0309	
C-tyrosol	2,101E+05	1	2,101E+05	0,0787	0,7848	
AB	4,359E+07	1	4,359E+07	16,33	0,0024	
A ²	3,021E+07	1	3,021E+07	11,32	0,0072	
B ²	2,245E+06	1	2,245E+06	0,8412	0,3807	
Residual	2,669E+07	10	2,669E+06			
Lack of Fit	2,669E+07	6	4,448E+06	8658,18	< 0.0001	significant
Pure Error	2055,06	4	513,76			
Cor Total	1,777E+08	16				

Πίνακας 35: Πίνακας R² μοντέλου (TYR-CS).

R²	0,8498
Adjusted R²	0,7596
Predicted R²	0,0429
Adeq Precision	11,3848

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 35, η τιμή “Predicted R²” αποκλίνει αρκετά από το “Adjusted R²”. Αποκλίσεις μέχρι 0,2 θεωρούνται αποδεκτές. Η μεγάλη αυτή διαφορά θα μπορούσε να επιλυθεί με επιπλέον απλούστευση του μοντέλου. Η τιμή “Adequate Precision” είναι ικανοποιητική εφόσον ξεπερνά την τιμή 4 (αφορά τον λόγο σήμα/θόρυβο).

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές με βάση το μοντέλο που επιλέχθηκε.



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R₁: TYR-CS).

Από το μοντέλο που εφαρμόστηκε προκύπτει η **εξίσωση** (κωδικοποιημένη, χρήση όρων A, B, C):

$$R_1 = -85,74 - 2666,41 A + 1450,25 B + 162,06 C - 3301,28 AB + 2674,75 A^2 + 729,22 B^2 \quad (7)$$

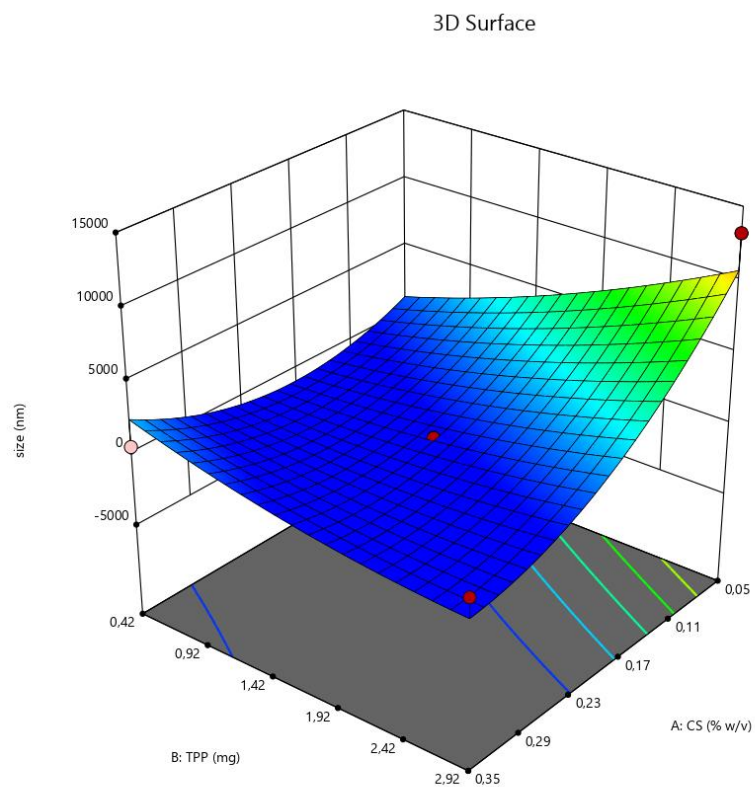
Τέλος, κατά την **επιβεβαίωση** του μοντέλου, οι αποκρίσεις των επιπλέον σημείων βρισκόταν εντός ορίων του μοντέλου, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για την περιγραφή της απόκρισης του μεγέθους.

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

size (nm)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
115,3 13230

X1 = A: CS
X2 = B: TPP

Actual Factor
C: tyrosol = 10



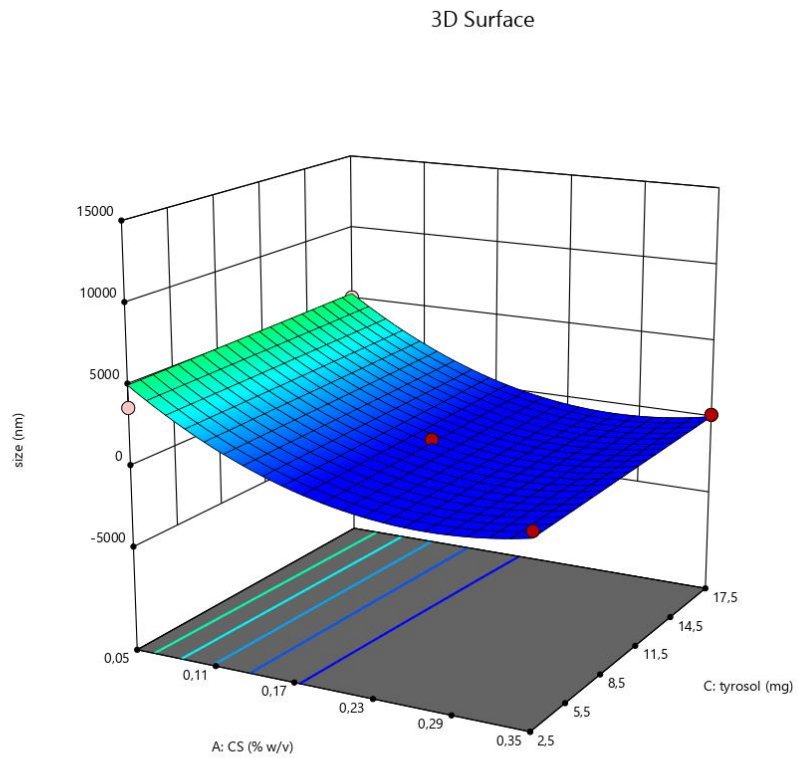
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-μεγέθους (TYR-CS).

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

size (nm)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
115,3 13230

X1 = A: CS
X2 = C: tyrosol

Actual Factor
B: TPP = 1,67



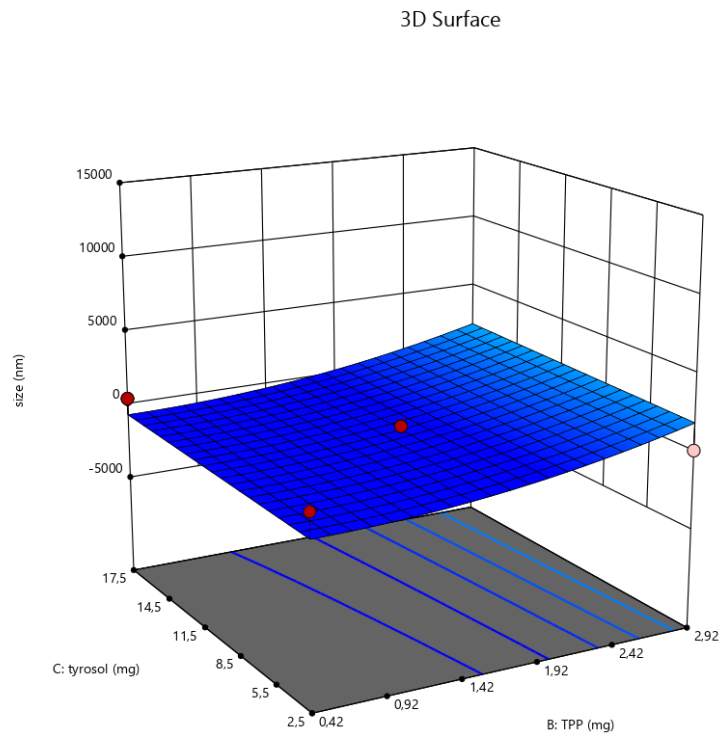
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TYR-μεγέθους (TYR-CS).

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

size (nm)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
115,3 13230

X1 = B: TPP
X2 = C: tyrosol

Actual Factor
A: CS = 0,2



Διάγραμμα 17: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TYR-TPP-μεγέθους(TYR-CS).

Από τα γραφήματα παρατηρείται αυτό που αναλύθηκε και παραπάνω αριθμητικώς. Η ποσότητα της TYR δεν επιδρά σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα.

Το σημείο με το **μικρότερο μέγεθος** είναι ένα από τα κεντρικά, σύμφωνα με τον πίνακα 35. Από τα γραφήματα μπορεί να παρατηρηθεί ότι το μικρότερο μέγεθος συνολικά είναι κοντά στο κεντρικό σημείο. Επειδή πρόκειται για στατιστικό μοντέλο, δεν έχουν αποκλειστεί οι αρνητικές τιμές στην απόκριση (αρνητικά μεγέθη).

Το σημείο που αντιστοιχεί στο **μεγαλύτερο μέγεθος** είναι το σύμπλοκο ΚοΕ49 (-1,+1,0). Σε αυτό το σημείο, η ποσότητα TPP είναι αρκετά υψηλή για τη συγκέντρωση της CS. Έτσι, η μεγαλύτερη ποσότητα TPP ενώνει περισσότερες αλυσίδες (ή τμήματα αυτών), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλων σωματιδίων.

Απόκριση R₂: ζ-δυναμικό

Το μοντέλο με την καλύτερη προσαρμογή της απόκρισης «ζ-δυναμικό» κρίθηκε ότι ήταν το **γραμμικό (linear model)**.

Πίνακας 36: ANOVA για την R₂ (TYR-CS).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1852,51	3	617,50	9,64	0,0013	significant
A-CS	1624,50	1	1624,50	25,37	0,0002	
B-TPP	223,66	1	223,66	3,49	0,0843	
C-tyrosol	4,35	1	4,35	0,0679	0,7984	
Residual	832,51	13	64,04			
Lack of Fit	423,54	9	47,06	0,4603	0,8466	not significant
Pure Error	408,97	4	102,24			
Cor Total	2685,02	16				

Η επιλογή του μοντέλου φαίνεται να είναι η κατάλληλη (F-value=9,64). Ο σημαντικότερος όρος είναι αυτός με $p < 0,05$, δηλαδή ο A. Ο όρος C (tyrosol) δεν είναι τόσο σημαντικός κατά την ανάλυση. Ο όρος "Lack of Fit F-value" έχει ικανοποιητική τιμή.

Πίνακας 37: Πίνακας R² μοντέλου (TYR-CS).

R²	0,6899
Adjusted R²	0,6184
Predicted R²	0,4983
Adeq Precision	10,0663

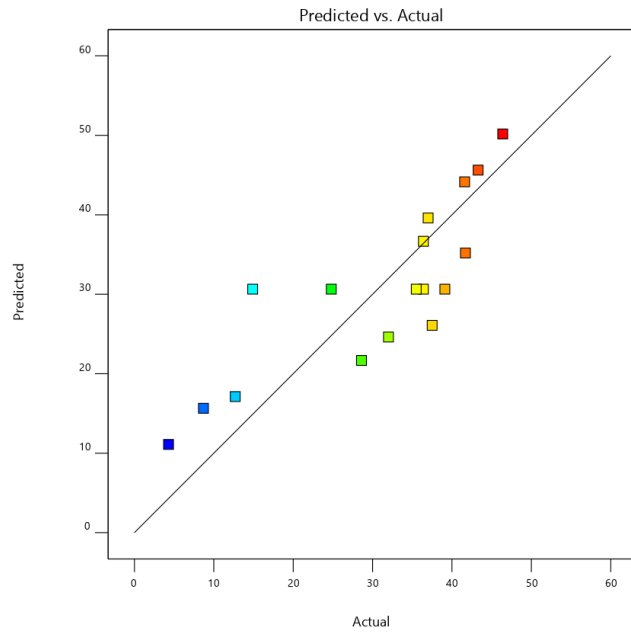
Οι όροι "Predicted R²" και "Adjusted R²" βρίσκονται σε συμφωνία (διαφορά <0,2). Η τιμή του όρου "Adequate Precision" είναι, επίσης, αποδεκτή.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η αρκετά ικανοποιητική συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές βάση του μοντέλου που επιλέχθηκε.

Design-Expert® Software
Trial Version

ζ-potential

Color points by value of
ζ-potential:
4,3 46,4



Διάγραμμα 18: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R₂: TYR-CS).

Από το μοντέλο που εφαρμόστηκε προκύπτει η **εξίσωση** (κωδικοποιημένη):

$$R_2 = 30,64 + 14,25 A - 5,29 B + 0,74 C \quad (8)$$

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα ενδιάμεσων σημείων για την επιβεβαίωση του μοντέλου. Τα αποτελέσματα αυτών, βρισκόταν μέσα στα όρια του μοντέλου.

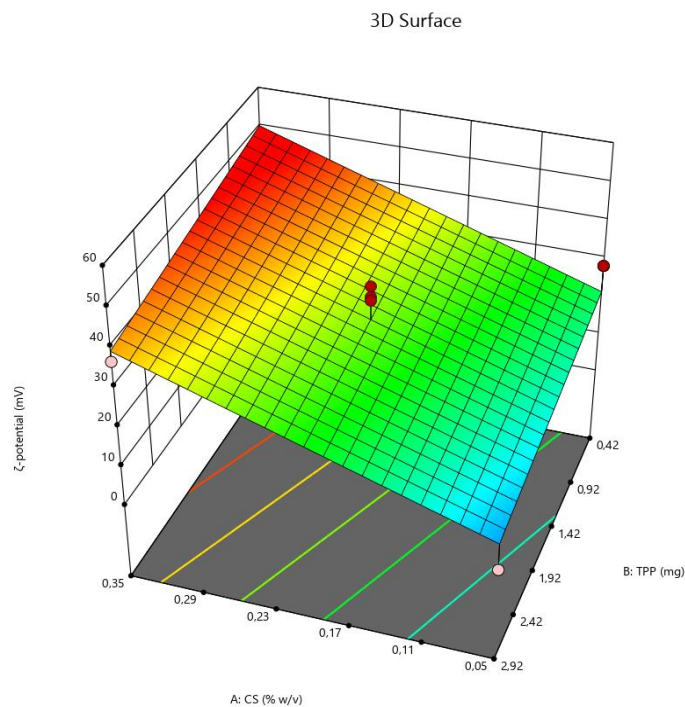
Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

ζ-potential (mV)

Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
4,3 46,4

X1 = A: CS
X2 = B: TPP

Actual Factor
C: tyrosol = 10



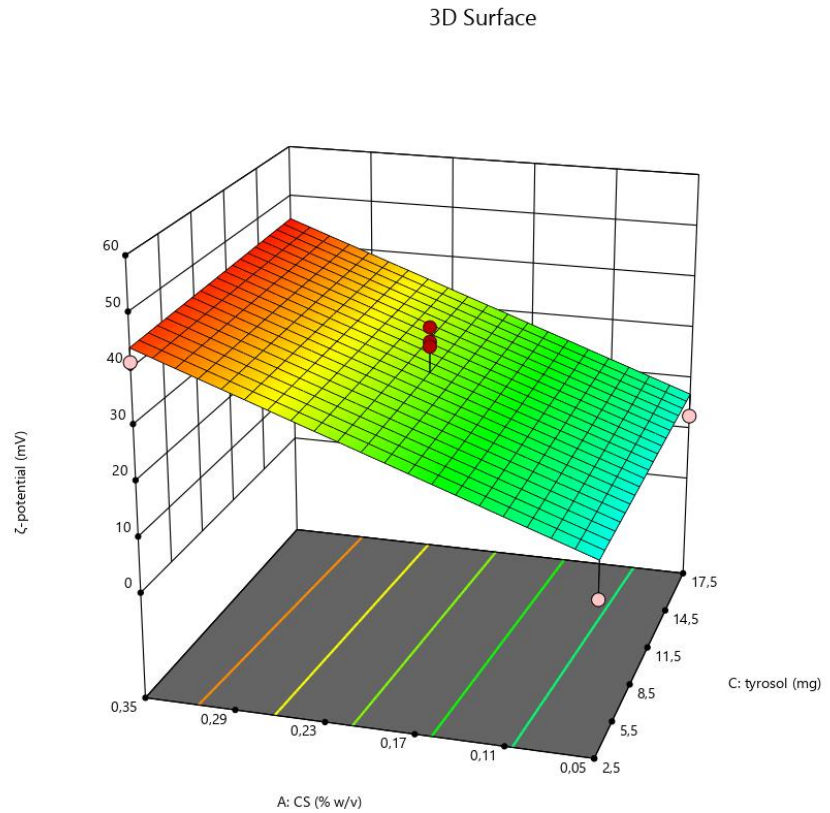
Διάγραμμα 19: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-ζ-δυναμικού (TYR-CS).

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

ζ-potential (mV)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
4,3 46,4

X1 = C: tyrosol
X2 = A: CS

Actual Factor
B: TPP = 1,67



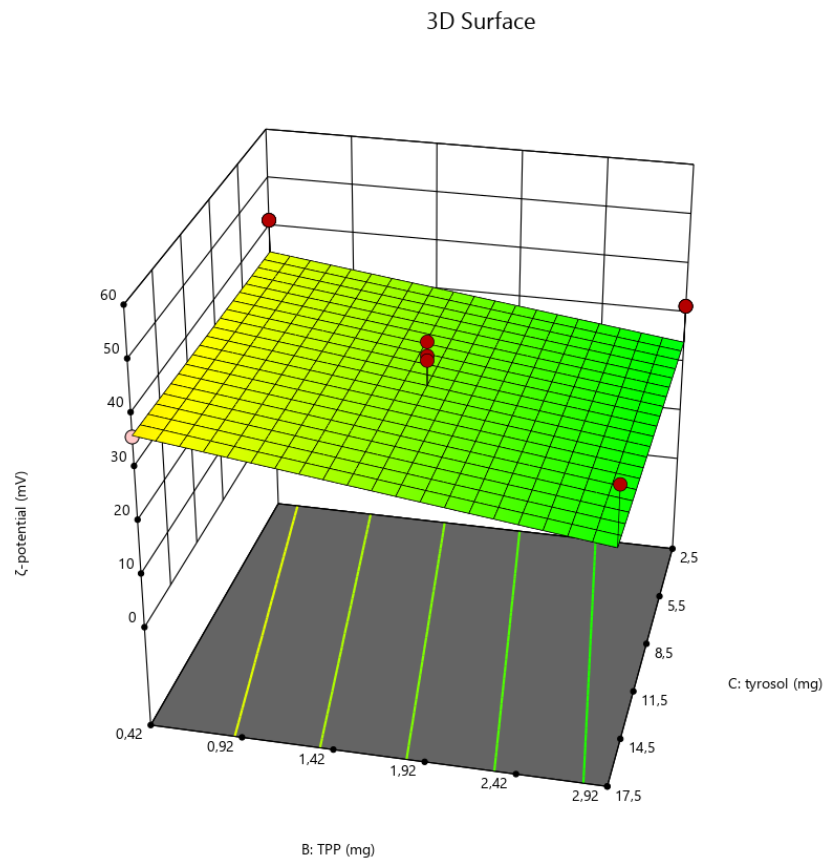
Διάγραμμα 20: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TYR-CS-ζ-δυναμικού (TYR-CS).

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

ζ-potential (mV)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
4,3 46,4

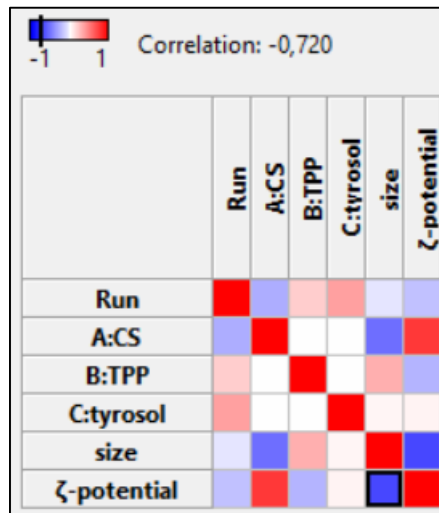
X1 = C: tyrosol
X2 = B: TPP

Actual Factor
A: CS = 0,2



Διάγραμμα 21: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-TYR-ζ-δυναμικού (TYR-CS).

Ο ρόλος της TYR δεν είναι σημαντικός ούτε στην απόκριση «ζ-δυναμικό». Η απόκριση αυτή εμφανίζει **μέγιστες τιμές**, που είναι και το επιθυμητό, σε **μεγάλες συγκεντρώσεις CS** και σε **μικρές συγκεντρώσεις TPP**.



Διάγραμμα 22: Γενική συσχέτιση παραγόντων και αποκρίσεων στο DoE TYR-CS.

Ως μια πιο γενική παρατήρηση για τα νανοσωματίδια **TYR-CS**, είναι ότι παρατηρείται **αντιστρόφως ανάλογη** σχέση μεγέθους των νανοσωματιδίων με το ζ-δυναμικό. Όντως, στο δείγμα KoE49 διαπιστώθηκε ταυτόχρονα το μεγαλύτερο μέγεθος και το μικρότερο ζ-δυναμικό. Θα μπορούσε να διατυπωθεί ένα γενικό συμπέρασμα μείωσης της σταθερότητας του συστήματος διασποράς όσο αυξάνεται το μέγεθος των σωματιδίων, χωρίς, όμως, να είναι απόλυτη διαπίστωση.

3.10.2. TYR-βCD/CS

Για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο **ΚοΕ6** ως ουσία για εγκλεισμό στο φορέα. Πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα που υπέδειξε το λογισμικό και καταγράφηκαν οι αντίστοιχες αποκρίσεις.

Πίνακας 38: Πειράματα DoE για το σύμπλοκο TYR-βCD/CS και τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

Std	Run	Δείγμα	Παράγοντας 1 A:CS % w/v	Παράγοντας 2 B:TPP mg	Παράγοντας 3 C:ΚοΕ6 mg	Απόκριση 1 size nm	Απόκριση 2 ζ-potential mV
9	1	ΚοΕ 67	0,20	0,42	2,5	364,8	36,9
16	2	ΚοΕ 78	0,20	1,67	10	159,0	28,7
3	3	ΚοΕ 66	0,05	2,92	10	9930,7	4,8
12	4	ΚοΕ 73	0,20	2,92	17,5	142,2	37,5
8	5	ΚοΕ 70	0,35	1,67	17,5	231,0	39,9
15	6	ΚοΕ 68	0,20	1,67	10	162,5	21,2
6	7	ΚοΕ 71	0,35	1,67	2,5	190,3	34,3
14	8	ΚοΕ 60	0,20	1,67	10	217,0	26,2
1	9	ΚοΕ 64	0,05	0,42	10	276,7	19,4
4	10	ΚοΕ 72	0,35	2,92	10	221,3	36
13	11	ΚοΕ 65	0,20	1,67	10	191,5	21,3
2	12	ΚοΕ 69	0,35	0,42	10	595,0	41,9
17	13	ΚοΕ 79	0,20	1,67	10	141,5	27,8
11	14	ΚοΕ 62	0,20	0,42	17,5	441,5	46,5
5	15	ΚοΕ 61	0,05	1,67	2,5	9885,3	11,7
7	16	ΚοΕ 63	0,05	1,67	17,5	7946,0	11,3
10	17	ΚοΕ 74	0,20	2,92	2,5	132,6	32

Απόκριση R₁: Μέγεθος Νανοσωματιδίων

Το μοντέλο που επιλέχθηκε για την μελέτη του μεγέθους ήταν **απλοποιημένο τετραγωνικό μοντέλο (reduced quadratic model)**. Η στατιστική ανάλυση ANOVA περιγράφεται στον Πίνακα 39. Από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο αφαιρέθηκαν ορισμένοι όροι (AC, BC, B²) για την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου (F-value=12,08). Η επιλογή του μοντέλου φαίνεται να είναι η κατάλληλη. Οι σημαντικότεροι όροι είναι αυτοί με p<0,05, δηλαδή οι A, AB, A². Ο όρος B (TPP) είναι μέτριας βαρύτητας. Ο όρος C (TYR) δεν είναι τόσο σημαντικός κατά την ανάλυση. Το μειονέκτημα του μοντέλου αυτού είναι ο αρκετά υψηλός όρος "Lack of Fit F-value".

Πίνακας 39: ANOVA για την R₁ (TYR-βCD/CS).

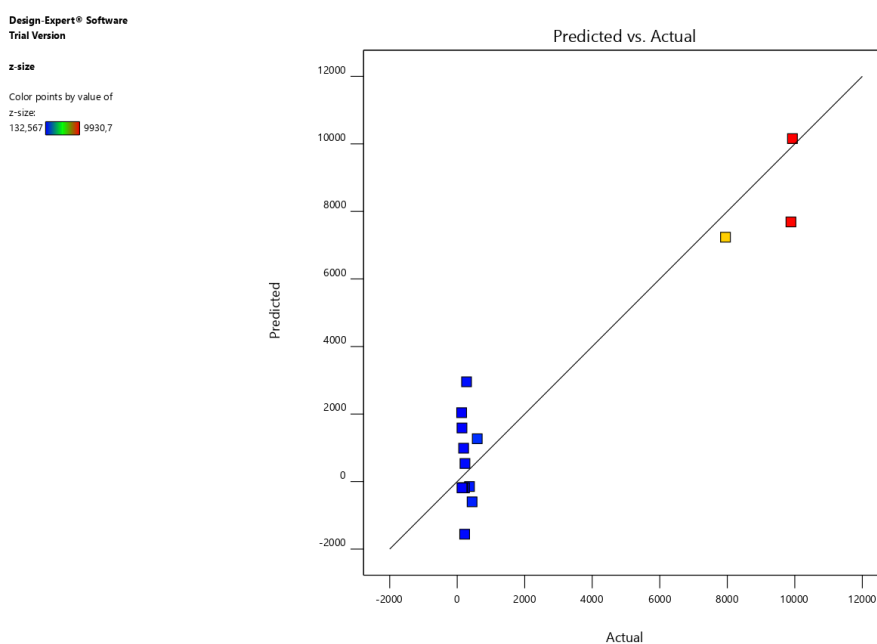
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1,786E+08	6	2,976E+07	12,08	0,0004	significant
A-CS	8,979E+07	1	8,979E+07	36,45	0,0001	
B-TPP	9,568E+06	1	9,568E+06	3,88	0,0770	
C-KoE 6	4,105E+05	1	4,105E+05	0,1667	0,6917	
AB	2,514E+07	1	2,514E+07	10,21	0,0096	
A ²	4,859E+07	1	4,859E+07	19,72	0,0013	
C ²	3,470E+06	1	3,470E+06	1,41	0,2627	
Residual	2,463E+07	10	2,463E+06			
Lack of Fit	2,463E+07	6	4,105E+06	4598,07	< 0.0001	significant
Pure Error	3570,80	4	892,70			
Cor Total	2,032E+08	16				

Πίνακας 40: Πίνακας R² μοντέλου (TYR-βCD/CS).

R²	0,8788
Adjusted R²	0,8060
Predicted R²	0,2583
Adeq Precision	11,6316

Η τιμή “Predicted R²” αποκλίνει αρκετά από το “Adjusted R²”, δηλαδή περισσότερο από 0,2. Η μεγάλη αυτή διαφορά θα μπορούσε να επιλυθεί με επιπλέον απλοποίηση του μοντέλου, για παράδειγμα την ελάττωσή του προς γραμμικό. Η τιμή “Adequate Precision” είναι ικανοποιητική εφόσον ξεπερνά την τιμή 4 (αφορά τον λόγο σήμα/θόρυβο).

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές βάση του μοντέλου που επιλέχθηκε.



Διάγραμμα 23: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R₁: TYR-βCD/CS).

Από το μοντέλο που εφαρμόστηκε προκύπτει η **εξίσωση** (κωδικοποιημένη):

$$R_1 = -185,97 - 3350,14 A + 1093,59 B - 226,53 C - 2506,92 AB + 3392,22 A^2 + 906,57 C^2 \quad (9)$$

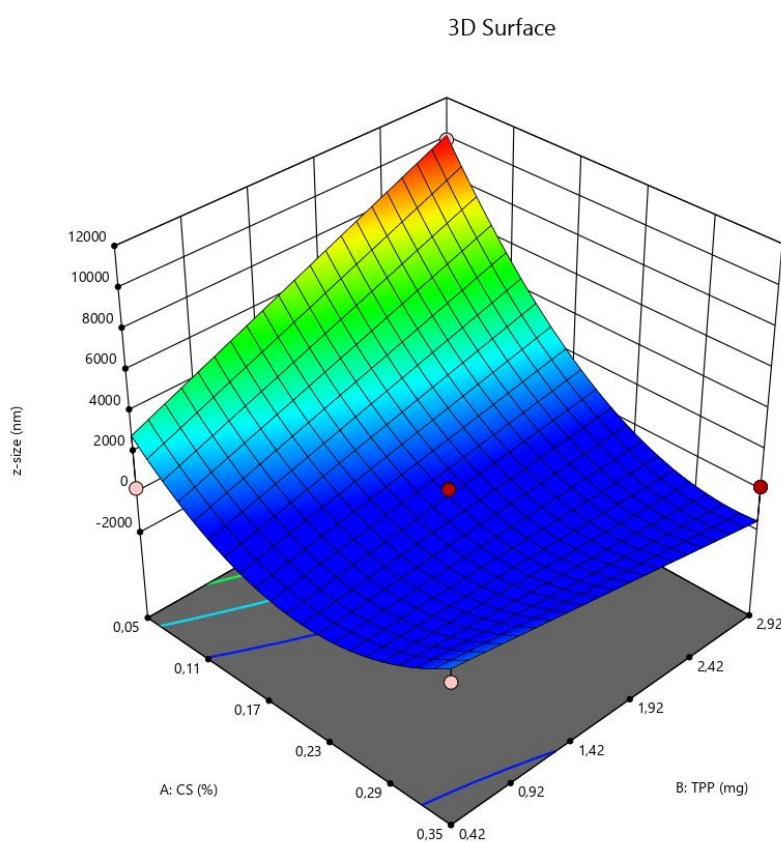
Τέλος, κατά την επιβεβαίωση του μοντέλου, τα επιπλέον σημεία βρισκόταν εντός ορίων του μοντέλου, γεγονός που το θέτει ως ικανοποιητικό μοντέλο περιγραφής.

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

z-size (nm)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
132,567 9930,7

X1 = A: CS
X2 = B: TPP

Actual Factor
C: KoE 6 = 10



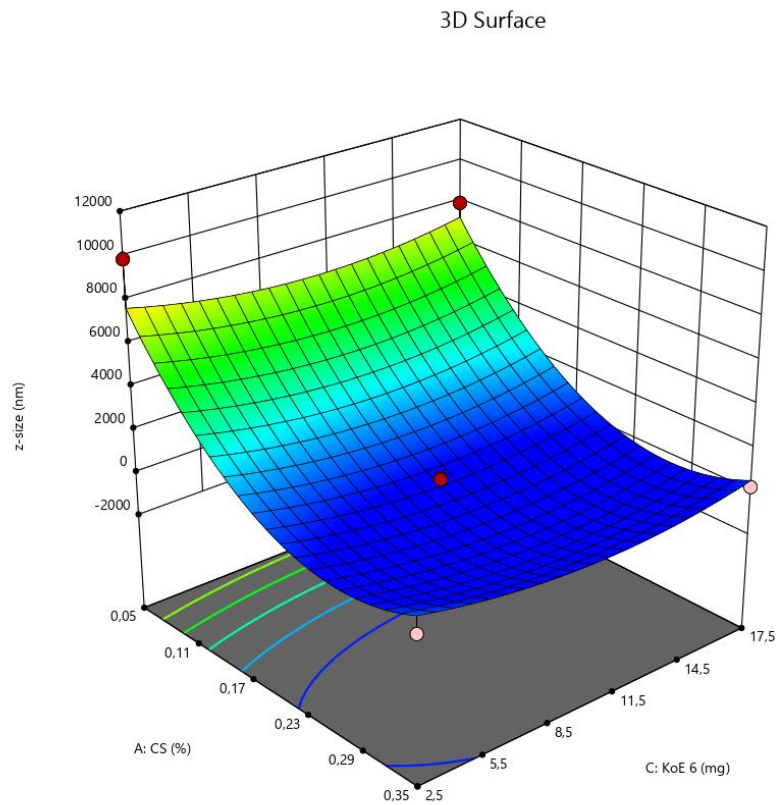
Διάγραμμα 24: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-μεγέθους (TYR-βCD/CS).

Design-Expert® Software
 Trial Version
 Factor Coding: Actual

z-size (nm)
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 132,567 9930,7

X1 = A: CS
 X2 = C: KoE 6

Actual Factor
 B: TPP = 1,67



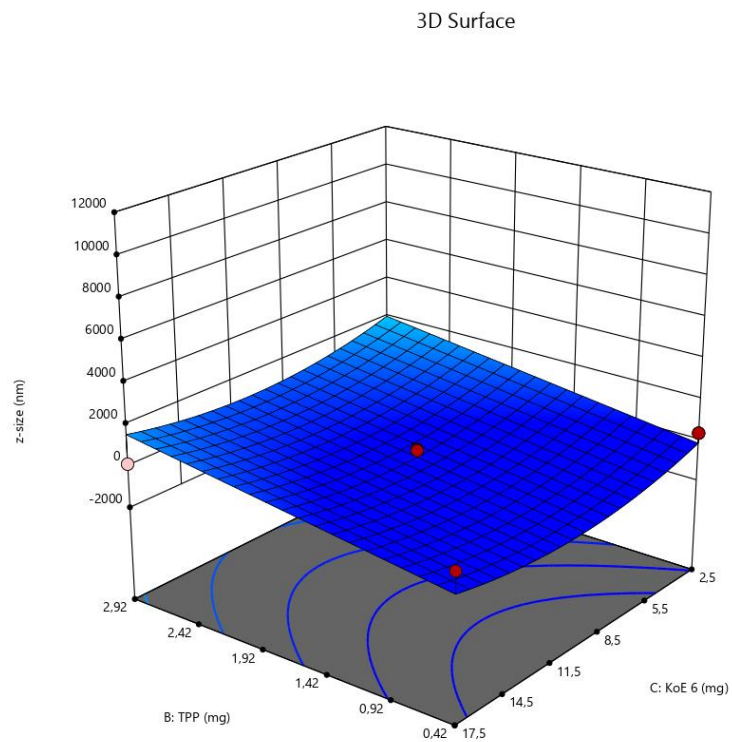
Διάγραμμα 25: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης ΚοΕ6-CS-μεγέθους (TYR-βCD/CS).

Design-Expert® Software
 Trial Version
 Factor Coding: Actual

z-size (nm)
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 132,567 9930,7

X1 = B: TPP
 X2 = C: KoE 6

Actual Factor
 A: CS = 0,2



Διάγραμμα 26: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-ΚοΕ6-μεγέθους (TYR-βCD/CS).

Από τα γραφήματα παρατηρείται αυτό που αναλύθηκε και παραπάνω αριθμητικώς. Η ποσότητα της TYR δεν επιδρά σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα.

Το σημείο με το **μικρότερο μέγεθος** είναι το ΚοΕ74 με συντεταγμένες **(0,+1,-1)**, σύμφωνα με τον πίνακα 40. Γενικά, παρατηρούμε από τα γραφήματα ότι το μοντέλο τείνει στο ελάχιστο σε περιοχές με συγκέντρωση CS σχετικά αυξημένη.

Το σημείο που αντιστοιχεί στο **μεγαλύτερο μέγεθος** είναι το σύμπλοκο ΚοΕ66 **(-1,+1,0)**. Σε αυτό το σημείο, η ποσότητα TPP είναι αρκετά υψηλή για τη συγκέντρωση της CS. Η εξήγηση είναι αντίστοιχη και με την περίπτωση TYR-CS που εμφάνιζε μέγιστο στις ίδιες συντεταγμένες **(-1,+1,0)**.

Απόκριση R₂: ζ-δυναμικό

Το πιο κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της απόκρισης «ζ-δυναμικό» κρίθηκε ότι ήταν το **τετραγωνικό (quadratic model)**.

Πίνακας 41: ANOVA για την R₂ (TYR-βCD/CS).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2148,22	9	238,69	24,02	0,0002	significant
A-CS	1375,50	1	1375,50	138,40	< 0,0001	
B-TPP	147,92	1	147,92	14,88	0,0062	
C-KoE 6	51,51	1	51,51	5,18	0,0569	
AB	18,92	1	18,92	1,90	0,2101	
AC	9,00	1	9,00	0,9056	0,3730	
BC	4,20	1	4,20	0,4229	0,5363	
A ²	190,14	1	190,14	19,13	0,0033	
B ²	218,58	1	218,58	21,99	0,0022	
C ²	150,57	1	150,57	15,15	0,0060	
Residual	69,57	7	9,94			
Lack of Fit	18,48	3	6,16	0,4822	0,7123	not significant
Pure Error	51,09	4	12,77			
Cor Total	2217,78	16				

Το μοντέλο είναι πολύ ικανοποιητικό (F-value=9,43). Οι σημαντικότεροι όροι είναι αυτοί με p<0,05, δηλαδή οι A, B, A², B², C². Ο όρος C (TYR) είναι, επίσης, σημαντικός. Οι υπόλοιποι δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικοί, παρ' όλα αυτά δεν κρίνεται απαραίτητη η μείωση του μοντέλου. Τέλος, ο όρος "Lack of Fit" είναι χαμηλής σημαντικότητας, κάτι που ενισχύει την επιλογή του μοντέλου.

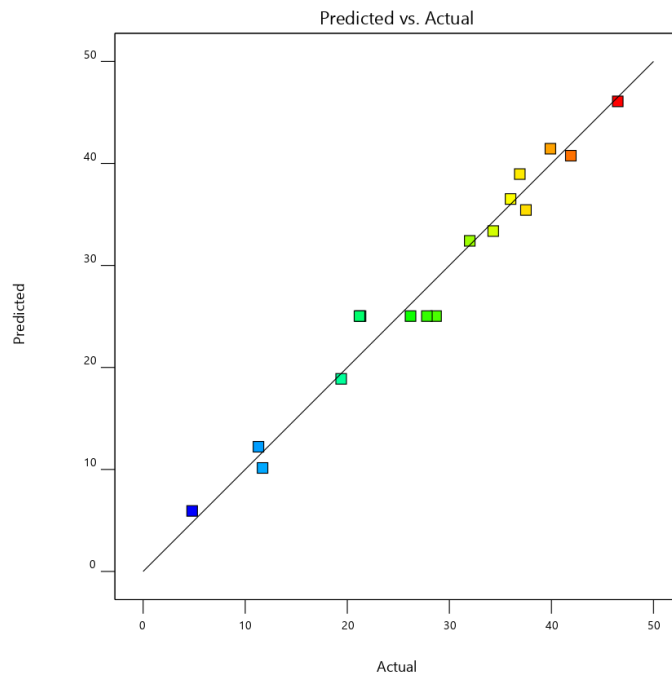
Πίνακας 42: Πίνακας R² μοντέλου (TYR-βCD/CS).

R²	0,9686
Adjusted R²	0,9283
Predicted R²	0,8307
Adeq Precision	16,6054

Όλες οι τιμές του παραπάνω πίνακα είναι πολύ ικανοποιητικές για την εγκυρότητα του μοντέλου.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η πολύ ικανοποιητική συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές βάση του μοντέλου που επιλέχθηκε.

Design-Expert® Software
Trial Version
ζ-potential
Color points by value of ζ-potential:
4,8 46,5



Διάγραμμα 27: Διάγραμμα αναμενόμενων τιμών συγκριτικά με τις πραγματικές (R₂: TYR-βCD/CS).

Από το μοντέλο που εφαρμόστηκε προκύπτει η **εξίσωση** (κωδικοποιημένη):

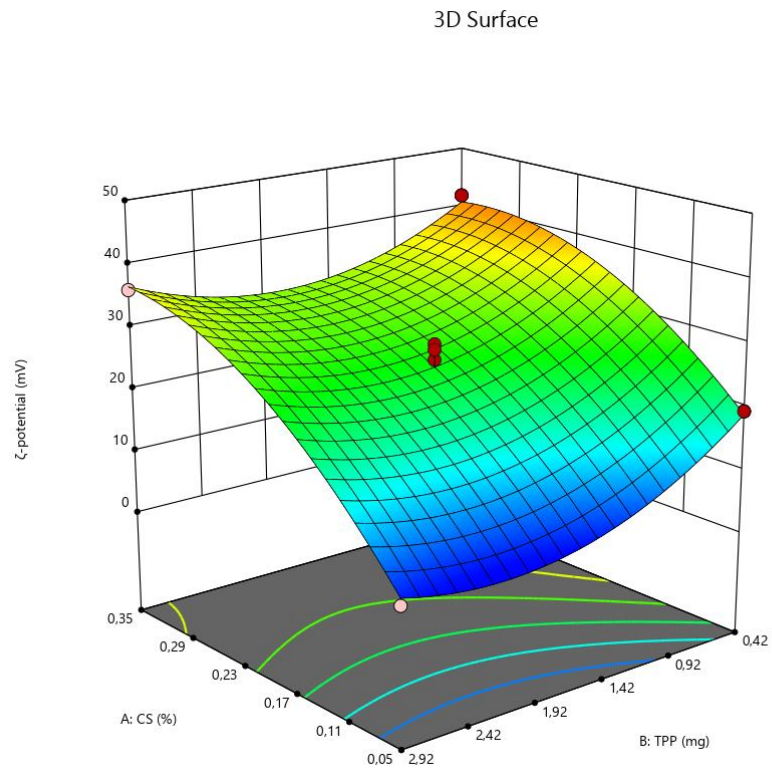
$$R_2 = 25,04 + 13,11 A - 4,30 B + 2,54 C + 2,18 AB + 1,50 AC - 1,03 BC - 6,72 A^2 + 7,21 B^2 + 5,98 C^2 \quad (10)$$

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

ζ-potential (mV)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
4,8 46,5

X1 = A: CS
X2 = B: TPP

Actual Factor
C: KoE 6 = 10



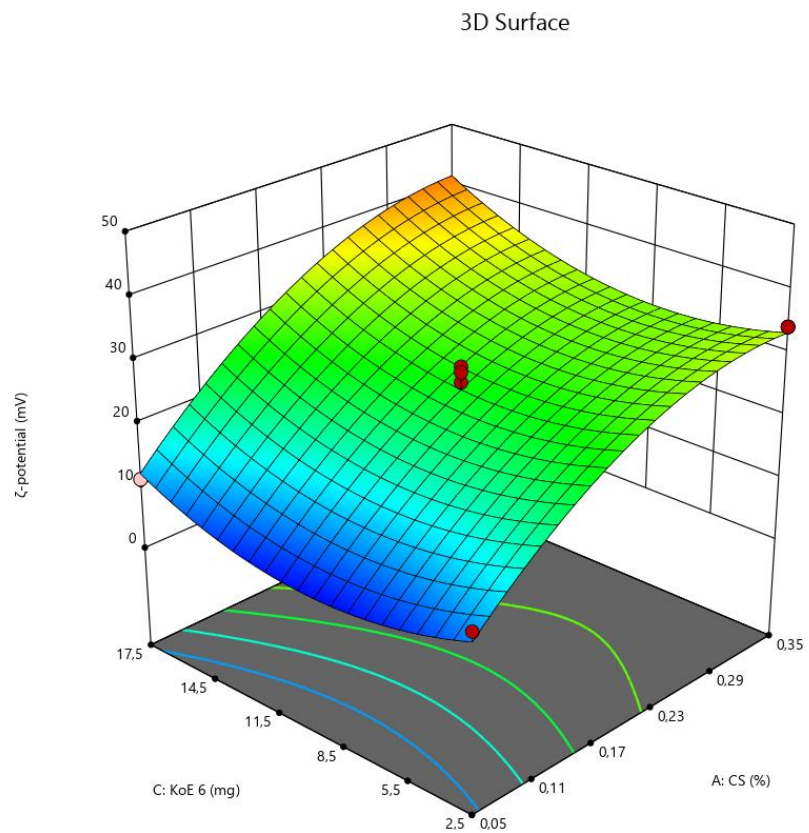
Διάγραμμα 28: : Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης CS-TPP-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).

Design-Expert® Software
Trial Version
Factor Coding: Actual

ζ-potential (mV)
Design Points:
● Above Surface
○ Below Surface
4,8 46,5

X1 = A: CS
X2 = C: KoE 6

Actual Factor
B: TPP = 1,67

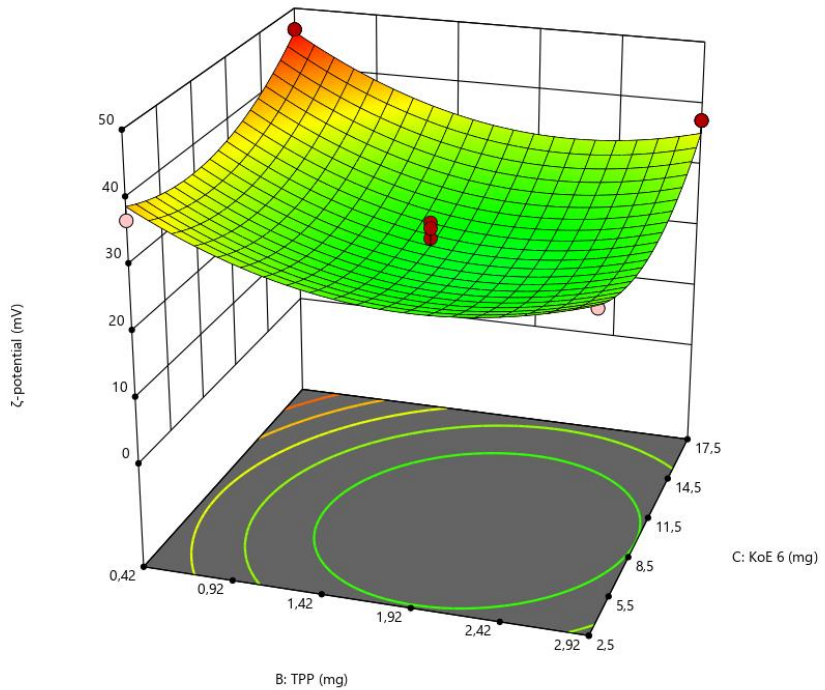


Διάγραμμα 29: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης KoE6-CS-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).

ζ-potential (mV)
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 4,8 46,5

X1 = B: TPP
 X2 = C: KoE 6

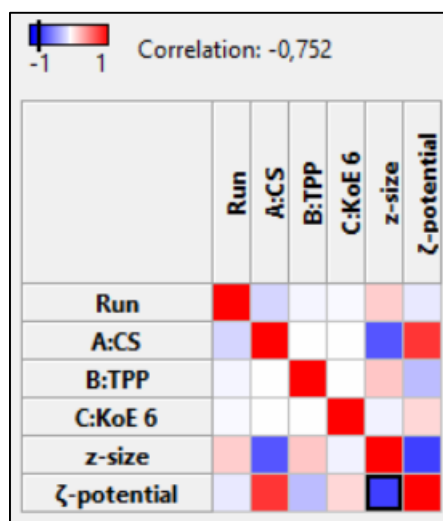
Actual Factor
 A: CS = 0,2



Διάγραμμα 30: Διάγραμμα 3 διαστάσεων συσχέτισης TPP-KoE6-ζ-δυναμικού (TYR-βCD/CS).

Στο συγκεκριμένο σχεδιασμό όλες οι αρχικές μεταβλητές ήταν σημαντικές. Συνοψίζοντας όλους τους παράγοντες ήταν το πιο επιτυχημένο μοντέλο που κατασκευάστηκε. Τέλος, και σε αυτό το μοντέλο, τα επιβεβαιωτικά πειράματα ήταν επιτυχημένα.

Η μέγιστη τιμή ζ-δυναμικού σημειώθηκε στο σημείο **(0,-1,+1)**, KoE62. Το χαμηλότερο πάλι συμπίπτει με το σύμπλοκο μεγαλύτερου μεγέθους.



Διάγραμμα 31: Γενική συσχέτιση παραγόντων και αποκρίσεων στο DoE TYR-CS.

Και σε αυτή τη σειρά πειραμάτων παρατηρήθηκε μια **αντιστρόφως ανάλογη** σχέση μεγέθους και ζ-δυναμικού.

Συγκρίνοντας και τους δύο σχεδιασμούς, μια παρατήρηση αφορά τα εύρη των μεγεθών. Στα σύμπλοκα **TYR/CS** υπάρχει μεγαλύτερο εύρος μεγέθους. Παρ' όλα αυτά, στα νανοσωματίδια **TYR-βCD/CS** εμφανίζονται περισσότερα σημεία κοντά στο μέγιστο, ενώ στα πρώτα μόνο αυτό το ακραίο σημείο απέκλινε τόσο.

Γενικά, οι ακραίες τιμές τόσο στο μέγεθος όσο και στο ζ-δυναμικό είναι συγκρίσιμες και στους δύο τύπους συστημάτων. Αυτό υποδεικνύει ότι κύριο ρόλο παίζει η CS στη μορφολογία αυτών και όχι τόσο η ουσία που θα εγκλειστεί, αφού στη συγκεκριμένη περίπτωση οι δύο ουσίες διαφέρουν αρκετά στο μέγεθος.

Από τα μοντέλα που μελετήθηκαν, το πιο επιτυχημένο ήταν αυτό που αφορούσε το ζ-δυναμικό για τα νανοσωματίδια TYR-βCD/CS. Γενικά, τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για το ζ-δυναμικό είναι πιο ακριβή. Αυτά που αφορούν το μέγεθος χρήζουν βελτίωσης.

4. Συμπεράσματα – Μελλοντική Έρευνα

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε ο εγκλεισμός του φυσικού αντιοξειδωτικού τυροσόλη σε διαφορετικούς φορείς. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν:

A) σύμπλοκα εγκλεισμού τυροσόλης με β-κυκλοδεξτρίνη (TYR-βCD),

B) νανοσωματίδια χιτοζάνης με εγκλεισμένη τυροσόλη (TYR-CS) και

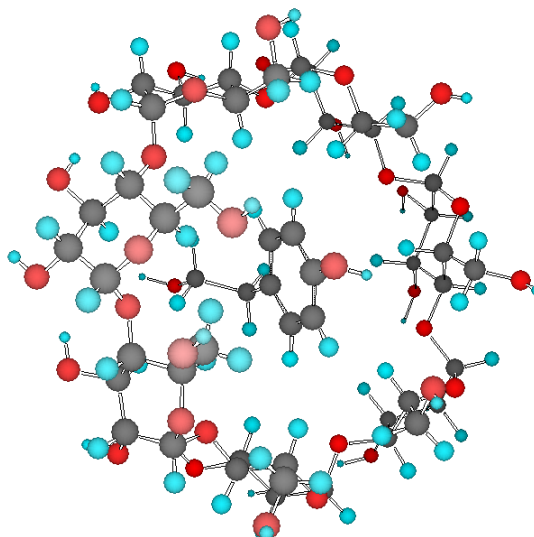
Γ) νανοσωματίδια χιτοζάνης με εγκλεισμένο το σύμπλοκο τυροσόλης-β-κυκλοδεξτρίνης (TYR-βCD/CS).

Μελετήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι παρασκευής καθώς και οι συνθήκες αυτών, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της εκάστοτε διεργασίας. Στα νανοσωματίδια CS, το μεγαλύτερο μέρος της μελέτης έγινε μέσω Πειραματικού Σχεδιασμού DoE.

Η δομή και η μορφολογία των νανοσωματιδίων μελετήθηκαν με πληθώρα τεχνικών χαρακτηρισμού και εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Όσον αφορά τα σύμπλοκα **TYR-βCD** που προέκυψαν από τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, η χαμηλότερη αναλογία που απομονώθηκε επιτυχώς ήταν η TYR:βCD 1:1,2. Όταν το ποσοστό της TYR αυξάνεται, μειώνεται το ποσοστό συσσωμάτωσης λόγω εξωτερικών αλληλεπιδράσεων της βCD με την TYR, και συνεπώς μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων.
- Και στις δύο μεθόδους εγκλεισμού της **TYR** στη **βCD** πραγματοποιείται ο εγκλεισμός με απόδοση εγκλεισμού 13,2% στη μέθοδο της συγκαταβύθισης και 100% προσεγγιστικά για τη μέθοδο της λειοτρίβησης. Η TYR που εμφανίζεται εξωτερικά, όπως πιστοποιείται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR και FT-IR, μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποια μορφή ισορροπίας μεταξύ της κοιλότητας της βCD και του περιβάλλοντος, είτε σε TYR που είναι εξωτερικά προσδεδεμένη.
- Δεδομένου ότι στη μέθοδο της **λειοτρίβησης** δεν ακολουθεί έκπλυση, όλη η ποσότητα της TYR παραμένει στο συλλεγόμενο προϊόν. Ακόμα και αν δεν έχει εγκλειστεί όλη η ποσότητα της δραστικής ουσίας, αυτή η μέθοδος ενδείκνυται όταν ακολουθεί εγκλεισμός του συμπλόκου σε δεύτερο φορέα.
- Όταν παρασκευάζονται σύμπλοκα εγκλεισμού TYR-βCD στην ίδια ποσοτική κλίμακα και παρόμοιας στοιχειομετρίας, προκύπτουν και από τις δύο μεθόδους παρεμφερή μεγέθη και ζ-δυναμικό. Στην περίπτωση, όμως της ανακλιμάκωσης στη διπλάσια ποσότητα με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, εμφανίζεται αρκετά υψηλότερο ζ-δυναμικό, άρα και σταθερότητα του κolloειδούς συστήματος.
- Συνολικά, η μέθοδος της **λειοτρίβησης** είναι ταχύτερη, πιο απλή, και μπορούν να παραχθούν νανοσωματίδια μεγάλου εύρους στοιχειομετρίας. Αντίθετα, η μέθοδος της **συγκαταβύθισης** έχει πιο συγκεκριμένο εύρος στοιχειομετριών που μπορούν να συλλεχθούν με συμβατικές μεθόδους. Παρ' όλα αυτά επιτυγχάνεται μεγαλύτερος εγκλεισμός στο εσωτερικό της κοιλότητας της βCD.

- Τέλος, όσον αφορά τα σύμπλοκα **TYR-βCD** η πιθανότερη διαμόρφωση είναι ο εγκλεισμός του αρωματικού τμήματος μέσα στην κοιλότητα της βCD. Λόγω στερεοχημικών παραγόντων, το πιο πιθανόν είναι η υδροξυλομάδα της φαινόλης να βρίσκεται προσανατολισμένη προς το στενότερο τμήμα της κοιλότητας, ενώ το αιθανολικό τμήμα προς το μεγαλύτερο άνοιγμα του κώνου. Αυτό το συμπέρασμα συμφωνεί και με βιβλιογραφικές αναφορές.²⁵



Σχήμα 18: Πιθανή διαμόρφωση του συμπλόκου εγκλεισμού TYR-βCD.

- Στην παρασκευή νανοσωματιδίων **CS**, κρίθηκε απαραίτητη τόσο η χρήση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (TWEEN -80), όσο και του παράγοντα διασταύρωσης, για την ομοιομορφία των μεγεθών και την ελάττωσή τους. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε ότι η TYR μπορεί εν μέρει να λειτουργήσει και ως παράγοντας διασταύρωσης, μειώνοντας επιπλέον τα μεγέθη.
- Όλες οι συνθήκες κατά την παρασκευή των **CS NPs** παίζουν καθοριστικό ρόλο στο τελικό προϊόν. Συνεπώς, πρέπει τα πειράματα να επαναλαμβάνονται κάτω από αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες (σκεύη, ταχύτητα ανάδευσης, διάρκεια κλπ.). Η ανακλιμάκωση επηρεάζει και αυτή την πειραματική διεργασία. Τέλος, όπως, ήταν και αναμενόμενο, το pH φαίνεται να επηρεάζει, επίσης, το τελικό αποτέλεσμα, αλλά δε μελετήθηκε εκτενώς στη συγκεκριμένη έρευνα.
- Η απομόνωση των **CS NPs** είναι αρκετά επίπονη διεργασία, και η μέθοδος που ακολουθήθηκε επηρέαζε το τελικό μέγεθος και ζ-δυναμικό. Θετικό αποτέλεσμα ήταν ότι σε κάθε περίπτωση το PDI μειώθηκε με αυτή τη σειρά διεργασιών.
- Εντυπωσιακή είναι η μείωση του μεγέθους των NPs, όταν η **TYR** ή σύμπλοκο **TYR-βCD** εγκλείονται σε **CS**. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο TYR-CS μπορεί να σχηματίσει νανοσωματίδια μικρότερα των κενών νανοσωματιδίων CS, ενώ τα σύμπλοκα **TYR-βCD/CS** είναι πολύ μικρότερα από τα αντίστοιχα σύμπλοκα της βCD. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε αλληλεπίδραση της κατιονικής CS με την βCD και την TYR.

- Στις περιπτώσεις των **TYR-CS** που μελετήθηκαν, η αντιοξειδωτική δράση της TYR παρουσιάζεται αυξημένη μετά από τον εγκλεισμό της στο φορέα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην επιπλέον αντιοξειδωτική δράση του φορέα, είτε στη δομή του συμπλόκου, λόγω σταθεροποίησης.
- Ο εγκλεισμός στο πολυμερές CS επιβεβαιώνεται τόσο στα σύμπλοκα **TYR-CS**, όσο και στα **TYR-βCD/CS** (κυρίως μέσω των τεχνικών FT-IR, TGA, αλλά και του προσδιορισμού του ΕΕ%).
- Από το **DoE** των συμπλόκων **TYR-CS** προέκυψε απλοποιημένο τετραγωνικό μοντέλο περιγραφής της απόκρισης του μεγέθους και το γραμμικό για το ζ-δυναμικό. Το μοντέλο που αφορά το μέγεθος βελτιώθηκε αλλά χρήζει περαιτέρω βελτίωσης. Το ζ-δυναμικό περιγράφεται αρκετά ικανοποιητικά από το μοντέλο που επιλέχθηκε. Για τις συγκεκριμένες αρχικές συνθήκες, το εύρος μεγέθους είναι 115,3 έως 13230nm και του ζ-δυναμικού 4,3 έως 46,4 mV. Το μικρότερο μέγεθος συνολικά είναι κοντά στο κεντρικό σημείο. Το ζ-δυναμικό μεγιστοποιείται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της CS και μειώνεται αυτή του TPP.
- Από το **DoE** των συμπλόκων **TYR-βCD/CS** προέκυψε απλοποιημένο τετραγωνικό μοντέλο για την απόκριση του μεγέθους και το τετραγωνικό μοντέλο για το ζ-δυναμικό. Το μοντέλο που αφορά το μέγεθος βελτιώθηκε αλλά δε βελτιστοποιήθηκε. Το μοντέλο για το ζ-δυναμικό θα μπορούσε να είναι ένα από τα βέλτιστα μοντέλα περιγραφής του. Για τις συγκεκριμένες αρχικές συνθήκες, το εύρος μεγέθους είναι 132,6-9930,7nm και του ζ-δυναμικού 4,8 έως 46,5 mV. Το μικρότερο μέγεθος είναι στο σημείο (0,+1,-1), αλλά γενικά μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση CS. Το ζ-δυναμικό και πάλι εμφανίζει τάση αύξησης με την αύξηση της συγκέντρωσης της CS και τη μείωση του παράγοντα TPP.
- Η σύνθεση της **mCS** δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί μέσω NMR, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι συντέθηκε το επιθυμητό προϊόν. Το υλικό που παρασκευάστηκε ήταν σε αρκετά μεγάλες διαστάσεις και ξέφευγαν από την κλίμακα των νανομέτρων, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στη δυσκολία διαλυτοποίησης του φορέα. Ακολουθήθηκαν οι ίδιες συνθήκες παρασκευάστηκαν τα κενά CS NPs και δε μελετήθηκε εκτενέστερα εναλλακτική μέθοδος παρασκευής.

Μερικές προτάσεις για τη συνέχιση της παραπάνω έρευνας και βελτιστοποίησης των αποτελεσμάτων είναι:

- Δοκιμή της χρήσης αCD, ώστε να εξεταστεί το ενδεχόμενο ισχυρότερης πρόσδεσης του μορίου. Εναλλακτικά, μπορεί να δοκιμαστεί η χρήση γCD με ταυτόχρονη αύξηση της στοιχειομετρίας της TYR.
- Μελέτη της συμπεριφοράς των συμπλόκων TYR-βCD σε ανακλιμάκωση της διεργασίας.
- Να μελετηθεί ο ρυθμός μείωσης του IC₅₀ στην περίοδο του χρόνου, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την κινητική της δέσμευσης των ριζών από το εκάστοτε αντιοξειδωτικό.

- Ανάπτυξη DoE όπου θα αντικατασταθεί ο παράγοντας της ποσότητας της εγκλεισμένης ουσίας, με άλλον που θα επηρεάζει περισσότερο το μοντέλο (π.χ. θερμοκρασία).
- Μελέτη της EE% μέσω DoE για τα σύμπλοκα της CS.
- Μελέτη των συμπλόκων και του εγκλεισμού μέσω 2D-NMR, για την καλύτερη κατανόηση της δομής του συμπλόκου εγκλεισμού.
- Επιπλέον χαρακτηρισμός μέσω DSC, Raman και θερμοδυναμικών πειραμάτων.
- Εκτενέστερη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης για τα σύμπλοκα TYR-βCD και τα νανοσωματίδια TYR-CS, αλλά και σύγκριση με το προφίλ απελευθέρωσης των συνδυαζόμενων φορέων.
- Ανάπτυξη πειραματικής διεργασίας με αντικατάσταση του TPP με ποσότητα της εγκλεισμένης ουσίας.
- Ανάπτυξη πειραματικής διεργασίας για το σχηματισμό νανοσωματιδίων mCS και μελέτη αυτών με DoE.
- Χρήση παραγώγων της βCD ή/και της CS ως φορείς.
- Εκτενέστερη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων που συντέθηκαν.
- Απεικόνιση των πιθανών διαμορφώσεων των συμπλόκων μέσω μοριακής μοντελοποίησης και προσομοίωσης.

5. Παράρτημα

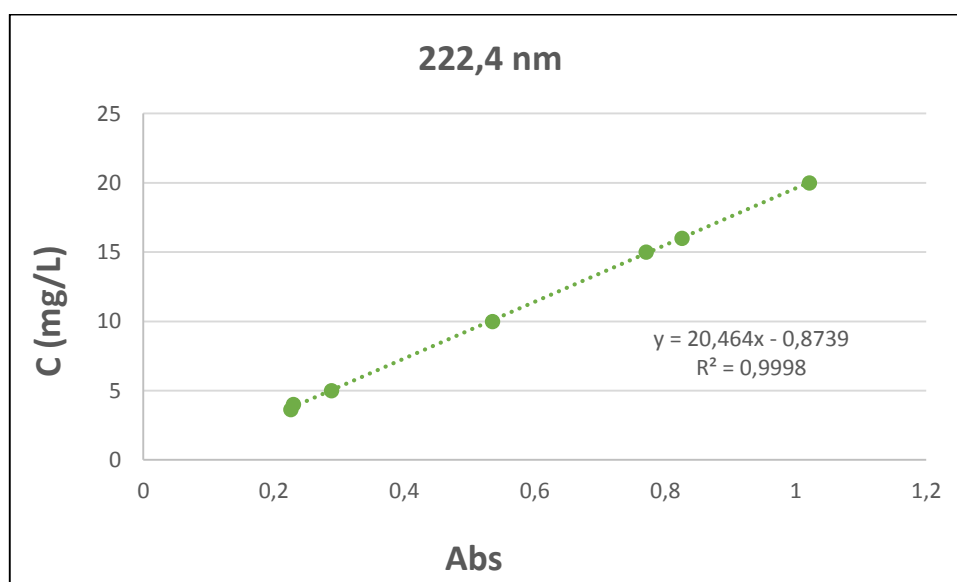
5.1. Καμπύλη αναφοράς καθαρής ένωσης TYR

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της TYR, παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα 0,4mg/20mL σε διαλύτη H₂O:EtOH. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις επί του αρχικού δείγματος, ώστε να λάβουμε σημεία απορρόφησης στην περιοχή 0,1-1. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για το Διάγραμμα 29 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 43: Απορρόφηση της TYR σε διάφορες συγκεντρώσεις στα 222,4nm και 276,8nm.

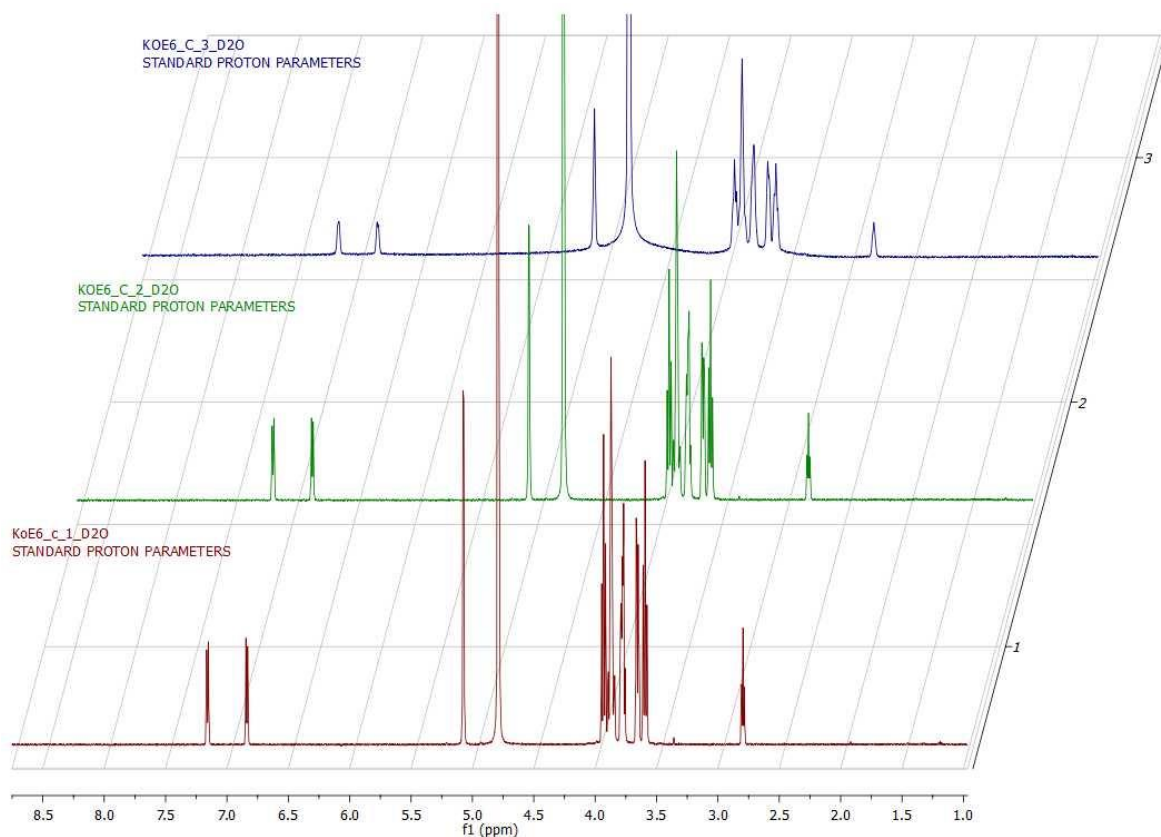
αραίωση (δείγμα/διαλύτης)	C (mg/L)	nm	Abs	nm	Abs
-	20	222,4	1,021	276,8	0,240
4/1	16	222,4	0,826	276,8	0,202
3/1	15	222,4	0,771	276,8	0,189
1/1	10	222,4	0,535	276	0,224
1/3	5	222,4	0,289	273,8	0,208
1/4	4	222,0	0,230	271,8	0,230
2/9	3,636	221,6	0,226	-	-

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, η TYR εμφανίζει κορυφή σε 2 περιοχές. Η μία βρίσκεται κατά προσέγγιση στα 222,4nm και η άλλη στα 276,8nm. Παρ' όλα αυτά για την καμπύλη αναφοράς καθώς και για άλλες περαιτέρω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε αυτή των 222,4nm. Ο λόγος που δεν προτιμήθηκε η δεύτερη είναι ότι εμφάνιζε πολύ μικρές διαφοροποιήσεις απορρόφησης στις αντίστοιχες διαφορές συγκέντρωσης, πράγμα που θα επέφερε μεγαλύτερο υπολογιστικό σφάλμα.



Διάγραμμα 32: Καμπύλη αναφοράς TYR στα 222,4nm, σε διαλύτη H₂O:EtOH 2:1.

5.2. NMR



Διάγραμμα 33: Φάσματα NMR του συμπλόκου ΚοΕ6 σε D₂O, σε χρόνους t=0 (κόκκινο), t=20min (πράσινο) και t=40min (μπλε).

ΚοΕ6, t=0

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 7.165, 7.151, 6.845, 6.831, 5.076, 5.070, 4.790, 3.947, 3.931, 3.915, 3.892, 3.871, 3.862, 3.847, 3.841, 3.789, 3.779, 3.772, 3.768, 3.756, 3.666, 3.660, 3.649, 3.643, 3.609, 3.594, 3.578, 2.808, 2.796, 2.784.

ΚοΕ6, t=20

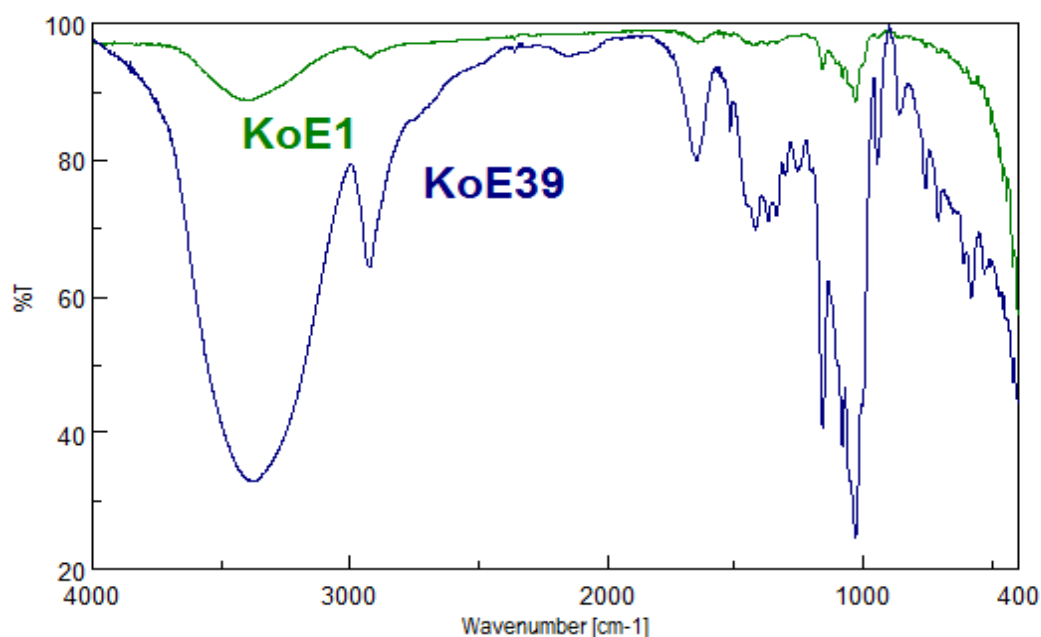
¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 7.164, 7.150, 6.844, 6.830, 5.074, 5.070, 4.790, 3.946, 3.930, 3.914, 3.892, 3.870, 3.862, 3.840, 3.788, 3.767, 3.755, 3.664, 3.660, 3.648, 3.643, 3.608, 3.592, 3.577, 2.807, 2.795, 2.783

ΚοΕ6, t=40

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 7.162, 7.151, 6.843, 6.831, 5.071, 4.79, 3.945, 3.930, 3.915, 3.893, 3.869, 3.840, 3.787, 3.772, 3.840, 3.660, 3.609, 3.593, 3.578, 2.807, 2.795, 2.783.

Σημείωση: Στην τελευταία μέτρηση t=40min φαίνεται να υπάρχει και κάποιο σφάλμα μέτρησης από το μηχάνημα.

5.3. FT-IR



Διάγραμμα 34: Φάσμα IR KoE1, KoE39.

Πίνακας 44: Κορυφές IR KoE1, KoE39.

Wavenumber [cm ⁻¹]	%T	Wavenumber [cm ⁻¹]	%T
KoE1		KoE39	
3860.79	93.3532	3397.96	88.7362
3378.67	32.8198	2921.63	95.0225
2925.48	64.3421	1641.13	97.0862
2153.13	95.1465	1415.49	96.7634
1643.05	79.9039	1157.08	93.2089
1516.74	84.2245	1079.94	92.079
1416.46	69.902	1028.84	88.4587
1368.25	71.0656	577.576	91.0808
1336.43	71.8657	516.829	87.8926
1301.72	77.809	502.366	85.1821
1252.54	78.4108	472.474	80.5511
1157.08	40.6485	457.047	76.9164
1079.94	37.8786	442.583	74.0919
1028.84	24.5413	418.477	64.4388
945.913	79.5141		
860.096	86.7807		
755.959	75.9881		
707.747	71.1316		
608.431	64.9283		
580.469	60.0121		
527.436	63.3382		
458.011	58.182		
419.442	47.6551		

Πίνακας 45: Κορυφές IR TYR, βCD, ΚοΕ6.

Wavenumber [cm ⁻¹]	%T	Wavenumber [cm ⁻¹]	%T	Wavenumber [cm ⁻¹]	%T
TYR		βCD		ΚοΕ6	
3851.15	96.7194	3376.75	14.615	3861.76	96.9919
3389.28	74.7751	2924.52	50.7534	3375.78	57.1678
3148.22	78.4965	1643.05	66.8134	2924.52	73.8351
3023.84	81.2383	1414.53	52.258	2157.95	96.4895
2954.41	82.6141	1368.25	53.2976	1645.95	88.2315
2927.41	81.9423	1336.43	54.4445	1616.06	88.3929
2878.24	80.5511	1302.68	62.0815	1516.74	80.533
2675.75	87.8061	1260.25	66.2559	1423.21	79.9306
2592.82	89.7092	1157.08	18.8577	1370.18	79.3223
2481.94	91.72	1079.94	16.8037	1335.46	80.4787
1883.15	92.6412	1028.84	7.24922	1300.75	84.5978
1613.16	90.7256	946.877	65.4171	1244.83	81.8003
1597.73	86.9933	860.096	77.5142	1204.33	83.857
1513.85	78.4994	755.959	60.5359	1156.12	61.5776
1474.31	89.7139	707.747	55.2008	1079.94	59.8029
1452.14	86.6734	609.396	46.2141	1028.84	49.1652
1360.53	85.6699	577.576	39.5444	1000.87	60.3832
1345.11	85.4017	528.4	47.3692	943.985	84.3939
1232.29	79.2908	419.442	37.8583	858.168	88.9708
1182.15	91.0707			753.066	85.2073
1169.62	89.6998			705.819	82.812
1105.98	85.1511			575.647	73.4924
1051.98	80.5476			516.829	76.1364
1014.37	84.525			471.51	74.0006
934.342	96.1882			440.655	69.7278
866.846	90.0703			418.477	62.8796
817.67	74.3352				
729.925	88.2294				
712.569	90.4186				
555.398	76.4326				
485.974	79.8766				
472.474	79.46				
444.512	72.9722				
432.941	71.9919				
419.442	61.6746				

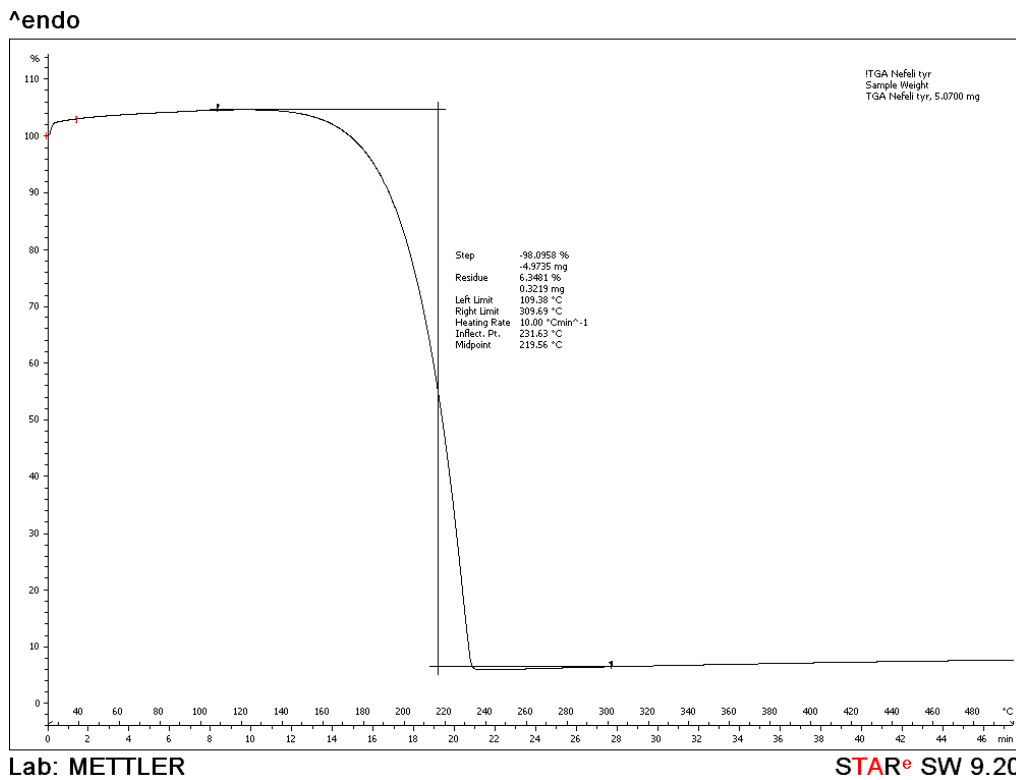
Πίνακας 46: Κορυφές IR CS 0,2%, ΚοE51, ΚοE68.

Wavenumber [cm ⁻¹]	%T	Wavenumber [cm ⁻¹]	%T	Wavenumber [cm ⁻¹]	%T
CS 0,2 %		ΚοE51		ΚοE68	
3411.46	84.9333	3388.32	83.84	3399.89	81.4082
2924.52	90.7222	2927.41	91.4646	2924.52	90.8267
1634.38	93.2046	1558.2	94.4163	1643.05	92.9158
1566.88	93.2428	1513.85	92.31	1565.92	92.917
1383.68	93.9057	1408.75	96.4735	1411.64	92.9426
1091.51	85.563	1236.15	95.5451	1249.65	96.1346
526.471	95.6541	1053.91	93.4785	1156.12	88.1148
490.795	94.9694	818.634	95.4438	1079.94	83.8599
480.188	95.2823			1030.77	81.8993
469.582	94.1186			575.647	94.3924
443.547	93.1562			526.471	94.4131
418.477	87.6791			469.582	93.3891
				457.047	92.3131
				442.583	91.0419
				418.477	82.542

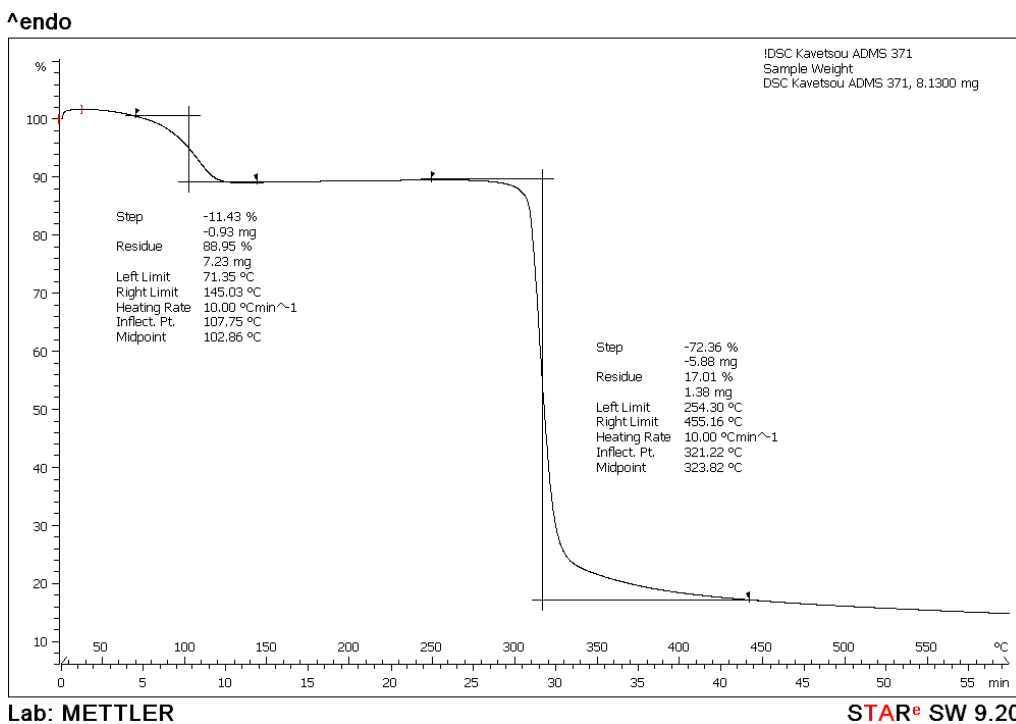
Πίνακας 47: Κορυφές IR ΚοE81.

Wavenumber [cm ⁻¹]	%T
ΚοE81	
3413.39	78.9666
2924.52	88.3585
2137.71	98.0239
1659.45	87.0754
1377.89	89.7223
1156.12	86.1573
1029.8	80.9483
575.647	89.0747
493.688	88.7965
484.045	88.4545
458.011	88.7815
442.583	87.508
419.442	84.7807
404.978	80.7368

5.4. TGA

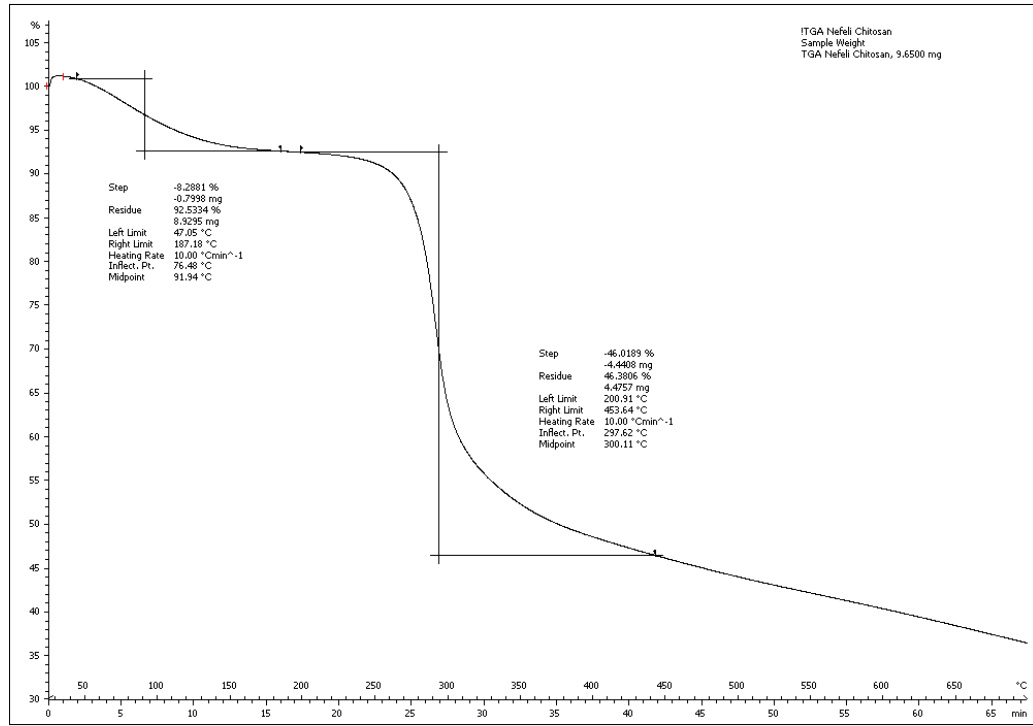


Διάγραμμα 35: TGA TYR.



Διάγραμμα 36: TGA βCD.

^endo



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Διάγραμμα 37: TGA CS.

6. Βιβλιογραφία

1. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K., Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation* **2012**, 2 (1), 2.
2. Rakesh, M.; Divya, T.; Vishal, T.; Shalini, K., Applications of Nanotechnology. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery* **2015**, 5 (1), 1.
3. Singh, R.; Lillard Jr, J. W., Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology* **2009**, 86 (3), 215-223.
4. Saallah, S.; Lenggoro, I. W., Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal* **2018**, 35, 89-111.
5. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I., Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
6. Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W., Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* **2012**, 7 (8), 1253-1271.
7. Gattoo, M. A.; Naseem, S.; Arfat, M. Y.; Mahmood Dar, A.; Qasim, K.; Zubair, S., Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international* **2014**, 2014, 10.1155/2014/498420.
8. Kumari, A.; Singla, R.; Guliani, A.; Yadav, S. K., Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI journal* **2014**, 13, 265.
9. Pal, K.; Paulson, A. T.; Rousseau, D., Biopolymers in controlled-release delivery systems. In *Modern biopolymer science*, Elsevier: 2009; pp 519-557.
10. Hu, Q.-D.; Tang, G.-P.; Chu, P. K., Cyclodextrin-based host-guest supramolecular nanoparticles for delivery: from design to applications. *Accounts of chemical research* **2014**, 47 (7), 2017-2025.
11. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-4Hydroxyphenyl ethanol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-4Hydroxyphenyl%20ethanol#section=Structures)
#section=Structures.
12. Queimada, A. J.; Mota, F. L.; Pinho, S. P.; Macedo, E. A., Solubilities of biologically active phenolic compounds: measurements and modeling. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, 113 (11), 3469-3476.
13. www.chemspider.com/Chemical-Structure.9964.html.
14. Covas, M.; Miro-Casas, E.; Fito, M.; Farre-Albadalejo, M.; Gimeno, E.; Marrugat, J.; De, R. L. T., Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under experimental and clinical research* **2003**, 29 (5-6), 203-206.
15. Napolitano, A.; De Lucia, M.; Panzella, L.; d'Ischia, M., The chemistry of tyrosol and hydroxytyrosol: implications for oxidative stress. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Elsevier: 2010; pp 1225-1232.
16. www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0004284
17. Tasioula-Margari, M.; Tsabolatidou, E., Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants* **2015**, 4 (3), 548-562.
18. Kalogerakis, N.; Politi, M.; Foteinis, S.; Chatzisyneon, E.; Mantzavinos, D., Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of environmental management* **2013**, 128, 749-758.

19. Romero, C. n.; Brenes, M., Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, *60* (36), 9017-9022.
20. Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jakobušić Brala, C., Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* **2019**, *24* (10), 2001.
21. Chandramohan, R.; Pari, L.; Rathinam, A.; Sheikh, B. A., Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-biological interactions* **2015**, *229*, 44-54.
22. www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebId=CHEBI:1879.
23. Fernando, I. S.; Kim, M.; Son, K.-T.; Jeong, Y.; Jeon, Y.-J., Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *Journal of medicinal food* **2016**, *19* (7), 615-628.
24. San Miguel-Chávez, R., Phenolic antioxidant capacity: a review of the state of the art. In *Phenolic Compounds-Biological Activity*, 2017; pp 59-74.
25. Aree, T.; Jongrungruangchok, S., Structure–antioxidant activity relationship of β -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay. *Carbohydrate polymers* **2018**, *199*, 661-669.
26. Del Valle, E. M., Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry* **2004**, *39* (9), 1033-1046.
27. Λιακοπούλου-Κυριακίδου, Μ., Βιοοργανική Χημεία. εκδόσεις ΖΗΤΗ: Θεσσαλονίκη, 2004; pp 139-141.
28. Saha, S.; Roy, A.; Roy, K.; Roy, M. N., Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific reports* **2016**, *6*, 10.1038/srep35764.
29. www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=C987830.
30. <https://3dprint.nih.gov/discover/3dpx-004342>.
31. Chatjigakis, A. K.; Donze, C.; Coleman, A. W.; Cardot, P., Solubility behavior of. beta.-cyclodextrin in water/cosolvent mixtures. *Analytical Chemistry* **1992**, *64* (14), 1632-1634.
32. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/betaCYCLODEXTRIN#section=Experimental-Properties>.
33. www.chemspider.com/Chemical-Structure.10469496.html.
34. Verstichel, S.; De Wilde, B.; Fenyvesi, E.; Szejtli, J., Investigation of the aerobic biodegradability of several types of cyclodextrins in a laboratory-controlled composting test. *Journal of Polymers and the Environment* **2004**, *12* (2), 47-55.
35. Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A., Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (7), 3088-3116.
36. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Rai, A. K., Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2010**, *2* (2), 72-79.
37. Kotronia, M.; Kavetsou, E.; Loupassaki, S.; Kikionis, S.; Vouyiouka, S.; Detsi, A., Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in β -cyclodextrin (β -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes. *Bioengineering* **2017**, *4* (3), 74.
38. Lorenc-Grabowska, E., Effect of micropore size distribution on phenol adsorption on steam activated carbons. *Adsorption* **2016**, *22* (4-6), 599-607.
39. Kfoury, M. In *Préparation, caractérisation physicochimique et évaluation des propriétés biologiques de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines: applications à des principes actifs de type phénylpropanoïdes*, Université du Littoral Côte d'Opale: 2015.

40. Muzib, I. In *Chitosan Nanoparticles-An Emerging Trend In Nanotechnology*, 2014; pp 204-229.
41. Pontillo, A. R. N.; Detsi, A., Nanoparticles for ocular drug delivery: modified and non-modified chitosan as a promising biocompatible carrier. *Nanomedicine* **2019**, *14* (14), 1889-1909.
42. Khattak, S.; Wahid, F.; Liu, L.-P.; Jia, S.-R.; Chu, L.-Q.; Xie, Y.-Y.; Li, Z.-X.; Zhong, C., Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **2019**, *103* (5), 1989-2006.
43. Bellich, B.; D'Agostino, I.; Semeraro, S.; Gamini, A.; Cesàro, A., "The good, the bad and the ugly" of chitosans. *Marine drugs* **2016**, *14* (5), 99.
44. Muxika, A.; Etxabide, A.; Uranga, J.; Guerrero, P.; De La Caba, K., Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *105*, 1358-1368.
45. Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y., Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine drugs* **2015**, *13* (8), 5156-5186.
46. Sivashankari, P.; Prabakaran, M., Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, Elsevier: 2017; pp 117-133.
47. Amini, Y.; Amel Jamehdar, S.; Sadri, K.; Zare, S.; Musavi, D.; Tafaghodi, M., Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Bio-medical materials and engineering* **2017**, *28* (6), 613-620.
48. Nikolić, V.; Ilić-Stojanović, S.; Petrović, S.; Tačić, A.; Nikolić, L., Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, Elsevier: 2019; pp 587-625.
49. Παυλάτου, Ε. Α.; Παπαδοπούλου-Φέρμελη, Ν.; Ψαρράς, Κ., *Εργαστηριακές Σημειώσεις: "Χαρακτηρισμός υδατικών διαλυμάτων διασποράς νανοσωματιδίων με δυναμική σκέδαση φωτός"*. Εργ. Γενικής Χημείας, Σχολή Χημ. Μηχανικών, ΕΜΠ: Αθήνα, 2017.
50. Rizvi, S. A.; Saleh, A. M., Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2018**, *26* (1), 64-70.
51. Carter, M.; Shieh, J. C., *Guide to research techniques in neuroscience*. Academic Press: 2015.
52. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. Εκδ. Κωσταράκης: 2005.
53. Kedare, S. B.; Singh, R., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology* **2011**, *48* (4), 412-422.
54. Μαυρομούστακος, Θ.; Ματσούκας, Ι., *NMR*. Εκδ. Γ. Β. Παρισιανός: 2005.
55. McMurry, J., *Οργανική Χημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
56. www.masterorganicchemistry.com/2016/11/23/quick_analysis_of_ir_spectra.
57. Wunderlich, B., Thermal Analysis. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology (Second Edition)*, 2001; pp 9134-9141.
58. <https://www.statease.com/docs/v12/tutorials/>.
59. Durakovic, B., Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences* **2017**, *5* (3).
60. Trivedi, D.; Spandana, A.; Kuppusamy, G.; Karri, V. V. S. R., Design of Experiments: Optimization and Applications in Pharmaceutical Nanotechnology. *Chemical Science Review and Letters*. **2015**, 109-120.

61. Cao, B.; Adutwum, L. A.; Oliynyk, A. O.; Lubber, E. J.; Olsen, B. C.; Mar, A.; Buriak, J. M., How to optimize materials and devices via design of experiments and machine learning: Demonstration using organic photovoltaics. *ACS nano* **2018**, *12* (8), 7434-7444.
62. Weissman, S. A.; Anderson, N. G., Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development* **2014**, *19* (11), 1605-1633.
63. Morshedi, A.; Akbarian, M., Application of response surface methodology: design of experiments and optimization: a mini review. *J Fund Appl Life Sci* **2014**, *54*, 2434-9.
64. Sarabia, L. A.; Ortiz, M. C., 1.12 - Response Surface Methodology. In *Comprehensive Chemometrics*, Brown, S. D.; Tauler, R.; Walczak, B., Eds. Elsevier: Oxford, 2009; pp 345-390.
65. Μίχου, Ε. Σχεδιασμοί αποκριτικών επιφανειών. Πανεπιστήμιο Πειραιώς, 2017.
66. <https://functionbay.com/documentation/onlinehelp/default.htm#!Documents/boxandbehnkendesignbbd.htm>.
67. García-Padial, M.; Martínez-Ohárriz, M.; Isasi, J.; Vélaz, I.; Zornoza, A., Complexation of tyrosol with cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2013**, *75* (3-4), 241-246.
68. Petrović, G. M.; Stojanović, G. S.; Radulović, N. S., Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. *J. Med. Plants Res* **2010**, *4* (14), 1382-1390.
69. Lúcio, M.; Nunes, C.; Gaspar, D.; Ferreira, H.; Lima, J. L.; Reis, S., Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro. *Food Biophysics* **2009**, *4* (4), 312-320.
70. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox#section=2D-Structure>.
71. Wu, D.; Hu, L.; Wang, Y.; Wei, Q.; Yan, L.; Yan, T.; Li, Y.; Du, B., EDTA modified β -cyclodextrin/chitosan for rapid removal of Pb (II) and acid red from aqueous solution. *Journal of colloid and interface science* **2018**, *523*, 56-64.
72. Roy, J. C.; Salaün, F.; Giraud, S.; Ferri, A.; Chen, G.; Guan, J., Solubility of chitin: solvents, solution behaviors and their related mechanisms. *Solubility of Polysaccharides; Xu, Z., Ed.; InTech: Vienna, Austria* **2017**, 109-127.
73. Tanaka, K.; Nishida, K.; Gabrys, B. J.; Lawrence, M. J.; Kanaya, T., Critical dissolution ionic strength of aqueous solution of chitosan hydrochloride salt. *Sen'i Gakkaishi* **2014**, *70* (9), 225-231.