

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΟΥΣ ΝΑΡΙΝΓΙΝΗ ΣΕ ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

Διπλωματική Εργασία

Πετρίδου Γεωργία

<u>Επιβλέπουσα:</u>

Δρ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

AOHNA 2019

Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, να εργαστώ στην ομάδα της και να δουλέψω υπό την καθοδήγηση της. Οι συμβουλές της και η εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπο μου τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας επιτυχώς.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π κα. Σταματίνα Βουγιούκα και στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κέκο, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ιωάννα Πιττερού, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., για την άψογη συνεργασία μας, τη συνεχή υποστήριξη αλλά και για την προθυμία της να απαντήσει σε οποιοδήποτε ερώτημά μου κατά την διεξαγωγή της εργασίας αυτής. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μου προσφέρει τις γνώσεις και την επιστημονική εμπειρία της.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Διδάκτορα Ελένη Καβέτσου για την υποστήριξη και βοήθειά της κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την αρμονική συνεργασία και το πάντα ευχάριστο κλίμα που υπήρχε, καθιστώντας ευκολότερη τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να λείπουν τα αγαπημένα μου πρόσωπα, φίλοι εντός και εκτός σχολής, για την αμέριστη συμπαράσταση που μου πρόσφεραν και φυσικά ο σημαντικότερος αρωγός και υποστηρικτής αυτής της προσπάθειας, η οικογένειά μου η οποία μου προσέφερε ανιδιοτελώς όσα χρειαζόμουν για να ολοκληρώσω τον κύκλο σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

Πετρίδου Γεωργία Αθήνα 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φλαβονοειδή είναι φυσικά προϊόντα και αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεωνδευτερογενών μεταβολιτών. Εκτός από τη σημασία τους στα φυτά, τα φλαβονοειδή είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία λόγω της υψηλής φαρμακολογικής δράσης τους ως αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη.

Η ναρινγίνη ανήκει στην υποομάδα των φλαβανονών και αποτελεί ένα βασικό συστατικό στα εσπεριδοειδή, κυρίως στο γκρέιπφρουτ. Διαθέτει πολυάριθμες βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες μεταξύ αυτών αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, καρδιοαγγειακές και αντικαρκινικές δράσεις.

Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού βιοδραστικών μορίων έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών, καθώς βελτιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εγκλεισμένων ουσιών, βοηθούν στη στοχευμένη και ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων, καθώς και στην προστασία ασταθών/ευαίσθητων ενώσεων. Η χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων για τον εγκλεισμό βιοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα μεγάλο τομέα ερευνών τόσο στην Ιατρική, τη Φαρμακευτική όσο και στην Κοσμετολογία, όπου το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πολυμερές, καθώς είναι ένα βιοσυμβατό, βιοαποικοδομήσιμο υλικό και μπορεί να προέρχεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Ένα άλλο δημοφιλές πολυμερές με ανάλογη χρήση είναι η χιτοζάνη, η οποία είναι υδρόφιλη ένωση που διογκώνεται όταν διασπείρεται στο νερό.

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί ο εγκλεισμός φλαβονοειδών με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και πιο συγκεκριμένα της ναρινγίνης σε πολυμερικά νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA). Ο στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας νέα μεθόδου παραγωγής νανοσωματιδίων μέσω της μελέτης της διεργασίας εγκλεισμού των ενώσεων με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης - εξάτμισης του διαλύτη και ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων προϊόντων.

Ειδικότερα, κατά την πειραματική διαδικασία ο εγκλεισμός της ναρινγίνης και η παρασκευή κενών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη. Τα νανοσωματίδια που πάρθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη διασποράς και το ζ-δυναμικό με χρήση της μεθόδου της Δυναμικής σκέδασης Φωτός (DLS). Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε έμμεσα η απόδοση εγκλεισμού της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και η μελέτη της δομής των νανοσωματιδίων μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) πραγματοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των πρώτων υλών, των νανοσωματιδίων και τον υπολογισμό της συμβατότητας και αναμειξιμότητας μεταξύ δραστικής ουσίας και πολυμερούς. Μελετήθηκε η απελευθέρωση της ουσίας in vitro και αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ουσία σε in vitro δοκιμές.

Τέλος, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ικανότητα επικάλυψης νανοσωματιδίων πολύ(γαλακτικού οξέος) από χιτοζάνη καθώς μπορεί να προσκολλάται στην επιφάνεια αρνητικά φορτισμένων νανοσωματιδίων.

Επιστημονική Περιοχή: Οργανική Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία, Νανοτεχνολογία

<mark>Λέξεις-Κλειδιά</mark>: Αντιοξειδωτική δράση, Πολυ(γαλακτικό οξύ), Χιτοζάνη, Νανοεγκλεισμός, Νανοσωματίδια, Απελευθέρωση, Κινητική

ABSTRACT

Flavonoids are natural products, which comprise a large group of polyphenolic compounds and secondary metabolites. Besides their importance in plants, flavonoids are important for human health because of their significant pharmacological activities such as antioxidant and anti-inflammatory.

Naringin belongs to the group of flavanones and is a basic ingredient in citrus fruits, mainly in grapefruit. It possesses numerous biological and pharmacological properties including antioxidant, antiinflammatory, and anticancer activities.

Encapsulation of active ingredients in polymeric nanoparticles has tremendous potential, as it can improve the physicochemical characteristics thus enhancing penetration for a better efficacy, help target specific cells thus resulting in better drug delivery, as well as protect unstable/sensitive compounds. Nanoencapsulation of active ingredients has been extensively studied in Medicine, Pharmaceutical and Cosmetics fields, where poly (lactic acid) (PLA) is a widely used polymer, as it is a biocompatible, biodegradable and bio-based material. Another popular biocompatible carrier is chitosan, a hydrophilic natural polysaccharide that swells when dispersed in water.

The scope of this diploma thesis is the encapsulation of flavonoids, particularly naringin, in poly (lactic acid) (PLA) nanoparticles. The main purpose of this thesis is the development of a new method of preparing nanoparticles, by studying the process of encapsulation with the emulsification – solvent evaporation technique and the characterization of the manufactured products.

The preparation of blank and loaded nanoparticles was achieved via the emulsification-solvent evaporation technique. Size, polydispersity index and ζ-potential determinations of encapsulated nanoparticles were performed by Dynamic Light Scattering (DLS). UV-Vis spectrometry was utilized to determine the encapsulation efficiency both directly (by the determination of the encapsulated drug mass) and indirectly (by the determination of the non-encapsulated substance). Thermal analysis by TGA (Thermogravimetric Analysis) was carried out for the characterization of the raw materials, of nanoparticles, and to assess the drug-polymer compatibility and miscibility. FT-IR infrared spectroscopy was used to study the interactions between the drug and polymer. In vitro drug release study was carried out and the antioxidant activity of the loaded nanoparticles was evaluated in in vitro tests.

Finally, it was considered appropriate to study the coating ability of poly (lactic acid) nanoparticles from chitosan as it can adhere to the surface of negatively charged nanoparticles.

Scientific Area: Nanotechnology, Medicinal Chemistry, Organic Chemistry

Key words: antioxidant activity, poly(lactic acid) (PLA), chitosan, nanoencapsulation, nanoparticles, drug release, kinetics

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΛΗ	8
1 1 Γενικά Στοιχεία	8
1.1.2 Χριμκά Δομή και Ταξινόμηση Φλαβονοειδών	8
1.1.2 Αιμακή Δομή και ταξινομήση Φλαρονοείοων	11
	11
1.1.4 βιολογική οραστικοτητά 1.1.4 Ι Δυτιοξειδιωτικό δράση	11
1.1.4.1 Αντισζεισωτική σραση	12
1.1.4.2 Αντικαρκινική δράση	12
1.1.4.5 Averaphenetic path	12
$1.15 \pm 1005 \lambda_{\text{SUGD}} = 1000 \lambda_{\text{SUGD}} = 1000$	13
1.1.5.1 Hoteleon in the map $V_{\rm ev}$	13
1.1.5.2 Χημική Δομη και οιστητές παριογισης	14
Αντιοξειδωτική Δράση	14
Αντιφλεγμονώδη Λράση	14
1.1.5.4 Δυνητική Θεραπευτική Δράση	14
Αντικαρκινική Δράση	15
1.2 ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	15
1.2.1 Πολύ(γαλακτικό οξύ)	15
1.2.1.1 Χημική δομή και ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος)	16
1.2.1.3 Βιοαποικοδόμηση πολύ(γαλακτικού οξέος)	17
1.2.1.4 Πολυ(γαλακτικό οξύ) και νανοεγκλεισμός	18
1.2.2 Χιτοζάνη	19
1.2.2.1 Χημική δομή και ιδιότητες Χιτοζάνης	19
1.2.2.3 Χιτοζάνη και νανοεγκλεισμός	20
1.3 ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ	21
1.3.1 Νανοεγκλεισμός και Νανοσυστήματα	21
1.3.2 Πολυμερικά Νανοσωματίδια	22
1.3.3 Τεχνικές Εγκλεισμού Μορίων Σε Νανοσωματίδια	24
1.3.3.1 Γαλακτωματοποίηση - Εξάτμιση του Διαλύτη	25
Η μέθοδος απλού γαλακτώματος, όπως έλαιο σε νερό (oil-in-water)	25
Η μέθοδος διπλών γαλακτωμάτων, όπως (νερό σε έλαιο) - σε νερό (water-in-oil)-in-water	26
Παράγοντες Διεργασίας	26
1.3.4 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	28
1.3.4.1 Μέγεθος, ζ-δυναμικό και σταθερότητα των νανοσωματιδίων	29

Μέγεθος (size)	29
ζ- δυναμικό (zeta potential)	29
Φυσικοχημική Σταθερότητα (Stability)	30
1.3.4.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Νανοσωματιδίων	30
1.3.5 Σκοπός και Εφαρμογές του Νανοεγκλεισμού	31
1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΝΑΝΟΦΟΡΕΙΣ	31
2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	36
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
3.1 Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός Βιοδραστικής Ένωσης	37
3.1.1 Υλικά και Αντιδραστήρια	37
3.1.2 Όργανα και Συσκευές	38
3.1.3 Παρασκευή υδατικού διαλύματος πολύ(βινυλικής αλκοόλης) (ΡVA)	38
3.1.4 Παρασκευή κενών πολυμερικών Νανοσωματιδίων (Blank NPs)	38
3.1.5 Εγκλεισμός Ναρινγίνης σε πολυμερικά Νανοσωματίδια (Loaded NPs)	39
3.2 Επικάλυψη Νανοσωματιδίων με Χιτοζάνη	39
3.2.1 Υλικά και Αντιδραστήρια	39
3.2.2 Όργανα και Συσκευές	39
3.2.3 Παρασκευή Επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων	40
3.3 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	40
3.3.1 Απόδοση Διεργασίας	40
3.3.2 Απόδοση Εγκλεισμού	40
3.3.3 Προσδιορισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους (ή δείκτη πολυδιασποράς, PDI) και ζ-δυναμικού	41
3.3.3.1 Αντιδραστήρια και Υλικά	41
3.3.3.2 Όργανα και Συσκευές	41
3.3.3.3 Πειραματική Διαδικασία	41
3.3.4 Ανάλυση συστήματος νανοσωματιδίων μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier	r (FT-IR) 42
3.3.5 Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας των νανοσωματιδίων μέσω θερμοσταθμικής ανάλυση	ς (TGA) 42
3.3.6 Μελέτη Απελευθέρωσης In Vitro	42
3.3.7 Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης	43
3.3.9.1 Αντιδραστήρια και Υλικά	43
3.3.9.2 Πειραματική Διαδικασία	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
4.1 Παρασκευή και εγκλεισμός Ναρινγίνης σε νανοσωματίδια πολύ(γαλακτικού οξέος)	45
4.2 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	46
4.2.1 Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση εγκλεισμού	47
4.2.2 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων	48
4.2.3 Μελέτη δομής νανοσωματιδίων μέσω Υπέρυθρης φασματομετρίας (FT-IR)	50
4.2.4 Θερμικές Ιδιότητες μέσω θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA)	52
4.2.5 Μελέτη Απελευθέρωσης In Vitro	53
4.2.6 Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης	57

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	61
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70
EYPETHPIO	76
Ευρετήριο Εικόνων	76
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	78
Ευρετήριο Σχημάτων	78
Ευρετήριο Πινάκων	78

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

1.1.1 Γενικά Στοιχεία

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων δευτερογενών μεταβολιτών, χαμηλού μοριακού βάρους, που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο. Ο όρος "flavone" προέρχεται από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο. Είναι βιοδραστικές ουσίες με πάνω από 9 000 γνωστές δομικές παραλλαγές. Τα φλαβονοειδή ποικίλλουν ως προς το βαθμό κορεσμού και το πρότυπο υποκατάστασης τους. Βρίσκονται άφθονα σε λουλούδια, φρούτα, φύλλα, λαχανικά, σπόρους, φλοιούς, ρίζες, τσάι και κρασί και συνεπώς περιέχονται συχνά στην ανθρώπινη διατροφή, αποτελώντας φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά και εμφανίζονται στα τρόφιμα κατά κύριο λόγο ως γλυκοζίτες και πολυμερή. Οι διατροφολόγοι εκτιμούν ότι οι άνθρωποι γενικά καταναλώνουν περίπου έναν έως δύο γραμμάρια φλαβονοειδών ανά ημέρα σε μια κανονική διατροφή. ¹⁻⁵

1.1.2 Χημική Δομή και Ταξινόμηση Φλαβονοειδών

Η δομή των φλαβονοειδών βασίζεται στη δομή 2-φαινυλοβενζοπυρόνης (C6-C3-C6), δηλαδή αποτελούνται από τη γενική δομή ενός ανθρακικού σκελετού με 15 άτομα άνθρακα, ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) και έναν ετεροκυκλικό πυρανικό δακτύλιο (C).²



Εικόνα 1. Βασική δομή φλαβονοειδών

Ανάλογα με τη θέση του συνδέσμου του αρωματικού δακτυλίου, διακρίνονται σε τρεις επιμέρους ομάδες:

- Φλαβονοειδή ή βιοφλαβονοειδή (2-φαινυλβενζοπυράνια) (1)
- Ισοφλαβονοειδή (3-βενζοπυράνια) (2)
- Νεοφλαβονοειδή (4-βενζοπυράνια) (3)



Εικόνα 2. Οι τρεις επιμέρους ομάδες των φλαβονοειδών

Οι ενώσεις αυτές συνήθως μοιράζονται ένα κοινό πρόδρομο χαλκόνης και επομένως είναι βιογενετικά και δομικά σχετιζόμενες.⁷

Έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με τη χημική τους δομή και συνήθως υποδιαιρούνται στις ακόλουθες υποομάδες, όπου παρουσιάζονται και κάποιες βασικές ουσίες που ανήκουν σ' αυτές και οι φυσικές πηγές που μπορούν να προσληφθούν:



Εικόνα 3. Υποομάδες φλαβονοειδών



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικά φλαβονοειδή από κάθε υποομάδα και οι φυσικές πηγές τους (A) flavones, (B) flavonols, (C) flavanols, (D) flavanones, (E) isoflavones, (F) anthocyanidins.⁸

1.1.3 Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών

Όλα τα φλαβονοειδή έχουν κοινό βιοσυνθετικό μηχανισμό και ως εκ τούτου έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό. Προέρχονται από τη συνένωση δύο άλλων μηχανισμών, του άλατος του σικιμικού και του μαλονικού οξέος, με αποτέλεσμα το πρώτο φλαβονοειδές που προκύπτει από τη συνένωση αυτή να είναι η χαλκόνη και στη συνέχεια με την επίδραση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων προκύπτουν οι άλλοι τύποι των φαλβονοειδών.⁹



Εικόνα 5. Βιοσύνθεση φλαβονοειδών ⁹

1.1.4 Βιολογική δραστικότητα

Οι βιοχημικές δράσεις των φλαβονοειδών και οι μεταβολίτες τους εξαρτώνται από τη χημική τους δομή και από τον σχετικό προσανατολισμό των διαφόρων τμημάτων επί το μόριο. Λόγω της σύνθετης δομής τους, δηλαδή η παρουσία αρκετών λειτουργικών ομάδων στο μόριο τους, οδηγεί σε πολλαπλές ενδο- και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, μπορούν να αλληλοεπιδρούν με βιολογικούς στόχους σε διαφορετικά υποκυτταρικά σημεία που επηρεάζουν τη βιολογική δραστικότητα σε φυτά και θηλαστικά.

Διάφοροι ερευνητές μελετώντας τα φλαβονοειδή, ανακάλυψαν πως μία πολύ σημαντική ιδιότητά τους είναι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Ακόμη, in vitro πειραματικά συστήματα έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση.^{12, 13}

1.1.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η σημαντικότερη ιδιότητα που κατέχει σχεδόν κάθε ομάδα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά, μειώνοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών και συμβάλλοντας στην καταπολέμηση τους. Οι φλαβόνες και κατεχίνες φαίνεται να είναι τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή για την προστασία του οργανισμού έναντι των δραστικών ριζών οξυγόνου.

Τα κύτταρα και οι ιστοί του σώματος απειλούνται συνεχώς από τις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και οι ρίζες οξυγόνου. Οι κυτταρικές αυτές βλάβες μπορεί να προκαλέσουν μετατόπιση στο καθαρό φορτίο του κυττάρου, αλλάζοντας την ωσμωτική πίεση, που οδηγεί σε οίδημα και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Τα φλαβονοειδή μπορούν να αποτρέψουν τη ζημιά που προκαλείται στο κύτταρο με διάφορους μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι η άμεση δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλής δραστικότητας ομάδα υδροξυλίου των φλαβονοειδών αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες, καθιστώντας τες ανενεργές. ^{14, 15}

1.1.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα φλαβονοειδή έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία οφείλεται στην αναστολή μερικών ενζυμικών συστημάτων, τα οποία εμπλέκονται κατά το σχηματισμό και την εξέλιξη της φλεγμονής. Συγκεκριμένα, η τυροσίνη και η σερίνη-θρεονίνη επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργεία των ενζυμικών συστημάτων, συμμετέχοντας στον σχηματισμών διεργασιών αντιφλεγμονώδους δράσης.^{16,17}

1.1.4.3 Αντικαρκινική δράση

Τα φλαβονοειδή, ως αντιοξειδωτικά, έχει αναφερθεί πως έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την καρκινογένεση. Ιδίως μερικά φλαβονοειδή, όπως η φισετίνη, η απιγενίνη και η λουτεϊνη, είναι ισχυροί αναστολείς πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα εσπεριδοειδή, και ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα όπως η τανγκερετίνη (tangeretin) που περιέχεται στη φλούδα των κίτρων και η νοβιλετίνη (nobiletin) είναι αυτά που παρουσιάζουν την πιο έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τα υδροξυλιωμένα παράγωγα.

Σύμφωνα με μία κλινική μελέτη, προτείνεται η ύπαρξη μίας αντίστροφης σχέσης μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών και την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Η έρευνα αποδίδεται κυρίως στην κουερσετίνη, η οποία κατέχει ποσοστό μεγαλύτερο από 95% της συνολικής πρόσληψης φλαβανοειδών στη συγκεκριμένη μελέτη. Επίσης, η κουερσετίνη και η απιγενίνη έχουν την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης μελανώματος.¹⁸



Εικόνα 6. Συνοπτική αναπαράσταση των ρόλων των φλαβονοειδών σε διάφορες βιολογικές δραστηριότητες στην γεωργία και ανθρώπινη υγεία ²

1.1.5 Φλαβανόνες: Ναρινγίνη

1.1.5.1 Προέλευση της Ναρινγίνης

Τα φλαβονοειδή εσπεριδοειδών αποτελούν μια σημαντική σειρά φλαβονοειδών, όπου κυριαρχούν οι φλαβανόνες. Συγκεκριμένα, τα σημαντικότερα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από εσπεριδοειδή είναι η ναρινγίνη (naringin), ναρινγενίνη (naringenin), ναριρουτίνη (narirutin), εσπεριδίνη (hesperidin) αφού βρέθηκαν να έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες τόσο in vitro όσο και in vivo.¹⁹

Οι κύριοι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες που εμφανίζονται στα πορτοκάλια είναι η εσπεριδίνη και η ναριρουτίνη, στο γκρέιπφρουτ η ναρινγίνη και σε μικρότερο βαθμό η ναριρουτίνη και στα λεμόνια εμφανίζεται επιπλέον η εριοκιτρίνη (eriocitrin). Επίσης, οι ρουτινοζίτες (rutinosides) και οι νεοεσπεριδοζίτες (neohesperidosides) εμφανίζονται στα εσπεριδοειδή, όπου οι πρώτοι δεν προσδίδουν κάποια γεύση ενώ οι δεύτεροι δίνουν την πικρή γεύση σε κάποια από τα εσπεριδοειδή.²⁰

Η ναρινγίνη είναι ένας φλαβανοειδής γλυκοζίτης, που αποτελείται από την ναρινγενίνη, μια αγλυκόνη, και την νεοεσπεριδοζίτη, συνδεδεμένα με την υδροξυομάδα στον C-7. Στον άνθρωπο η ναρινγίνη μεταβολίζεται στην αγλυκόνη ναρινγενίνη από την ναργινάση που υπάρχει στον οργανισμό.²¹ Το όνομα της ναρινγίνης πιθανότατα προέρχεται από την σανσκριτική λέξη «narangi» η οποία σημαίνει πορτοκαλί.

1.1.5.2 Χημική Δομή και Ιδιότητες Ναρινγίνης

Η ναρινγίνη περιέχει τη βασική δομή των φλαβονοειδών συνδεδεμένη με δισακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ραμνόζης, στο τμήμα της αγλυκόνης, που ονομάζεται ναρινγενίνη, στη θέση 7. Ο μοριακός τύπος της είναι C₂₇H₃₂O₁₄ και το μοριακό της βάρος είναι 580.5 g/mol.²³



Εικόνα 7. Η δομή της ναρινγίνης

Η διαλυτότητα της ναρινγίνης σε πολικούς διαλύτες είναι χαμηλή με αποτέλεσμα να έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα.²⁴ Η διαλυτότητα της επηρεάζεται από τον αριθμό των ελεύθερων υδροξυλομάδων που παρουσιάζονται στο μόριο της. Εξαιτίας των περιορισμένων ελεύθερων υδροξυλομάδων μπορεί να διαλυθεί καλύτερα σε λιπόφιλους, μη πολικούς ή ελαφρά πολικούς διαλύτες. Επιπλέον, η διαλυτότητα επηρεάζεται έντονα από τη φύση τόσο του διαλύτη όσο και της δομής του φλαβονοειδούς αλλά και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, ειδικότερα από το pH και τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, οι πολικές αγλυκόνες ή οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών διαλύονται σε καθαρές αλκοόλες ή σε μίγματα νερού-

αλκοόλης και για λιγότερο πολικές (ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, μεθυλιωμένες φλαβόνες, φλαβονόλες), σε χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο, διαιθυλαιθέρα ή οξικό αιθύλιο.²⁵

1.1.5.3 Βιολογική Δράση

Η ναρινγίνη έχει μελετηθεί ευρέως ως προς τις βιολογικές της δράσεις. Ιδιαίτερα, παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Αντιοξειδωτική Δράση

Ως φλαβονοειδές έχει την ιδιότητα της σάρωσης και καταπολέμησης των ελευθέρων ριζών και ριζών του οξυγόνου. Με βάση ερευνητικές αναφορές, κατέχει ισχυρή δραστηριότητα σάρωσης υπεροξειδίου (IC₅₀ 192.0 ± 6.7 μM) και ανασταλτική δραστηριότητα ως προς την οξειδάση ξανθίνης (200-400 μM).

Η ιδιότητα αυτή μελετήθηκε σε ένα σύστημα NADH-φαινοζίνης-μεθανοσουλφονικού άλατος και αναλύθηκαν με αναγωγή του νιτρο-ελαφρού τετραζολίου, όπου η ναρινγίνη παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με ισχυρή ικανότητα σάρωσης ριζών.²⁶ Σε πειραματική μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί in vitro, η ναρινγίνη παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση καταπολεμώντας τις ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας την προκαλούμενη θραύση και απώλεια χρωμοσωμάτων και τη βλάβη του DNA σε ανθρώπινα λεμφοκυττάρα και σε κυτταρικές σειρές V79.²⁷ Επιπλέον, σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε πως κατέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από το σίδηρο υπεροξείδωση λιπιδίων, την οξείδωση πρωτεϊνών και τη βλάβη του DNA.²⁸

Σε πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν in vivo, επιβεβαιώθηκε η αντιοξειδωτική δράση της ναρινγίνης, καθώς διαπιστώθηκε πως αναστέλλει την πρωτεΐνη hDuox2, μέλος της οξειδωτικής οικογένειας NADPH, παρουσίασε προστατευτική δράση κατά της νεφροτοξικότητας και της ηπατοτοξικότητας που προκαλείται από το θειικό νικέλιο μέσω εξασθένησης των δεικτών τραυματισμού και της υπεροξείδωση των λιπιδίων, εμπόδισε την καρδιομυοκυτταρική και ηπατοκυτταρική βλάβη DNA που παράγεται από δαουνορουβικίνη σε ποντίκια.²⁹⁻³²

<u>Αντιφλεγμονώδης Δράση</u>

Η ναρινγίνη παρουσίασε αποτελεσματική δράση στη μείωση της έκφραση των παραγόντων σηματοδότησης που σχετίζονται με την απόκριση φλεγμονής καθώς παρουσιάζει μια ευρύ ποικιλία ως προς τους βιολογικούς στόχους και περίπλοκους μηχανισμούς δράσης.

Χαρακτηριστικά, σε in vivo μελέτη με ινδικό χοιρίδιο που παρουσίαζε χρόνια βρογχίτιδα, η ναρινγίνη μείωσε τις συγκεντρώσεις της IL-8 και του λευκοτριενίου B4 σε υγρό βρογχοκυψελιδικής πλύσης (BALF) και την μυελοϋπεροξειδοτική δράση τόσο στο BALF και αλλά και στον πνευμονικό ιστό. Επίσης αύξησε τη δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) στον πνευμονικό ιστό και ενίσχυσε το επίπεδο της λιποξίνης A4 στο BALF.³³

1.1.5.4 Δυνητική Θεραπευτική Δράση

Η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της όσο και η δυνατότητα της να διαμορφώνει ποικίλες πρωτεϊνικές εκφράσεις, καθιστούν την ναρινγίνη ως μια ενδεχόμενη θεραπευτική ουσία για πληθώρα ανθρώπινων διαταραχών και ασθενειών.

Αντικαρκινική Δράση

Η ναρινγίνη μπορεί να δράσει τόσο ως παράγοντα καταστολής όσο και ως παράγοντας αποκλεισμού. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προκαλεί απόπτωση σε μια πλειοψηφία καρκινικών κυττάρων, παίζει επίσης ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα μειώνοντας τη μετανάστευση και την εισβολή ορισμένων καρκινικών κυττάρων.³⁴⁻³⁶



Εικόνα 8. Επισκόπηση των διάφορων ασθενειών και συνθηκών στις οποίες η ναρινγίνη παρουσιάζει προστατευτική και θεραπευτική δράση ⁸⁰

1.2 ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

1.2.1 Πολύ(γαλακτικό οξύ)

Το πολύ(γαλακτικό οξύ) (PLA) είναι ένα θερμοπλαστικό, βιοδιασπώμενο πολυμερές, που έχει συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον ως ένα καινοτόμο υλικό, σε πλήθος εφαρμογών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει για τις ιατρικές του εφαρμογές, καθώς κατά την αποικοδόμηση του προκύπτει το γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι αβλαβές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Το PLA παράγεται από τον πολυμερισμό του μονομερούς γαλακτικού οξέος, το οποίο απαντάται σε δυο εναντιομερή το L- και D-γαλακτικό οξύ. Πρόκειται για έναν αλειφατικό πολυεστέρα με απλή διαδικασία παραγωγής.

Ο πολυμερισμός του γαλακτικού οξέος πραγματοποιείται κυρίως με δυο μεθόδους:

- Άμεση Συμπύκνωση: Χρησιμοποιείται διαλύτης υπό υψηλό κενό και θερμοκρασίες, για την αφαίρεση του παραγόμενου νερού κατά τη διαδικασία.
- Απουσία διαλύτη, με σχηματισμό ενός ενδιάμεσου κυκλικού διμερούς μορίου. Το ενδιάμεσο μόριο παραλαμβάνεται μέσω απόσταξης, πραγματοποιείται καταλυτικά διάνοιξη του κυκλικού δακτυλίου και πολυμερισμός της ένωσης, καταλήγοντας στο PLA.

Τα πλεονεκτήματα του PLA είναι ότι είναι βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο, μπορεί να επιμερισθεί σε μικρότερες δομικές μονάδες μέσω υδρόλυσης, μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πηγές, αλλά κυρίως επιδέχεται τροποποιήσεις που μπορούν να επιφέρουν επιδιωκόμενες τελικές ιδιότητες.³⁷⁻⁴⁰

1.2.1.1 Χημική δομή και ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος)

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) παράγεται από το γαλακτικό οξύ (2-υδροξυ προπιονικό οξύ), το οποίο είναι υγροσκοπικό και αναμίξιμο με το νερό και την αιθανόλη. Είναι χειρόμορφο, ευρισκόμενο σε δύο οπτικά ισομερείς αντίποδες, το L- και το D- (Εικόνα 9). Η αναλογία μεταξύ L- και D- εναντιομερών μορφών ρυθμίζεται από τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου.



Εικόνα 9. Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά)

Το καθαρό (άνυδρο) γαλακτικό οξύ είναι στερεό, λευκό, άοσμο κρυσταλλικό σώμα που διαλύεται πολύ εύκολα στο νερό με το οποίο σχηματίζει ένα διαυγές έως υποκίτρινο διάλυμα. Λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητάς του, στο εμπόριο διατίθεται ως διάλυμα σε νερό με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 22-90%.

Γενικά στα πολυμερή, οι τελικές ιδιότητες του υλικού εξαρτώνται από αρκετούς παράγοντες. Επομένως, και στο PLA αυτές έχουν να κάνουν με τη δομή, τα μοριακά χαρακτηριστικά του, το μοριακό βάρος, τις συνθήκες πολυμερισμού και τη θερμική ιστορία του. Αυτή η ποικιλομορφία στις ιδιότητες προσδίδει τη δυνατότητα του σχεδιασμού ενός υλικού με άριστες τελικές ιδιότητες για την εκάστοτε εφαρμογή που προορίζεται.

Το PLA παρουσιάζει πυκνότητα μεταξύ 1.21-1.43 g cm⁻³. Η σχετικά χαμηλή πυκνότητα του συνεπάγεται μείωση του βάρους και του κόστους. Είναι αδιάλυτο στο νερό και έχει μια σειρά από οργανικούς διαλύτες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν.

Ως προς τις θερμικές ιδιότητες, το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι ένα θερμοπλαστικό με ιδιότητες παρόμοιες αυτών του πολυστυρενίου. Το PLA έχει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) που κυμαίνεται μεταξύ 50-65 °C, ενώ η θερμοκρασία τήξης (T_m) του είναι σχετικά χαμηλή και παίρνει τιμές μεταξύ 130-175°C.

Οι μηχανικές ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος) ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό και κυμαίνονται από μαλακά και ελαστικά πλαστικά μέχρι σκληρά και υψηλής αντοχής υλικά. Το ημικρυσταλλικό PLLA έχει σχετικά διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες και ακολουθεί διαφορετική κινητική κατά τη διάσπασή του από το εντελώς άμορφο PDLA. Εκτός από την κρυσταλλικότητα, σημαντικό ρόλο παίζει και το μοριακό βάρος στις μηχανικές ιδιότητες του υλικού.

Οι θερμικές, μηχανικές ιδιότητες, όπως και η βιοαποικοδόμηση του εξαρτώνται από τα ισομερή που το συνιστούν, την θερμοκρασία στην οποία έγινε η επεξεργασία, το χρόνο θερμικής επεξεργασίας και το μοριακό βάρος. Πολυμερή με υψηλή περιεκτικότητα σε L-ισομερές παράγουν κρυσταλλικά προϊόντα, ενώ αυτά με υψηλά επίπεδα D- ισομερών (>15%) παράγουν άμορφα προϊόντα.

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) παρουσιάζει επίσης ηλεκτρικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των πολυμερών που προέρχονται από παράγωγα πετρελαίου. Η αντίστασή του σε διαρροή ρεύματος σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ως μονωτικό υλικό (volume resistivity), η διηλεκτρική σταθερά και άλλες ηλεκτρικές ιδιότητες μπορούν να συγκριθούν με αυτές του διασταυρωμένου πολυαιθυλενίου (XLPE) που χρησιμοποιείται ως μονωτικό υλικό σε καλώδια, και ηλεκτρικά σύρματα. Προς βελτίωση της ποιότητας και μείωση του κόστους παραγωγής, το γαλακτικό οξύ μπορεί να πολυμεριστεί μαζί με άλλα μονομερή ή να αναμειχθεί με άλλα πολυμερή, όπως συμβαίνει να αναμιγνύεται με άμυλο ώστε να αυξηθεί η βιοαποικοδομησιμότητα του. Παρόλα τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει το PLA και τις χαρακτηριστικές ιδιότητες οι οποίες είναι χρήσιμες σε πολλές εφαρμογές, η σχετικά υψηλή τιμή του περιορίζουν την χρήση του.

1.2.1.3 Βιοαποικοδόμηση πολύ(γαλακτικού οξέος)

Ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης του PLA περιλαμβάνει δύο βασικά βήματα. ⁴⁵ Στο πρώτο στάδιο, το οποίο ονομάζεται πρωταρχική αποικοδόμηση, γίνεται το σπάσιμο των αλυσίδων του πολυμερούς προς μικρότερου μοριακού βάρους τμήματα κυρίως μέσω υδρόλυσης. Αν και το PLA είναι αδιάλυτο στο νερό, όταν υπόκειται σε αποικοδόμηση, το νερό διεισδύει στη μάζα του πολυμερούς και λαμβάνει χώρα η υδρόλυση των εστερικών ομάδων της άμορφης φάσης του πολυμερούς. Ακόμη κατά την υδρόλυση αυξάνεται ο αριθμός των αλυσίδων με καρβοξυλική ομάδα στο άκρο τους, οι οποίες αυτοκαταλύουν την εστερική υδρόλυση. Αυτό το πρώτο στάδιο είναι πολύ σημαντικό επειδή τα μακρομόρια δεν μπορούν αλλιώς να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κυττάρων των μικροβίων ή βακτηρίων διαπερνώντας την εξωτερική τους μεμβράνη. Στο δεύτερο στάδιο το οποίο είναι πολύ αργό και ονομάζεται ολική βιοαποικοδόμηση, τα μικρού πλέον μοριακού βάρους τμήματα του πολυμερούς. Τα οποία έχουν εισχωρήσει στο εσωτερικό των κυττάρων των μικροβίων, μπορούν πλέον με βιολογικές διαδικασίες να μετατραπούν σε βιομάζα, ανόργανη ύλη, νερό, και διοξείδιο του άνθρακα ή μεθάνιο. Το κυριότερο ένζυμο που αποικοδομεί το PLA είναι η πρωτεϊνάση Κ.⁴⁶



Σχήμα 1. Στάδια βιοαποικοδόμησης PLA

Με λίγα λόγια το πολυμερές χρησιμοποιείται ως πηγή τροφής για τους μικροοργανισμούς και κάτω από αερόβιες συνθήκες μετατρέπεται σε βιομάζα, νερό και διοξείδιο του άνθρακα ενώ κάτω από αναερόβιες συνθήκες μετατρέπεται σε βιομάζα, νερό, διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση του PLA είναι πάρα πολλοί και έχουν σχέση με το υλικό και με το μέσο αποικοδόμησης. Όσον αφορά το υλικό παράγοντες όπως βαθμός διόγκωσης του πολυμερούς, μοριακό βάρος, στερεοχημεία και διαμόρφωση, κατανομή μοριακού βάρους, ακαθαρσίες, δομή και πάχος του υλικού, ακαμψία, υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα του τυχόν δεύτερου συστατικού στην περίπτωση συμπολυμερών και κρυσταλλικότητα επηρεάζουν την βιοαποικοδόμησης παράγοντες όπως ρΗ, θερμοκρασία, ιοντική ισχύς, ρυθμιστικό διάλυμα και συγκέντρωση μικροοργανισμών είναι ικανοί να αλλάξουν τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του πολυ(γαλακτικού) οξέος. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την βιοαποικοδόμηση του PLA σε διάφορα περιβάλλοντα όπως μικροβιακές καλιέργειες, θαλασσινό νερό, αλκαλικά μέσα, νερό, μέσα και ρυθμιστικά διαλύματα σε κατάλληλο pH και θερμοκρασία⁴⁷.

Γενικά το PLA διασπάται τόσο στο περιβάλλον όσο και στον οργανισμό (in vivo). Στο περιβάλλον, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω, διασπάται αρχικά μέσω υδρόλυσης της ομάδας εστέρα και στη συνέχεια παρουσία μικροοργανισμών με κομποστοποίηση, σε θερμοκρασία πάνω από τους 60 °C σε χρονικό διάστημα 60-180 ημερών, σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Οι μικροοργανισμοί σε υδάτινο περιβάλλον μπορούν να το διασπάσουν σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα μέσα σε έξι μήνες έως πέντε χρόνια μετά τη χρήση του, ανάλογα την εφαρμογή. Στο σώμα υδρολύεται αργά εξαιτίας της υδρόφοβης συμπεριφοράς του.⁴⁸

1.2.1.4 Πολυ(γαλακτικό οξύ) και νανοεγκλεισμός

Ένα από τα πολυμερή που χρησιμοποιείται για την διαμόρφωση νανοσωματιδίων είναι το πολύ(γαλακτικό οξύ), το οποίο έχει ερευνηθεί εκτενώς για την απελευθέρωση διαφόρων φαρμάκων. Το PLA, προτάθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την απελευθέρωση φαρμάκου για πρώτη φορά το 1971. Επίσης, έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), καθώς και από Ευρωπαϊκές ρυθμιστικές αρχές. Το PLA ως πολυεστέρας στη φύση, υφίσταται υδρόλυση κατά την παρουσία του στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, κατά την αποικοδόμηση του μετατρέπεται σε

νερό και διοξείδιο άνθρακα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, τα πολυμερικά προϊόντα βιοαποικοδόμησης σχηματίζονται με πολύ αργό ρυθμό και ως εκ τούτου δεν επηρεάζουν τη λειτουργία στα κύτταρα. Τέλος, τα πολυμερή αυτού του είδους, έχουν μελετηθεί για την τοξικότητα τους σε ζώα και έχει αποδειχθεί βάσει ερευνών ότι είναι μη τοξικά στον οργανισμό.⁴⁹

Η ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκου στον οργανισμό είναι άμεσο αποτέλεσμα της ικανότητας βιοαποικοδόμησης των φυσικών ή συνθετικών πολυμερών, τα οποία παρουσιάζοντας την κατάλληλη μορφή έχουν την ικανότητα να ελευθερώνουν τη φαρμακευτική ουσία σταδιακά και με σταθερή δόση στον οργανισμό. Η θεραπεία έτσι γίνεται απόλυτα ελεγχόμενη και στοχευμένη, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που η φαρμακευτική ουσία είναι πολύ ισχυρή και θα μπορούσε να καταστρέψει υγιείς ιστούς με τους οποίους θα ερχόταν σε επαφή, ή όταν είναι πολύ μικρή η δόση που λόγω φαινομένων διάχυσης δεν θα έφτανε στο επιθυμητό σημείο.

Το ιδανικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου πρέπει να είναι βιοσυμβατό, με μηχανική αντοχή, άνετο ως προς τον ασθενή, ασφαλές, εύκολο στο να τοποθετηθεί, να παραχθεί και να αποστειρωθεί. Τα σύγχρονα συστήματα ελέγχου μεταφοράς φαρμάκου είναι σε θέση να ανταποκριθούν σε αλλαγές του βιολογικού περιβάλλοντος και να προσαρμόσουν τη λειτουργία τους ανάλογα με τις απαιτήσεις της θεραπείας και του ασθενή. ⁵⁰⁻⁵¹

1.2.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο, πολυκατιονικό πολυμερές (πολυηλεκτρολύτης). Η χιτοζάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλής σημασίας που προέρχεται από το φυσικό προϊόν χιτίνη, η οποία απαντάται στη φύση σε υψηλώς διαταγμένες κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές και αποτελεί δομικό συστατικό των εξωσκελετών των αρθρόποδων και των κυτταρικών τοιχωμάτων διαφόρων μυκήτων και ζυμών. Η χιτοζάνη, ένα συμπολυμερές Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, και γλυκοζαμίνης, είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται από την μερική αποακετυλίωση της χιτίνης, δηλαδή από την απομάκρυνση των ακετυλομάδων και την αντικατάστασή αυτών με άτομα υδρογόνου.⁵²



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της χιτίνης σε χιτοζάνη

Η χιτοζάνη θεωρείται ως κατάλληλο και λειτουργικό υλικό για τις βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω της βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδόμησης αλλά και της αντιφλεγμονώδους δράσης της. Παρουσιάζει δε την ικανότητα προσκόλλησης και πολλαπλασιασμού κυττάρων μέσα στον οργανισμό. ⁵³

1.2.2.1 Χημική δομή και ιδιότητες Χιτοζάνης

Η χιτίνη και η χιτοζάνη έχουν παρεμφερή χημική δομή. Η χιτίνη αποτελείται από μια γραμμική αλυσίδα ακετυλογλυκοζαμινικών ομάδων και είναι πλήρως αδιάλυτη στο νερό. Η χιτοζάνη λαμβάνεται με την απομάκρυνση επαρκών ακετυλικών ομάδων (CH3-CO) από το οργανικό μόριο. Οι ελεύθερες αμινομάδες

της γλυκοζαμίνης καθιστούν την χιτοζάνη διαλυτή σε αραιά διαλύματα (pH<6) π.χ. σε διάλυμα οξικού οξέως. Σε όξινο περιβάλλον η χιτοζάνη είναι δυνατό να αποκτήσει μορφή γέλης, λόγω του ότι είναι υδρόφιλη και μπορεί να συγκρατήσει μόρια νερού μέσα στις μοριακές δομές της.

Η θέρμανση της χιτοζάνης είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό των μορίων της, καθώς και για την αποστείρωσή της. Ωστόσο η θέρμανσή της μπορεί να επηρεάσει τις φυσικές ιδιότητες της, όπως τη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα.

Οι ιδιότητες της χιτοζάνης είναι:

- το μοριακό βάρος
- ο βαθμός αποακετυλίωσης (DD)
- η καθαρότητά της
- η ικανότητα σχηματισμού υμενίων, ινών, μεμβρανών και σφαιριδίων

Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από την μέθοδο επεξεργασίας που ακολουθείται. Καθώς η χιτοζάνη απαρτίζεται από επαναλαμβανόμενες ομάδες γλυκοζαμίνης, το μήκος των μοριακών αλυσίδων αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό των μορίων της. Συνεπώς το μοριακό βάρος της χιτοζάνης αποτελεί το βασικό στοιχείο επιλογής για κάθε εξειδικευμένη χρήση της.

Συγκεκριμένα, ανάλογα με την πηγή και την διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή της χιτοζάνης το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται σε εύρος από 300 μέχρι 1000 kD και ποσοστό αποακετυλίωσης από 30% μέχρι 95%. Στην κρυσταλλική της μορφή η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματος με pH>7, ενώ διαλύεται σε οξέα δηλαδή σε υδατικά διαλύματα με pH<6, όπου οι ελεύθερες αμινικές ομάδες στη γλυκοζαμίνη διευκολύνουν τη διάλυση του μορίου.

Ο ρυθμός αποδόμησης της χιτοζάνης από βιολογικούς παράγοντες συνδέεται άμεσα με τον βαθμό κρυσταλλικότητας και κατ' επέκταση με το ποσοστό αποακετυλίωσης της.⁵⁴

1.2.2.3 Χιτοζάνη και νανοεγκλεισμός

Η χιτοζάνη έχει μελετηθεί και για τη χρήση της στην παραγωγή φορέων και συστημάτων μεταφοράς θρεπτικών ουσιών, ειδικών μορίων πρωτεϊνών και γονιδίων σε στοματική, ρινική, παρεντερική και διαδερμική χορήγηση όπως και σε μοσχεύματα. Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλα βιοσυμβατά υλικά γίνεται ώστε να επιτευχθεί η τροποποίηση των βιοχημικών ιδιοτήτων του συστήματος αλλά και των αλληλεπιδράσεων της μήτρας με τον βιολογικό ιστό και τα κύτταρα.

Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της βιοσυμβατότητα της, της δυνατότητας βιοαποικοδόμησης σε φυσιολογικά συστατικά του σώματος, της μη τοξικότητας, του γεγονότος ότι παρουσιάζει μηχανική σταθερότητα και εμφανίζει ελάχιστες αντιδράσεις ως ξένο σώμα στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η πολυκατιονική της φύση ενισχύει την έλξη των κυττάρων σε αυτήν και εξαρτάται από το βαθμό αποακετυλίωσης της χιτοζάνης ενώ η παρουσία των δραστικών αμινο- και υδροξυ- ομάδων στο μόριο της, της προσδίδουν τις χημικές και βιολογικές ιδιότητες της. Επιπλέον, η διαλυτότητα της σε υδατικό μέσο, επιτρέπει τη χρήση της χιτοζάνης σε εφαρμογές με τη μορφή αιωρημάτων, υδρογελών, επικαλύψεων και ινών.

Παρόλα αυτά, οι εφαρμογές της χιτοζάνης είναι περιορισμένες λόγω της μη διαλυτότητας της σε κοινούς οργανικούς διαλύτες και πλήρης διάλυσης σε υδατικά διαλύματα σε φυσιολογικό και όξινο pH, το οποίο είναι αποτέλεσμα των ισχυρών ενδομοριακών και διαμοριακών δυνάμεων υδρογόνου που λαμβάνουν

χώρα. Επομένως, οι επιθυμητές λειτουργίες της για συγκεκριμένες εφαρμογές μπορούν να επιτευχθούν με χημικές τροποποιήσεις. 55-57

1.3 ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

1.3.1 Νανοεγκλεισμός και Νανοσυστήματα

Ο εγκλεισμός βιοδραστικών ενώσεων αντιπροσωπεύει μία αποτελεσματική προσέγγιση για την απελευθέρωσή τους, την αύξηση της φυσικής τους σταθερότητας, την προστασία τους από αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον, τον περιορισμό της πτητικότητάς και την ενίσχυση της βιοδραστικότητας τους.

Ο εγκλεισμός ουσιών σε βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για να εγκλειστούν βιοδραστικά μόρια σε μια μήτρα ή κέλυφος, η οποία αποτελεί πλέον τη προτιμητέα επιλογή στην ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων. Τα νανοσωματίδια (NPs) ορίζονται ως στερεά κολλοειδή σωματίδια που διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους (Εικόνα 11). Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι το μέγεθος τους, γενικά θεωρείται ότι κυμαίνεται περίπου στα 5-100 nm, με ένα ανώτερο όριο μεγέθους τα 1000 nm περίπου. Συγκεκριμένα, η περιοχή που λαμβάνεται πλέον είναι στα 100-500 nm. Επιπλέον χαρακτηριστικά τους αποτελούν η επιφάνεια και το σχήμα που προκύπτει με βάση τη διάταξη τους στο χώρο (Εικόνα 12). 58-59

Biodegradable/

biocompatible

nanoparticles

Drug nanoparticle

conjugates



caccod

Liposomes

Polymeric micelles



Nanospheres, nanocapsules. nanotubes



nanostructures







Nanoparticle drug

carriers

Stimuli-based drug

releasing

nanoparticles







nanoconjugates



Metal nanoparticles

Carbon nanoparticles

Magnetic nanoparticles

Nanocomposites





Silica nanoparticles



Εικόνα 12. Ιδιότητες νανοσωματιδίων

Τα βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από μια μεγάλη ποικιλία υλικών, όπως πρωτεΐνες (ζελατίνη), πολυσακχαρίτες (χιτοζάνη) και συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή (πολυ(γαλακτικούγλυκολικού οξέος), πολυ(γαλακτικού οξέος)). Η επιλογή του κατάλληλου πολυμερούς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το τελικό μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων, οι ιδιότητες του εγκλεισμένου φαρμάκου (σταθερότητα, υδροφοβικότητα κ.α.), τα επιφανειακά χαρακτηριστικά και η λειτουργικότητα των σωματιδίων, ο βαθμός βιοαποικοδόμησης και βιοσυμβατότητας και το φαρμακοκινητικό προφίλ αποδέσμευσης του φαρμάκου. Προφανώς χρειάζεται να γίνουν περεταίρω μελέτες για την πλήρη κατανόηση της συμπεριφοράς των συγκεκριμένων συστημάτων και την αλληλεπίδραση τους με τα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού.⁶⁰

1.3.2 Πολυμερικά Νανοσωματίδια

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

Οι μικρο- ή νανο-κάψουλες (ή σφαιρίδια) που σχηματίζονται έχουν συνήθως σφαιρικό σχήμα και μπορούν να περικλείουν ουσίες σε αέρια, υγρή ή στερεή μορφή, υδρόφιλες ή και υδρόφοβες. Οι όροι μικρο/νανο-σφαιρίδιο και μικρο/νανο-κάψουλα ορίζονται σύμφωνα με την επικρατέστερη αντίληψη ως εξής:

- Ο όρος «μικρο/νανο-κάψουλα» χρησιμοποιείται για την περιγραφή σωματιδίων τα οποία περιέχουν τη δραστική ουσία με τη μορφή ενός πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται πλήρως από ένα κέλυφος (σύστημα μεμβράνης) ή προσδένονται στο κέλυφος. Στο εσωτερικό των μικρο/νανοκαψουλών μπορεί να βρίσκεται ένας κρύσταλλος, ένα γαλάκτωμα ή ένα αιώρημα από μικρότερα σωματίδια και το υλικό του τοιχώματος μπορεί να είναι πορώδες ή μη πορώδες.
- Από την άλλη μεριά, ο όρος «μικρο/νανο-σφαιρίδιο» αναφέρεται σε σωματίδια τα οποία εμφανίζουν δομή τύπου μήτρας με συμπαγή μάζα, στα οποία η δραστική ουσία είτε εγκλωβίζεται μέσα στο σωματίδιο είτε προσρροφάται στην επιφάνεια τους.



Εικόνα 13. Παραγόμενες δομές σωματιδίων από διαδικασίες εγκλεισμού ενώσεων σε πολυμερή

Η διαφορετική δόμηση των συστημάτων οδηγεί σε διαφορετικές ιδιότητες απελευθέρωσης των ενεργών συστατικών. ⁶¹

Το περίβλημα των σωματιδίων αποτελείται από μια ουσία που χρησιμεύει ως «φράγμα» (barrier), συνήθως ένα βιοαποικοδομήσιμο ή βιοσυμβατό πολυμερές, και καθορίζει το ρυθμό αποδέσμευσης του δραστικού εγκλεισμένου μορίου. Το φράγμα αυτό μπορεί να έχει είτε τη μορφή μεμβράνης, είτε πολυμερικής ή κηρώδους μήτρας στην οποία είναι διασπαρμένη η φαρμακευτική ουσία. Το υλικό της μεμβράνης ή της μήτρας μπορεί να είναι οργανικό ή ανόργανο πολυμερές κι επιλέγεται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πυρήνα και την εφαρμογή για την οποία προορίζονται τα σωματίδια. ⁶²

Η ενεργός ουσία είναι δυνατό είτε να εγκλειστεί στο εσωτερικό των σωματιδίων, είτε να απορροφηθεί στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα για την περίπτωση ουσιών σε υγρή μορφή, ο νανοεγκλεισμός τους μετατρέπει σε στερεή μορφή (σκόνης) διατηρώντας την ενεργότητα τους, αυξάνοντας παράλληλα τη διάρκεια αποθήκευσής τους, ιδιαίτερα εάν πρόκειται για πτητικές ενώσεις. Σε κάθε περίπτωση, η ενεργός ουσία διατηρείται ανέπαφη μέσα στο νανοσωματίδιο και αποδεσμεύεται όποτε απαιτείται. Η ικανότητα του περιβλήματος να απομονώνει και να απελευθερώνει εκλεκτικά το περιεχόμενο εξαρτάται από το είδος των πολυμερών και το πάχος του τοιχώματος.⁶³

1.3.3 Τεχνικές Εγκλεισμού Μορίων Σε Νανοσωματίδια

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι, φυσικές, χημικές, βιολογικές κι υβριδικές, για την παρασκευή των νανοσωματιδίων. Η τεχνική που θα επιλεγεί κάθε φορά, εξαρτάται από το εξεταζόμενο σύστημα και τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του, όπως το υλικό κατασκευής, το είδος του νανοσωματιδίου, αλλά και τις διαστάσεις, το μέγεθος και την ποσότητά του. Ειδικότερα, για τα πολυμερικά νανοσωματίδια οι τεχνικές εγκλεισμού διακρίνονται στις φυσικοχημικές μεθόδους, στις οποίες το συνεχές μέσο που χρησιμοποιείται είναι το νερό ή κάποιος οργανικός διαλύτης και στις φυσικομηχανικές, όπου το συνεχές μέσο της διεργασίας είναι ο αέρας. Παρακάτω παρουσιάζονται ονομαστικά οι διαφορές φυσικοχημικές και φυσικομηχανικές μέθοδοι (Σχήμα 2).

Συγκεκριμένα, υπάρχει πληθώρα τεχνικών σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων (polymeric nanoparticles, PNPs), οι οποίες διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το εάν απαιτείται κάποια αντίδραση πολυμερισμού ή εάν η σύνθεση πραγματοποιείται απευθείας από κάποιο ήδη σχηματισμένο πολυμερές.

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου γίνεται βάση διάφορων παραγόντων, όπως η ουσία προς εγκλεισμό, η χρήση για την οποία προορίζονται τα τελικά νανοσωματίδια, το επιθυμητό μέγεθος των νανοσωματιδίων όπου επίσης σε κάθε τεχνική η κλίμακα μεγέθους των παραγόμενων σωματιδίων εξαρτάται από τις συνθήκες της διεργασίας, όπως τη συγκέντρωση του σταθεροποιητή, τη θερμοκρασία, το ρυθμό ανάδευσης, τη συγκέντρωση του πολυμερούς κ.ά. ⁶⁴⁻⁶⁵

Η εκτεταμένη εφαρμογή των νανοσωματιδίων σε ανθρωποκεντρικές εφαρμογές (ιατρικός τομέας, φαρμακευτική, βιομηχανία τροφίμων) απαιτεί σχετικά ταχέως βιοδιασπώμενα πολυμερή καθώς και όσο το δυνατό χαμηλότερη τοξικότητα του φορέα. Οι τεχνικές παρασκευής πολυμερικών σωματιδίων με πολυμερισμό μονομερών οδηγεί συνήθως σε βραδέως βιοδιασπώμενα ή μη-βιοδιασπώμενα πολυμερή. Επιπλέον, μη αμελητέο θεωρείται το γεγονός ότι υπολείμματα του πολυμερισμού (μονομερή, ολιγομερή, επιφανειοδραστικές ενώσεις) παρουσιάζουν ενδεχομένως υψηλή τοξικότητα, οπότε απαιτείται σχολαστική επεξεργασία- καθαρισμός του κολλοειδούς υλικού πριν τη χρήση. Όλα τα προηγούμενα κοινά μειονεκτήματα των τεχνικών πολυμερισμού μονομερών καθιστούν τις τεχνικές προσχηματισμένων πολυμερών ως τις πιο δημοφιλείς για την παρασκευή βιοδιασπώμενων μικρο- και νανο- σωματιδίων.⁶⁵⁻ ⁶⁷ Έμφαση θα δοθεί στις μεθόδους σύνθεσης από σχηματισμένα πολυμερή και πιο συγκεκριμένα στη μέθοδο γαλακτωματοποίηση/εξάτμιση διαλύτη, η οποία μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία.



Σχήμα 2. Ταξινόμηση τεχνικών σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων

1.3.3.1 Γαλακτωματοποίηση - Εξάτμιση του Διαλύτη

Η τεχνική νανοεγκλεισμού με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη εφαρμόζεται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανάπτυξη φαρμακευτικών νανοσυστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Γενικά υπάρχουν διάφορες τεχνικές που εφαρμόζονται στη συγκεκριμένη μέθοδο, η επιλογή της οποίας κατά βάση εξαρτάται από την υδροφοβικότητα ή υδροφιλικότητα της βιοδραστικής ουσίας προς εγκλεισμό. Τα διαλύματα πολυμερούς παρασκευάζονται σε πτητικούς διαλύτες και δημιουργείται ένα γαλάκτωμα. Το γαλάκτωμα που δημιουργείται, μετατρέπεται σε ένα εναιώρημα νανοσωματιδίων κατά την εξάτμιση του διαλύτη και το πολυμερές αφήνεται να διαχυθεί μέσα από τη συνεχή φάση του γαλακτώματος.

Αναλυτικότερα, δυο είναι οι κύριες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των γαλακτωμάτων:

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

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



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου απλού γαλακτώματος

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

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



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διπλού γαλακτώματος

Εν γένει, η τεχνική γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό υδρόφοβων ενώσεων, ωστόσο υδρόφιλες ενώσεις δύναται να εγκλειστούν με τη διαδικασία του σχηματισμού γαλακτώματος τύπου W/O/W, όπου οδηγεί στο σχηματισμό νανο- και μικρο- σφαιρών και όχι καψουλών. ^{65, 68-69}

Παράγοντες Διεργασίας

Τα συστήματα των τεχνικών παραγωγής πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι πολυπαραμετρικά και ανάλογα με τις ρυθμίσεις κάθε συστήματος μεταβάλλονται τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοσωματιδίων. Κρίσιμες μεταβλητές του νανοεγκλεισμού με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης εξάτμισης του διαλύτη είναι:

- <u>Ο ρυθμός εξάτμισης του διαλύτη</u>: γενικά, όσο πιο αργά πραγματοποιείται η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, τόσο μικρότερο το μέγεθος των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται.
- <u>Υλικά που χρησιμοποιούνται</u>: έχει διαπιστωθεί ότι σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προκύπτουν έχουν τα υλικά που χρησιμοποιούνται. Αυτά περιλαμβάνουν το είδος της προς εγκλεισμό ένωσης, το είδος και το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το είδος της επιφανειοδραστικής ουσίας γαλακτωματοποιητή, καθώς και ο οργανικός διαλύτης, ο οποίος επηρεάζει ανάλογα με την πτητικότητά του και την αναμιξιμότητα του με το νερό. Επιπλέον, η προσθήκη τυχόν αντιαφριστικών ουσιών επιδρά στις ιδιότητες των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων.

- <u>Παράμετροι</u>: έχει παρατηρηθεί ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν παράμετροι όπως το ιξώδες της διεσπαρμένης φάσης, η αναλογία της οργανικής προς την υδατική φάση καθώς και οι συγκεντρώσεις τόσο του οργανικού διαλύματος πολυμερούς όσο και του υδατικού διαλύματος του γαλακτωματοποιητή.
- Συνθήκες της διεργασίας: η θερμοκρασία, η πίεση, ο ρυθμός ανάμιξης, ακόμη και η γεωμετρία του αντιδραστήρα και του αναδευτήρα, έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν τα τελικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.

Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 1) συνοψίζει γενικές συμπεριφορές της επίδρασης ορισμένων παραμέτρων της τεχνικής στο μέγεθος, τη μορφολογία και την απόδοση εγκλεισμού των παραγόμενων νανοσωματιδίων, όπως έχουν προκύψει από τη βιβλιογραφία.⁶⁸

		ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ			
	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (ΑΕ)	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ
ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	Μ.Β. Πολυμερούς	¢	Πιο λεία επιφάνεια	Ŷ	 ↑ του Μ.Β. → ↑ ιξώδους της Ο φάσης → δυσκολότερη διάσπαση των Ο σταγονιδίων → ↑μεγέθους μικκυλίων και άρα των σωματιδίων ↑ του Μ.Β. → ↑ ιξώδους της Ο φάσης → δυσκολότερη διάχυση ενεργών συστατικών από Ο προς W φάση → ↑ ΑΕ
	Λόγος οργανικής προς υδατική φάση	\rightarrow		¥	 ↑ λόγου Ο προς W → ↑ μεταφερόμενης ενέργειας στην Ο φάση → ↓ μεγέθους Ο σταγονιδίων και άρα των σωματιδίων ↑ λόγου Ο προς W → ↑ ποσότητας εξατμιζόμενου διαλύτη → βραδύτερη στερεοποίηση σωματιδίων → ↓ ΑΕ
	Λόγος εγκλειόμενης ουσίας προς πολυμερές (φόρτωση)	Ŷ	πιο πορώδες και με ακανόνιστο σχήμα	¥	 ↑% φόρτωσης → ↑ η εγκλειόμενη μάζα ουσίας → ↑ μεγέθους σωματιδίων ↑% φόρτωσης → ↑ ποσότητας εγκλειόμενης ουσίας → ↑ δυναμικού διάχυσης της ουσίας από την Ο φάση προς τη W φάση → ↓ ΑΕ
	% w/v σταθεροποιητή	\checkmark		Ŷ	 ↑% σταθεροποιητή στη W φάση → ↓ πιθανότητας συγκόλλησης των Ο σταγονιδίων → ↓ μέγεθος σωματιδίων ↑% σταθεροποιητή στη W φάση → ↑ ιξώδους της W φάσης → ↑ διατμητικών τάσεων → ↓ μέγεθος σωματιδίων ↑% σταθεροποιητή στη W φάση → ταχύτερη στερεοποίηση σωματιδίων → AE
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ	Χρόνος υπερήχησης ή ομογενοποίησης	→	πιο λεία επιφάνεια	↓/ ↑	 ↑ χρόνου → ↑ της μεταφερόμενης ισχύος στην Ο φάση → ↓ μεγέθους Ο σταγονιδίων και άρα των σωματιδίων ↑ χρόνου → ↑ της μεταφερόμενης ισχύος και της τύρβης του μίγματος → είτε ταχύτερη και αποτελεσματικότερη σταθεροποίηση των σωματιδίων (↑ ΑΕ) είτε απώλειες της δραστικής ουσίας στην υδατική φάση λόγω της έντονης ανάμιξης (↓ ΑΕ)

Πίνακας 1: Επίδραση παραμέτρων της διεργασίας στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων

Ένταση υπερήχησης ή ομογενοποίησης	¥	↓/ ↑	 ↑ έντασης → ↑ της μεταφερόμενης ισχύος στην Ο φάση → ↓ μεγέθους Ο σταγονιδίων και άρα των σωματιδίων ↑ έντασης → ↑ της μεταφερόμενης ισχύος και της τύρβης του μίγματος → είτε ταχύτερη και αποτελεσματικότερη σταθεροποίηση των σωματιδίων (↑ ΑΕ) είτε απώλειες της δραστικής ουσίας στην υδατική φάση λόγω της έντονης ανάμιξης (↓ ΑΕ)
Ρυθμός εξάτμισης	↓/↑	ŕ	 ↑ ρυθμού εξάτμισης → δύναται να οδηγήσει είτε σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων είτε σε μείωση. Σημαντική επίδραση από τον οργανικό διαλύτη (σημείο βρασμού, αναμειξιμότητα με συνεχή φάση κ.α.) ↑ ρυθμού εξάτμισης → ↑ του δυναμικού διάχυσης του οργανικού διαλύτη προς τη συνεχή W φάση → ταχύτερη στερεοποίηση σωματιδίων → ↑ ΑΕ ειδικά για υδρόφιλες ουσίες

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

Το κατάλληλο σύστημα νανοεγκλεισμού για κάθε εφαρμογή προσδιορίζεται συνήθως με δοκιμή και σφάλμα, δεν υπάρχει δηλαδή κάποιος κανόνας στον οποίο να υπακούν όλα τα υλικά. ⁵⁸

1.3.4 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

Πέραν των ιδιοτήτων που αφορούν και τα υλικά μεγάλων διαστάσεων, όπως το σημείο τήξης, σημείο βρασμού, pH κλπ. τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν επιπλέον χαρακτηριστικά στα οποία πρέπει να δοθεί έμφαση. Το μέγεθος, το σχήμα, οι ιδιότητες επιφάνειας, όπως το φορτίο και η υδροφιλικότητα, η καθαρότητα και η σταθερότητα των κολλοειδών φορέων φαρμάκου (νανοσωματίδια), είναι χαρακτηριστικά τα οποία καθορίζουν την in vivo συμπεριφορά και βιοδιαθεσιμότητα τους.⁷⁰⁻⁷¹

Οι επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό που επηρεάζονται από τη βιοδιαθεσιμότητα, τη διαδρομή, τη φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρωση των νανουλικών μέσω των ιστών μπορούν να διαφέρουν από εκείνες των συμβατικών φαρμάκων. Κατά συνέπεια, θεωρείται αναγκαίο να αναπτυχθούν κατάλληλες μεθοδολογίες χαρακτηρισμού των νανουλικών. Επί του παρόντος δεν υπάρχουν τυποποιημένες μεθοδολογίες ή ρυθμιστικά πρωτόκολλα από την αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων. ⁸¹ Εντούτοις, το Εργαστήριο Χαρακτηρισμού Νανοτεχνολογίας (NCL), ανέπτυξε μια τυποποιημένη αναλυτική αλληλουχία, η οποία συμπεριλαμβάνει μια σειρά μεθόδων που δίνουν τη δυνατότητα του χαρακτηρισμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της in vivo συμβατότητας των νανοσωματιδίων.⁸²

1.3.4.1 Μέγεθος, ζ-δυναμικό και σταθερότητα των νανοσωματιδίων

Μέγεθος (size)

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων αποτελεί ένα παράγοντα που επηρεάζει το μηχανισμό απορρόφησης και χρόνο διαμονής στον οργανισμό. Το επιθυμητό μέγεθος εξαρτάται από την εκάστοτε εφαρμογή και τον ιστό- στόχο αλλά και σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του πολυμερούς και της δραστικής ουσίας, ενώ επίσης και από τη μέθοδο και τις πειραματικές συνθήκες της παρασκευής τους. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50 και 300 nm. Θεωρητικά, νανοσωματίδια με μέγεθος μεταξύ 100 και 200 nm συνήθως έχουν τη δομή νανοσφαιρών, ενώ οι νανοκάψουλες κυμαίνονται μεταξύ 100 και 300 nm.

Ανάλογα με την εφαρμογή, υπάρχουν περιορισμοί σχετικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων δηλαδή είτε δεν πρέπει να υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος ή να είναι μικρότερα από ένα προκαθορισμένο μέγεθος. Για παράδειγμα, σε φαρμακευτικές εφαρμογές για να είναι εφικτή η κυκλοφορία των νανοσωματιδίων που ενίονται με ενδοφλέβια μέσα ακόμα και στα μικρότερα τριχοειδή αγγεία θα πρέπει το μέγεθος τους να μην υπερβαίνει τα 5 μm. Επιπλέον, απαιτείται να έχουν διάμετρο μικρότερη από 200 nm ώστε να αποφεύγουν τη διήθηση τους από την σπλήνα.⁷³

ζ- δυναμικό (zeta potential)

Η εμφάνιση φορτίου επιφάνειας στα περισσότερα αιωρήματα σωματιδίων σε υδατικά μέσα οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων στα σωματίδια ή και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Τα σωματίδια είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα κι έλκουν από το διάλυμα θετικά ιόντα δημιουργώντας το ηλεκτροκινητικό ή ζ-δυναμικό που αποτελεί τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων με την ηλεκτρικά ουδέτερη περιοχή του διαλύματος.⁷⁴ Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων και τη σύνθεση του μέσου διασποράς. Το ζ-δυναμικό μπορεί να μετρηθεί με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφορητικές μετρήσεις).

Το ζ- δυναμικό σχετίζεται με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Για σωματίδια μικρού μεγέθους, ένα υψηλό ζ- δυναμικό προσδίδει σταθερότητα στο σύστημα των νανοσωματιδίων, δηλαδή το διάλυμα ή διασπορά θα αντιστέκονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Από την άλλη, η εμφάνιση χαμηλού ζδυναμικού έχει ως αποτέλεσμα η έλξη να υπερβαίνει την άπωση και η διασπορά θα αρχίσει να εμφανίζει φαινόμενα κροκίδωσης και συσσωματωμάτων. Γενικά, τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από το +20 mV και αντίστοιχα μικρότερες από -20 mV, συνεπάγονται σταθερά μικρο/ νανο-σωματίδια. Τα νανοσωματίδια πρέπει να εμφανίζουν επαρκή σταθερότητα ώστε να διατηρούν τις βιολογικές τους ιδιότητες, για την παραμονή τους στη γενική κυκλοφορία μετά από τη χορήγηση τους. Επίσης, προτιμώνται θετικές τιμές ζ-δυναμικού, καθώς προωθούν την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με την αντίθετα φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη και κατ' επέκταση την ενσωμάτωση τους σε αυτήν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως το επιφανειακό φορτίο τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εσωτερίκευση των σωματιδίων στο κύτταρο. Η κυτταρική μεμβράνη είναι αρνητικά φορτισμένη όποτε θα υπάρχει ισχυρή έλξη από θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια οπότε θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό εσωτερίκευσης από ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα. Μετά την κυτταρική πρόσληψη (εσωτερίκευση) έχει παρατηρηθεί ότι αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια τείνουν να βρίσκονται εντός λυσοσωμάτων, οργανίδια του κυττάρου, ενώ τα θετικά φορτισμένα έχουν την ικανότητα να αποδρούν από αυτά. 75-76

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

Φυσικοχημική Σταθερότητα (Stability)

Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το pH της υδατικής διασποράς, τον τύπο του πολυμερούς, τη χημική σταθερότητα της δραστικής ουσίας και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Ένα μειονέκτημα χρήσης νανοσωματιδίων είναι αστάθεια τους. Συγκεκριμένα, όταν τα υδατικά διαλύματα πολυμερικών νανοσωματιδίων αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρείται συχνά δημιουργία συσσωματωμάτων (φυσική αστάθεια) ή/και υδρόλυση του πολυμερούς και κατά συνέπεια διαρροή της δραστικής ουσίας (χημική αστάθεια).⁷⁷

Για να βελτιωθεί τόσο η φυσική όσο και η χημική σταθερότητα των σωματιδίων χρειάζεται να απομακρυνθεί το νερό. Η πιο γνωστή διεργασία που επιτρέπει τη μετατροπή διαλυμάτων ή εναιωρημάτων σε στερεά, με επαρκή σταθερότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικές εφαρμογές είναι η λυοφιλοποίηση (freeze drying). Η διεργασία αυτή βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού μέσω εξάχνωσης και εκρόφησης υπό κενό, από ένα παγωμένο δείγμα. Παρόλα αυτά η διεργασία αυτή προκαλεί αρκετές καταπονήσεις στο δείγμα. Έτσι, προτείνετε πολλές φορές αναγκαία η προσθήκη συστατικών που θα προστατεύσουν το δείγμα από τις καταπονήσεις αυτές.⁷⁸⁻⁷⁹

1.3.4.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Νανοσωματιδίων

Είναι απαραίτητη η ακριβής ανάπτυξη της «εικόνας» των πολυμερικών NPs ώστε να υπάρχει πλήρης κατανόηση και πρόβλεψη για την απόδοση τους στην εκάστοτε εφαρμογή τους. Επομένως, για να είναι εφικτός ο στόχος αυτός, χρησιμοποιείται μια σειρά από μεθόδους για φυσικοχημικούς και βιολογικούς χαρακτηρισμούς. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται επιγραμματικά οι κατάλληλες μέθοδοι για τη διερεύνηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των NPs. Περισσότερες πληροφορίες για τις αρχές, τις εφαρμογές, τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς των τεχνικών αυτών είναι διαθέσιμες στην βιβλιογραφία.⁸³

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	ΤΕΧΝΙΚΕΣ		
	DLS, FCS, RS, NSOM, SEM, TEM, STM, AFM, NMR,		
Νιεγεθος/ κατανομη Νιεγεθους	TOF-MS, XRD, UV–visible		
Φορτίο Επιφάνειας	Zeta potential (ELS), ATR–FTIR		
Σχήμα	SEM, TEM, STM, AFM, XRD		
Δομή	MS, IR, AFM, NMR, XRD, DSC		
Σύσταση	MS, NMR, HPLC		
Καθαρότητα	MS, NMR, HPLC, HDC		
Σταθερότητα	Zeta potential (ELS), TGA, DSC, HPLC		
Διασπορά	ESEM, TEM, STM, AFM		
	MS, ATR–FTIR,		
Επιφανειακές ιδιοτήτες	modified AFM, X-ray photoelectron spectroscopy		

Πίνακας 2: Κύριες τεχνικές για την αξιολόγηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των πολυμερικών NPs

1.3.5 Σκοπός και Εφαρμογές του Νανοεγκλεισμού

Η εφαρμογή του νανοεγκλεισμού αποσκοπεί στη βελτίωση ιδιοτήτων των δραστικών μορίων, καθώς και για τη διευκόλυνσης της διαχείρισης και φύλαξης τοξικών ή ευαίσθητων ουσιών αντίστοιχα. Ο νανοεγκλεισμός έχει βρει εμπορικές εφαρμογές σε αρκετούς τομείς, όπως:

- Βιομηχανία Καλλυντικών
- Βιομηχανία Τροφίμων
- Βιομηχανία λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων
- Καύσιμα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως, παρουσιάζουν οι εφαρμογές του νανοεγκλεισμού στο τομέα της βιολογίας και της ιατρικής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως προσφέρει τις εξής δυνατότητες:

- Ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικής ουσίας: Η απόδοση της δραστικής ουσίας στο περιβάλλον ελέγχεται από μηχανισμούς διάχυσης μέσω του φορέα, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται διάφορα προφίλ αποδέσμευσης, ανάλογα με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.
- <u>Προστασία ενεργών μορίων</u>: Προστατεύει ευαίσθητες ουσίες (βιταμίνες, πρωτεΐνες, υγροσκοπικά υγρά) από αλλοιώσεις που μπορεί να προκληθούν από εξωτερικούς παράγοντες (ακτινοβολία, υγρασία, θερμότητα, οξυγόνο) αλλά και χημικά ενεργές ουσίες από χημική προσβολή.
- <u>Προστασία φυσικοχημικών ιδιοτήτων της δραστικής ουσίας και προστασία της από ανεπιθύμητες ιδιότητες</u>: Προστατεύονται ιδιότητες όπως η πτητικότητα, η τοξικότητα, οι καταλυτικές ιδιότητες, η επίδραση στο pH και καλύπτει τη δυσάρεστη γεύση ή οσμή του φαρμάκου, αλλά και αποφεύγονται πιθανές παρενέργειες στον οργανισμό που εμφανίζονται στην ελεύθερη αποδέσμευση του μη εγκλεισμένου φαρμάκου. ⁸⁴

1.4 Μηχανισμοί απελευθέρωσης δραστικών ενώσεων από νανοφορείς

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων σχετίζεται με την ανάπτυξη συνθετικών νανοσυστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση περίπλοκων θεραπευτικών ενώσεων καθώς προσδίδει τη δυνατότητα να ξεπεραστούν φαρμακολογικοί περιορισμοί σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Γενικά, η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από νανοσύστημα ακολουθεί ένα ή συνδυασμό τριών διαφορετικών μηχανισμών:

- Διάχυση
- Διάβρωση
- Διόγκωση

Όσον αφορά στην απελευθέρωση δραστικής ουσίας από πολυμερικά νανοσυστήματα, γίνεται αναφορά στη διαδικασία κατά την οποία η ένωση μεταφέρεται από ένα σημείο που βρίσκεται εντός της πολυμερικής μήτρας στην εξωτερική επιφάνεια της και τελικά απελευθερώνεται στο περιβάλλον. Οι κύριοι μηχανισμοί απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας είναι (Εικόνα 16):

- Διάχυση μέσω πόρων πληρωμένων με νερό
- Διάχυση μέσω του πολυμερούς
- Ωσμωτική άντληση

Διάβρωση



Εικόνα 16. Μηχανισμοί απελευθέρωσης: (Α) Διάχυση μέσω πόρων νερού, (Β) Διάχυση μέσω του πολυμερούς, (C) Ωσμωτική άντληση και (D) Διάβρωση

Το συνηθέστερο προφίλ απελευθέρωσης από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς δραστικής ουσίας είναι το τριφασικό προφίλ και συνήθως παρατηρείται στα μακρομοριακά συστήματα μεταφοράς δραστικών ουσιών με ετερογενή συμπεριφορά αποικοδόμησης. Ο ρυθμός απελευθέρωσης μπορεί να είναι και διφασικός όταν τα σωματίδια είναι μικρότερα. Συγκεκριμένα, η πρώτη φάση του τριφασικού προφίλ απελευθέρωσης είναι μία ταχεία απελευθέρωση των μορίων της δραστικής ουσίας που είναι στην επιφάνεια ή κοντά στο υδατικό στρώμα. Η δεύτερη φάση του προφίλ απελευθέρωσης είναι μια βραδεία φάση απελευθέρωσης. Κινητήριος δύναμη αυτής της φάσης είναι η βραδεία διάχυση μέσω του πολυμερούς ή μέσω των υφιστάμενων πόρων και συμβαίνει παράλληλα με την υδρόλυση και την αποικοδόμηση του πολυμερούς. Τέλος, η τρίτη φάση είναι μία πιο ταχεία φάση απελευθέρωσης, καθώς αρχίζει η διάβρωση του πολυμερούς (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ανοικτά τετράγωνα: απότομη απελευθέρωση και ταχεία φάση ΙΙ, πλήρεις κύκλοι: τριφασική απελευθέρωση με σύντομη φάση ΙΙ. Διασταυρώσεις: απότομη απελευθέρωση μηδενικής τάξης. Γεμάτα διαμάντια: τριφασική απελευθέρωση. Παύλες: διφασική απελευθέρωση

Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφορά στη συγκέντρωση και το σχήμα του φορέα της δραστικής ουσίας είναι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας ενώ ο ρυθμός αποικοδόμησης του πολυμερούς κυριαρχεί στη μεταγενέστερη απελευθέρωση. Η απελευθέρωση επίσης εξαρτάται από το αν το φορτίο είναι υδρόφοβο ή υδρόφιλο. Τα υδρόφοβα φάρμακα παράγουν μηδενικής τάξης ρυθμό απελευθέρωσης ενώ τα υδρόφιλα παρουσιάζουν τριφασικό προφίλ. Το προφίλ απελευθέρωσης σε ένα πολυμερικό σύστημα μεταφοράς δραστικής ουσίας εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών παραμέτρων και πρέπει να εξετάζεται ανά περίπτωση. Οι όροι διαλυτοποίηση και απελευθέρωση μίας δραστικής ουσίας δεν είναι συνώνυμοι, η διαλυτοποίηση περιλαμβάνει πέντε κύρια στάδια, τα οποία γενικά εμπλέκονται στη διάλυση ενός φαρμάκου σε στερεή κατάσταση, σε ένα καλά αναδευόμενο υδατικό μέσο. Αντίθετα, ο όρος απελευθέρωση φαρμάκου αναφέρεται σε ένα πιο πολύπλοκο φαινόμενο, ένα μέρος του οποίου είναι η διαλυτοποίηση του φαρμάκου εάν το φάρμακο αρχικά υπάρχει σε στερεά κατάσταση.

Δεδομένου ότι υπάρχει πλήθος παραγόντων που επηρεάζουν την απελευθέρωση κάθε συστήματος, θεωρείται πως η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης παρέχει γνώση σχετικά με το μηχανισμό/ μηχανισμούς της απελευθέρωσης και προβλέπει την κινητική απελευθέρωσης, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεταφοράς δραστικών ουσιών μέσω νανοσυστήματος ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η ακρίβεια των δόσεων του φαρμάκου αλλά και να μειωθεί το κόστος και ο χρόνος χωρίς να χρειάζεται επιπλέον πειραματική μελέτη.

Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης είναι :

- Μηδενικής τάξης (Zero order)
- Πρώτης τάξης (First order)
- Higuchi
- Korsmeyer-Peppas

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των μαθηματικών μοντέλων για κινητική της απελευθέρωσης

	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer- Peppas
Εξίσωση	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	$LogQ_t = LogQ_0 + Kt/2.303$	$Q = K_H t^{\frac{1}{2}}$ $\frac{M_t}{M_0} = k t^{\frac{1}{2}}$	$F = \left(\frac{M_t}{M}\right) = K_m t^n$
Σύμβολα	Q ₀ : Η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο διάλυμα Q _t : Η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται στο χρόνο t K ₀ : Η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης t: χρόνος σε h	Q₀: Η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο διάλυμα Qt: Η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται στο χρόνο t Κ: Η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης t: χρόνος σε h	Q: Η ποσότητα του φαρμάκου που διαλύεται στο χρόνο t Κ _Η : Σταθερά Higuchi t: χρόνος σε h	 F: Κλάσμα φαρμάκου που απελευθερώνεται τη χρονική στιγμή t Μt: Ποσότητα της ουσίας που απελευθερώνεται τη χρονική στιγμή t Μ: Συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή Km: Κινητική σταθερά t: χρόνος σε h n: Εκθέτης διάχυσης ή απελευθέρωσης
Σύστημα	ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας	ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας	απελευθέρωση του φαρμάκου με διάχυση	ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης από πολυμερικά συστήματα

Η γραφική απεικόνιση του εκάστοτε μαθηματικού μοντέλου κινητικής απελευθέρωσης παρουσιάζεται πιο κάτω:



34



Εικόνα 18. Γραφική απεικόνιση μαθηματικών μοντέλων κινητικής απελευθέρωσης

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas, η οποία καθορίζεται από την καμπύλη απελευθέρωσης μέχρι το σημείο που ισχύει $\frac{M_t}{M} = 0.60$, χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης. Οι τιμές του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχούν για κάθε μηχανισμό απελευθέρωσης είναι:

- Για n<0.45 (Quasi Fickian)
- Για n=0.5 (Fickian model) κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης. Η διάχυση είναι πιο ισχυρή από την χαλάρωση των πολυμερικών αλυσίδων. Η κινητική τέτοιων συστημάτων χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό διάχυσης.
- Για 0.5<n<1 (μη Fickian ή ανώμαλη μεταφορά) τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.
- Για n=1 (μη Fickian Case II) ο ρυθμός απελευθέρωσης αντιστοιχεί σε κινητική μηδενικής τάξης και τα φαινόμενα που κυριαρχούν είναι η διόγκωση ή η χαλάρωση των πολυμερικών αλυσίδων.
- Για n>1 (Super Case II) συμβαίνει σπάσιμο πολυμερικών αλυσίδων (λόγω των τάσεων που αναπτύσσονται) κατά τη ρόφηση.

85-86

2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει τη μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού φλαβονοειδών με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση σε βιοδιασπώμενα πολυμερή.

Συνεπώς, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο σχηματισμός νανοσωματιδίων πολύ(γαλακτικού οξέος) με εγκλεισμένη ναρινγίνη, με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης εξάτμισης διαλύτη. Στόχος της εργασίας είναι ο σχηματισμός σταθερών νανοσωματιδίων που να εμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων, ενώ παράλληλα θα διαθέτουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά μεγέθους και διασποράς, και ικανοποιητικές αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας.

Ο λόγος που γίνεται ο εγκλεισμός είναι για την προστασία της ουσίας, δηλαδή για τη διατήρηση της δομής και των ιδιοτήτων της ένωσης, τη δυνατότητα μεταφοράς της ουσίας μέσα στον οργανισμό και την ελεγχόμενη απελευθέρωση της μέσα στον οργανισμό. Ο νανοεγκλεισμός των ενώσεων συμβάλλει στην προσαρμογή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και στην βελτίωση της σταθερότητας του συστήματος. Το πολύ(γαλακτικό οξύ) αποτελεί ένα από τα καταλληλότερα βιουλικά για φαρμακευτικές εφαρμογές. Θεωρείται από τις καλύτερες πολυμερικές μήτρες εγκλεισμού για την προστασία των ιδιοτήτων, τη μεταφορά και την ελεγχόμενη απελευθέρωση της ελεγχόμενη απελευθέρωση τος σταθερότητας του συστήματος. Το πολύ(γαλακτικό οξύ) αποτελεί ένα από τα καταλληλότερα βιουλικά για φαρμακευτικές εφαρμογές. Θεωρείται από τις καλύτερες πολυμερικές μήτρες εγκλεισμού για την προστασία των ιδιοτήτων, τη μεταφορά και την ελεγχόμενη απελευθέρωση των φαρμακευτικών ενώσεων λόγω της βιοσυμβατότητας του και του βιοδιασπώμενου χαρακτήρα του, επομένως η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στα πολυμερικά νανοσωματίδια προερχόμενα από PLA.

Τα σωματίδια που θα προκύψουν θα μελετηθούν ως προς τα φυσικοχημικά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, θα μελετηθεί η απελευθέρωση της ουσίας in vitro και θα αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δράση τους σε in vitro δοκιμές.

Επιπλέον, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ικανότητα επικάλυψης νανοσωματιδίων πολύ(γαλακτικού οξέος) από χιτοζάνη. Επιλέχθηκε αυτό το πολυμερές ως υλικό επικάλυψης γιατί είναι υδρόφιλο και διογκώνεται όταν διασπείρεται στο νερό. Επίσης, η χιτοζάνη είναι ικανή να προσκολλάται στις βλεννώδεις επιφάνειες του οργανισμού, καθώς πραγματοποιείται ιονική αλληλεπίδραση με τη βλέννα και μειώνει την απορρόφηση και αλληλεπίδραση με τα φαγοκύτταρα (είναι πιο πιθανό να συμβεί σε υδρόφοβες και αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες), παρατείνοντας έτσι το χρόνο παραμονής των νανοσωματιδίων στον τόπο εφαρμογής και τη διατήρηση του χρόνου απελευθέρωσης του φαρμάκου.
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός Βιοδραστικής Ένωσης

Στο παρόν υποκεφάλαιο καταγράφονται όλες οι διαδικασίες που έλαβαν χώρα για την παρασκευή, συλλογή των πολυμερικών νανοσωματιδίων και του εγκλεισμού με την εφαρμογή της τεχνικής γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη – μέθοδος απλού γαλακτώματος (O/W). Επιπλέον, αναφέρεται και η διαδικασία της επιφανειακής μορφοποίησης των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη. Το Σχήμα 3 αποτελεί μία παραστατική γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας η οποία θα αναλυθεί στη συνέχεια.





3.1.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρασκευής και απομόνωσης των νανοσωματιδίων και του εγκλεισμού της βιοδραστικής ένωσης είναι:

- Ναρινγίνη (Nar) Naringin Hydrate, MW= 580. 54 g/mol, TCI
- Πολύ(γαλακτικό οξύ) (PLA) PLI 005, Mr= 42 700 ± 5 400 g/mol
- Πολύ(βινυλική) αλκοόλη (PVA) υψηλού μοριακού βάρους, υδρολυμένη κατά 87-89%
- Ακετόνη Αναλυτικής Καθαρότητας κατά ACS, ISO AppliChemPanreac
- Αιθανόλη (EtOH) Αναλυτικής Καθαρότητας κατά ACS, ISO AppliChemPanreac
- Απιονισμένο Νερό (d.H₂O)
- Υπερκάθαρο Νερό (UPW), από εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας Ε.Μ.Π.- Συσκευή EASYpure[™] UV της Barnstead, 18 MΩ cm ειδική αντίσταση νερού

3.1.2 Όργανα και Συσκευές

- Αναδευτήρας Τύπου Vortex
- Συσκευή Υπερήχων (Hielscher Ultrasonics GmbH, UP100H)
- Επωαστήρας (Temperature Controlled Shaker Gallenkamp)
- Συσκευή Φυγοκέντρησης (Hitachi High-Speed Refrigerated Centrifuge Model CR22N/ CR21N)
- Κεφαλή Φυγοκέντρησης (Hitachi 46,R20A2, 20 000 RPM)
- Συσκευή Λυοφιλοποίησης (B. Braun Biotech International, Chris Alpha 1-4)

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

Αρχικά, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) περιεκτικότητας 1% w/v με σκοπό τη χρησιμοποίηση του ως υδατική/συνεχή φάση στις δοκιμές εγκλεισμών που πραγματοποιούνται. Ζυγίζονται και ογκομετρούνται 10 g PVA και 1000 ml απιονισμένου νερού αντίστοιχα και στη συνέχεια τοποθετούνται σε κωνική φιάλη. Το σύστημα αφήνεται υπό ήπιας έντασης μαγνητική ανάδευση, επί 2-3 μέρες στους 40-50 °C μέχρι πλήρους διαλύσεως του πολυμερούς στο νερό. Το παραγόμενο διαυγές διάλυμα φυλάσσεται σε κλειστή ογκομετρική φιάλη (διάλυμα stock) υπό σκιά και αποτελεί το σημείο άντλησης της απαιτούμενης ποσότητας της υδατικής φάσης πριν από κάθε πείραμα. Σε περίπτωση που παρατηρηθούν αιωρήματα αδιάλυτης ποσότητας PVA στο διάλυμα stock, πραγματοποιείται απλή διήθηση του διαλύματος.

3.1.4 Παρασκευή κενών πολυμερικών Νανοσωματιδίων (Blank NPs)

Παρασκευάζεται η οργανική φάση, η οποία στη περίπτωση των κενών NPs, αποτελείται μόνο από το διαλυμένο PLA. Ζυγίζεται με ακρίβεια η ποσότητα στερεού PLA, το οποίο τοποθετείται σε φιαλίδιο με ογκομετρημένη ποσότητα ακετόνης, όπου υπόκειται σε μηχανική ανάδευση με χρήση αναδευτήρα Vortex. Οι ποσότητες του PLA και της ακετόνης που χρησιμοποιούνται για κάθε δοκιμή είναι με βάση την αναλογία 1:10 αντίστοιχα.

Τοποθετείται ποσότητα υδατικής φάσης (1% w/v PVA) αναλογίας 2:1 PLA- PVA, για κάθε δοκιμή, σε ποτήρι ζέσεως με σχετικά στενή διατομή- για ομοιομορφία- και σε παγόλουτρο- για την εξασφάλιση της ψύξης του συστήματος κατά τη γαλακτωματοποίηση. Ακολούθως, πραγματοποιείται απόχυση του πλήρους διαλυμένου PLA, όπου η συσκευή υπερήχων τίθεται υπό λειτουργία άμεσα μετά την προσθήκη της οργανικής φάσης (δυναμικότητας 40%). Το γαλάκτωμα που σχηματίζεται, επωάζεται για 24 ώρες σε 100 rpm, ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και να σχηματισθούν τα νανοσωματίδια.

Η διεργασία απομόνωσης των NPs πραγματοποιείται με τη βοήθεια διάταξης φυγοκέντρησης. Η διασπορά των NPs, με συμπλήρωση από υπερκάθαρο νερό, τοποθετείται εντός πλαστικών σωληνάριων τύπου Oak Ridge των 50 mL. Ο αριθμός των σωληνάριων στη κεφαλή είναι πάντα ζυγός και τα σωληνάριαν τοποθετούνται αντιδιαμετρικά, όπου η μάζα τους είναι κοινή με ακρίβεια ενός δεκαδικού. Η φυγόκεντρος ρυθμίζεται στις κατάλληλες στροφές (rpm) για λειτουργία 20 λεπτών σε θερμοκρασία 10 °C. Μετά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης σχηματίζεται μια χαρακτηριστική συγκέντρωση των πολυμερικών σωματιδίων (pellet) στο τοίχωμα των σωληνάριων. Τα υπερκείμενα υγρά μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως και απορρίπτονται. Προστίθεται υπερκάθαρο νερό για την επαναδιασπορά των σωματιδίων υπό τη βοήθεια αναδευτήρα Vortex. Έπειτα, προστίθεται υπερκάθαρο νερό στα σωληνάρια ώστε να είναι κοινή η μάζα τους και επαναλαμβάνεται η διαδικασία φυγοκέντρησης- έκπλυσης συνολικά τρείς φορές.

Τα τελικά pellet που σχηματίζονται στα σωληνάρια, διασπείρονται ξανά με υπερκάθαρο νερό και μεταφέρονται σε κρυσταλλωτήριο. Το δείγμα τοποθετείται στη κατάψυξη για 24 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρεται στο θάλαμο της συσκευής λυοφιλοποίησης. Μετά την πιο πάνω διαδικασία, προκύπτει στο πυθμένα του σκεύους ένα λευκό στρώμα με υφή σαν βαμβάκι, το οποίο αποτελεί τα στερεά νανοσωματίδια.

3.1.5 Εγκλεισμός Ναρινγίνης σε πολυμερικά Νανοσωματίδια (Loaded NPs)

Η διαδικασία παρασκευής των NPs με εγκλεισμένη την ναρινγίνη είναι παρόμοια με την προαναφερθείσα των κενών NPs. Συγκεκριμένα, οι βασικές διαφοροποιήσεις εμφανίζονται στα εξής σημεία:

- Ι. Ζυγίζεται ποσότητα ναρινγίνης με βάση την επιθυμητή ποσοστιαία φόρτωση της- δηλαδή η μάζα της ένωσης ανά τη μάζα του πολυμερούς w/w όπου στη προκειμένη εργασία είναι ίση με 40 % w/w- για κάθε δοκιμή και τοποθετείται σε φιαλίδιο. Προστίθενται αρχικά 3 mL κατάλληλου διαλύτη (αιθανόλης ή ακετόνης) και υπόκειται σε μηχανική ανάδευση με αναδευτήρα Vortex και αν χρειάζεται σε θέρμανση. Σε περίπτωση που δεν διαλύεται, προστίθεται 1 mL διαλύτη και επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρι πλήρης διάλυσης της. Στη συνέχεια, αναμιγνύεται με το διαλυμένο PLA και αποτελούν την οργανική φάση.
- ΙΙ. Κατά τη διεργασία της φυγοκέντρησης, τα υπερκείμενα υγρά μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως και φυλάσσονται.

Επιπλέον, πραγματοποιούνται δοκιμές σε ορισμένες παραμέτρους της διαδικασίας προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση τους στα χαρακτηριστικά των σωματιδίων και στις αποδόσεις ώστε να επιλεχθεί το καταλληλότερο σύστημα νανοεγκλεισμού που θα χρησιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Διαλύτης Ναρινγίνης: Η ναρινγίνη δεν είναι υδατοδιαλυτή αλλά μπορεί να διαλυθεί σε αλκοόλες ή σε ακετόνη.
- Χρόνος Υπερήχων
- Φυγοκέντρηση: Μεταβάλλεται ο αριθμός των στροφών.

3.2 Επικάλυψη Νανοσωματιδίων με Χιτοζάνη

3.2.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

- Νανοσωματίδια με εγκλεισμένη ναρινγίνη
- Υπερκάθαρο Νερό
- Οξικό Οξύ
- Χιτοζάνη

3.2.2 Όργανα και Συσκευές

- Μαγνητικός Αναδευτήρας
- Συσκευή Υπερήχων (Hielscher Ultrasonics GmbH, UP100H)
- Επωαστήρας
- Συσκευή Φυγοκέντρησης (Hitachi High-Speed Refrigerated Centrifuge Model CR22N/ CR21N)
- Κεφαλή Φυγοκέντρησης (Hitachi 46,R20A2, 20 000 RPM)

Συσκευή Λυοφιλοποίησης (B. Braun Biotech International, Chris Alpha 1-4)

3.2.3 Παρασκευή Επικαλυμμένων Νανοσωματιδίων

Η επικάλυψη των φορτισμένων νανοσωματιδίων πραγματοποιείται με χιτοζάνη. Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα οξικού οξέος 2% w/v (με υπερκάθαρο νερό). Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα χιτοζάνης 0.16% w/v- ποσότητα χιτοζάνης διαλύεται σε ποσότητα διαλύματος οξικού οξέος, το οποίο αναδεύεται μαγνητικά χωρίς θέρμανση για τουλάχιστον 45 λεπτά.

Η δεύτερη φάση της διαδικασίας επικάλυψης περιλαμβάνει την ανάμιξη του διαλύματος χιτοζάνης με ποσότητα από την διασπορά των νανοσωματιδίων. Συγκεκριμένα, οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται βρίσκονται σε αναλογία 7:10 Διάλυμα Χιτοζάνης- Νανοσωματίδια. Το μίγμα αναδεύεται και σε αυτό εφαρμόζονται υπέρηχοι (2 λεπτά, 40% δυναμικότητα) όπου στη συνέχεια αφήνεται στον επωαστήρα για 24 ώρες στις 100 rpm.

Για την ανάκτηση των επικαλυμμένων σωματιδίων πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και λυοφιλοποίηση. Ειδικότερα, η διαδικασία της φυγοκέντρησης που ακολουθείται είναι ίδια με αυτή που αναφέρεται πιο πάνω για την συλλογή των νανοσωματιδίων.

3.3 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

3.3.1 Απόδοση Διεργασίας

Από το άθροισμα των αρχικών ποσοτήτων του PLA και της προς εγκλεισμό ένωσης καθώς και από τη ποσότητα σωματιδίων που ανακτήθηκε, μπορεί να υπολογιστεί η απόδοση διεργασίας από την εξίσωση:

Απόδοση Διεργασίας (yield/ YD):

$$YD = \frac{[\tau \varepsilon \lambda \iota \kappa \eta \, \mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, \sigma \omega \mu \alpha \tau \iota \delta \dot{\omega} \nu]}{[\alpha \rho \chi \iota \kappa \eta \, \mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, \dot{\varepsilon} \nu \omega \sigma \eta \varsigma + \alpha \rho \chi \iota \kappa \eta \, \mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, \pi o \lambda \upsilon \mu \varepsilon \rho o \dot{\upsilon} \varsigma]} \times 100\%$$
(3.2.1)

3.3.2 Απόδοση Εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού (έμμεσα) απαιτείται η εύρεση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis). Η πειραματική διαδικασία δύναται να διακριθεί περαιτέρω στις διαδικασίες για τον άμεσο προσδιορισμό της μάζας της εγκλεισμένης ένωσης ή εμμέσως με τον προσδιορισμό της μη εγκλεισμένης ένωσης των υπερκειμένων της φυγοκέντρησης.

Ως προς τον έμμεσο προσδιορισμό, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μη εγκλεισμένων ενώσεων στα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων. Τα υπερκείμενα υγρά των τριών φυγοκεντρήσεων συλλέγονται σε κοινό δοχείο και μετριέται ο συνολικός όγκος τους. Λαμβάνεται όγκος δείγματος από τα υπερκείμενα, φιλτράρεται και στη συνέχεια λαμβάνεται ποσότητα ίση με 0.2 mL όπου αραιώνεται με 2.8 mL υπερκάθαρου νερού και τοποθετούνται στη κυψελίδα. Η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος στα 283.2 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση μέσω της καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων ναρινγίνης σε αιθανόλη με γνωστή συγκέντρωση, μήκος κύματος (283.2 nm) και απορρόφηση. Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε φαίνεται στο διάγραμμα (Διάγραμμα 1) που ακολουθεί.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς Ναρινγίνης (λmax=283.2 nm)

Για τον υπολογισμό του ποσοστού, χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency- E.E.):

$$E.E. = \frac{[\alpha \rho \chi \iota \kappa \eta \pi o \sigma \delta \tau \eta \tau \alpha \, \acute{\epsilon} \nu \omega \sigma \eta \varsigma] - [\pi o \sigma \delta \tau \eta \tau \alpha \, \acute{\epsilon} \nu \omega \sigma \eta \varsigma \, \sigma \tau \alpha \, \upsilon \pi \epsilon \rho \kappa \epsilon (\mu \epsilon \nu \alpha]}{[\alpha \rho \chi \iota \kappa \eta \pi o \sigma \delta \tau \eta \tau \alpha \, \acute{\epsilon} \nu \omega \sigma \eta \varsigma]} \times 100\%$$
(3.2.2)

3.3.3 Προσδιορισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους (ή δείκτη πολυδιασποράς, PDI) και ζδυναμικού

3.3.3.1 Αντιδραστήρια και Υλικά

- Διασπορά νανοσωματιδίων
- Υπερκάθαρο Νερό

3.3.3.2 Όργανα και Συσκευές

- Malvern Zetasizer Nano ZSP, για μέτρηση δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)
- Αναδευτήρας τύπου vortex
- Κυψελίδα Disposable capillary cell DTS1070

3.3.3.3 Πειραματική Διαδικασία

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ναρινγίνη, των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων σχετικά με το μέγεθος (size), το δείκτη πολυδιασποράς (polydispersity index,PDI) και το ζ-δυναμικό (zeta potential) πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για μέτρηση DLS, λαμβάνονται 20 μL από τη διασπορά των νανοσωματιδίων και αραιώνονται με προσθήκη 2.98 mL υπερκάθαρου νερού, προς τελικό όγκο 3 mL. Το δείγμα οδηγείται προς ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex.

Έπειτα, με χρήση σύριγγας λαμβάνεται μία ποσότητα του διαλύματος που εμπεριέχεται μέσα στο φιαλίδιο και τοποθετείται στην κυψελίδα για την λήψη των μετρήσεων.

Πραγματοποιούνται δύο ειδών μετρήσεις, μία πρώτη για τον προσδιορισμό του μεγέθους (size) των νανοσωματιδίων και μία δεύτερη για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού τους (z-potential). Τόσο για τον προσδιορισμό του μεγέθους όσο και για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού πραγματοποιούνται πέντε μετρήσεις σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών.

3.3.4 Ανάλυση συστήματος νανοσωματιδίων μέσω υπέρυθρης φασματομετρίας μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης FT-IR του PLA, της ναρινγίνης, των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ναρινγίνη, των κενών και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων, με το όργανο JASCO FT/IR-4200, στην κλίμακα σάρωσης των 650-4000 cm². Τα δείγματα τοποθετούνται στο όργανο FT-IR για την μέτρηση της απορρόφησης τους, με χρήση δισκίων βρωμιούχου καλίου (KBr). Στην συνέχεια αξιολογώντας τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα φάσματα, λαμβάνονται πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

3.3.5 Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας των νανοσωματιδίων μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA)

Η θερμική συμπεριφορά των σωματιδίων μελετάται με την χρήση της μεθόδου Θερμοσταθμικής ανάλυσης με το όργανο TGA/DSC 1 STARe System thermobalance, Mettler Toledo company. Η ανάλυση πραγματοποιείται στα δείγματα της ναρινγίνης, των κενών νανοσωματιδίων και των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ναρινγίνη. Αρχικά ζυγίζεται ποσότητα από το εκάστοτε δείγμα, και τοποθετείται μέσα στο καψίδιο. Στην συνέχεια το καψίδιο που περιέχει το δείγμα σφραγίζεται αεροστεγώς και τοποθετείται στον ζυγό μέσα στον φούρνου του οργάνου TGA. Τα δείγματα θερμαίνονται από τους 25 °C μέχρι τους 600 °C με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min και ροής αζώτου 10 mL/min.

3.3.6 Μελέτη Απελευθέρωσης In Vitro

Η απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα πολυμερικά NPs διερευνάται χρησιμοποιώντας UV - Vis φασματοσκοπία ακολουθώντας τη μέθοδο ελεγχόμενης ανάδευσης και φυγοκέντρησης. Ποσότητα από τα στερεά PLA-NPs με εγκλεισμένη ναρινγίνη διασπείρεται σε ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων σε τιμή ίση με pH=6.2. Στη συνέχεια, αναδεύεται μαγνητικά στους 37 ± 0.5 °C με 430 rpm. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, συγκεκριμένη ποσότητα λαμβάνεται ως δείγμα (2-3 mL) οδηγείται σε διάταξη φυγοκέντρησης (14 000 rpm, 10 min, 4 °C) όπου το υπερκείμενο φυλάσσεται και το pellet που σχηματίζεται διασπείρεται ξανά σε ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος, ίση με αυτή των αρχικών δειγμάτων των νανοσωματιδίων, και επανατοποθετούνται σε ανάδευση. Η ποσότητα της ναρινγίνης που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο απορρέει από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε για τον υπολογισμό της ΕΕ% (Διάγραμμα 1). Με αυτά τα δεδομένα σχεδιάζονται τα διαγράμματα ποσοστιαίου ρυθμού απελευθέρωσης καθώς και τα διαγράμματα για τα κυριότερα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης και λαμβάνονται οι αντίστοιχες εξισώσεις.

3.3.7 Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης

Μια απλή μέθοδος που έχει αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ενώσεων, χρησιμοποιεί την σταθερή ρίζα 2,2διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλης (DPPH). Συγκεκριμένα, η ρίζα DPPH δεν αποσυντίθεται, δε διμερίζεται ενώ δεν αντιδρά με το οξυγόνο και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών και συνθετικών μορίων.



Εικόνα 19. Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Η ελεύθερη ρίζα DPPH διαθέτει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, λόγω του οποίου μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 517 nm και σε διάλυμα παρουσιάζει ένα έντονο πορφυρό χρώμα. Παρουσία ενώσεων οι οποίες είναι ικανές να μεταφέρουν ή να δώσουν ένα υδρογόνο η ρίζα αποχρωματίζεται δίνοντας ένα υποκίτρινο χρώμα. Ειδικότερα, όταν το ηλεκτρόνιο συζευχθεί η απορρόφηση ελαττώνεται στοιχειομετρικά σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται, με αποτέλεσμα το σταδιακό αποχρωματισμό του και κατά συνέπεια την εξασθένηση της απορρόφησης στα 517 nm. Το φαινόμενο αυτό, η μεταβολή της έντασης απορρόφησης, που παρατηρείται κατά την αντίδραση, χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως σαρωτές-δεσμευτές ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση ως αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης.⁸⁸



Εικόνα 20. Αντίδραση της DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών

3.3.9.1 Αντιδραστήρια και Υλικά

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Sigma-Aldrich
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97% Acros Organics
- Αιθανόλη, 99.8% AppliChem Panreac
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

3.3.9.2 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα DPPH σε αιθανόλη 0.0025% w/v, το οποίο υπόκειται σε μαγνητική ανάδευση για 20 λεπτά απουσία φωτός. Στη συνέχεια, ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες του εξεταζόμενου δείγματος και διαλύονται σε DMSO αποσκοπώντας συγκέντρωση 4 mM. Με κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν επίσης διαλύματα συγκεντρώσεων 3 mM, 2 mM, 1 mM και 0.2 mM (Stock). Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) προστίθενται 195 μL DPPH καθώς και 5 μL από κάθε μια από τις Stock συγκεντρώσεις για την παραλαβή τελικών συγκεντρώσεων 100μM, 75μM, 50μM, 25μM, 5μM. Επιπλέον, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control) τα οποία περιέχουν 195 μL DPPH και 60 λεπτά και 60 λεπτά. Τέλος, με τη χρήση του plate reader λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515 nm για κάθε δείγμα και εξετάζεται ως προς τα control.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Παρασκευή και εγκλεισμός Ναρινγίνης σε νανοσωματίδια πολύ(γαλακτικού οξέος)

Τα νανοσωματίδια πολύ(γαλακτικού οξέος) (PLA NPs) χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς για υδρόφοβες δραστικές ουσίες λόγω της υδρόφοβης φύσης τους. Επομένως, θεωρήθηκαν ο καταλληλότερος φορέας για τον εγκλεισμό της υδρόφοβης ναρινγίνης, αφού θεωρητικά ο υδρόφοβος χαρακτήρας της ένωσης οδηγεί σε πιο μεγάλη συνάφεια και ισχυρή αλληλεπίδραση με το εξίσου υδρόφοβο PLA.

Η παρασκευή των ναρινγίνη- PLA νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης- εξάτμισης διαλύτη. Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος οφείλεται στο γεγονός πως χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή νανοσωματιδίων με επιθυμητά χαρακτηριστικά αφού επιτρέπει την προσαρμογή των πειραματικών συνθηκών. Συγκεκριμένα, προκύπτουν θετικά αποτελέσματα ως προς τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και τις αποδόσεις τους.

Ο οργανικός διαλύτης που επιλέχθηκε τελικά τόσο για την διάλυση του PLA αλλά και της ναρινγίνης είναι η ακετόνη. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ως προς τη διάλυση της ναρινγίνης με χρήση αιθανόλης αλλά με βάση τα αποτελέσματα (Πίνακας 4, Εικόνα 28, 34 Παράρτημα Εικόνων) παρατηρήθηκε πως όταν ο διαλύτης ήταν κοινός για τη διάλυση του φορέα και ουσίας τα αποτελέσματα ως προς την κατανομή του μεγέθους ήταν πιο ομοιόμορφα.

Η μέθοδος παρασκευής βασίζεται στη γαλακτωματοποίηση της οργανικής φάσης του πολυμερούς μέσα στην υδατική φάση και στη συνέχεια στην εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Αποτέλεσμα αυτών είναι η κατακρήμνιση του πολυμερούς ως νανοσωματίδια με διάμετρο μερικών εκατοντάδων νανομέτρων. Το PVA χρησιμοποιήθηκε ως υδατική φάση για τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος και των νανοσωματιδίων. Η συγκέντρωση του έχει άμεση επίδραση στη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων άρα και κατά συνέπεια στο μέγεθος τους και στην κατανομή του μεγέθους.

Η εφαρμογή των υπερήχων είχε σκοπό τη γαλακτωματοποίηση του συστήματος, η οποία αποτελεί κρίσιμο στάδιο της παρασκευής των νανοσωματιδίων επομένως θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου εφαρμογής των υπερήχων- ο βέλτιστός χρόνος βρέθηκε να είναι των 6 λεπτών καθώς τα αποτελέσματα ως προς την κατανομή του μεγέθους και την ομοιομορφία των νανοσωματιδίων ήταν καλύτερα. Επιπλέον, οι υπέρηχοι προκαλούν αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη δράση των ουσιών, έτσι τα δείγματα τοποθετούνταν σε παγόλουτρο και η δυναμικότητα που εφαρμοζόταν ήταν ίση με 40%.

Επίσης, βασικό στάδιο αποτελεί και η συλλογή και καθαρισμός τους καθώς ελέγχει την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά τους και κατά συνέπεια την καταλληλόλητα τους για εφαρμογή. Ως μέθοδος για το στάδιο αυτό επιλέχθηκε η φυγοκέντρηση και θεωρήθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθούν δοκιμές ως προς τις συνθήκες φυγοκέντρησης. Αποτελεσματικότερες θεωρήθηκαν οι 17 000 rpm καθώς παρατηρήθηκαν υψηλότερες αποδόσεις διεργασίας σε σχέση με τα αποτελέσματα από τις 13 000 rpm ενώ οι 23 000 rpm έδωσαν αντίστοιχο ύψος απόδοσης με τις 17 000 rpm.

Δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της υπολειπόμενης ακετόνης, δεδομένου πως κύριος στόχος ήταν η επιβεβαίωση του επιτυχή εγκλεισμού της ναρινγίνης στα PLA-NPs και ο χαρακτηρισμός τους. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων ήταν επαναλήψιμη και παραλήφθηκαν κάθε φορά, σε κάθε παρτίδα που λήφθηκε, ίδιου τύπου νανοσωματίδια.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η επικάλυψη των PLA-NPs με χιτοζάνη αποσκοπεί στη βελτίωση των ιδιοτήτων του συστήματος και κατά συνέπεια την επιπλέον βελτίωση της μεταφοράς της δραστικής ουσίας στον οργανισμό. Η χιτοζάνη μπορεί να προσρροφάται στην επιφάνεια αρνητικά φορτισμένων νανοσωματιδίων, όπως τα νανοσωματίδια PLA που προέκυψαν στο πλαίσιο της διπλωματικής, με ηλεκτροστατική έλξη και έτσι σχηματίζεται το πρώτο μονομοριακό στρώμα προσρόφησης. Στη συνέχεια, δεσμοί υδρογόνου ή δυνάμεις van der Waal κυριαρχούν ως κινητήρια δύναμη για την περαιτέρω προσρόφηση της χιτοζάνης. Λόγω στην ικανότητά της να αλληλοεπιδρά με ανιοντικούς παράγοντες (βιολογικοί ιστοί, βλεννογόνο) και να σχηματίζει υδατοδιαλυτά φράγματα, οδηγεί σε παρατεταμένο χρόνο παραμονής σε θέσεις απορρόφησης φαρμάκων και επιτρέποντας υψηλότερη διαπερατότητα φαρμάκου. Ο λόγος που έχει αυτή την δυνατότητα είναι πως οι ελεύθερες αμινομάδες καθιστούν την χιτοζάνη θετικά φορτισμένη.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές για την μελέτη της ικανότητας της χιτοζάνης να επικαλύψει τα παραγόμενα NPs. Οι παρτίδες των νανοσωματιδίων με δοκιμή επικάλυψης οδηγήθηκαν προς ανάλυση DLS, για να είναι δυνατή η επιβεβαίωση της επικάλυψης.

	PLA (mg)	Ακετόνη (mL)	Nar (mg)	EtOH (mL)	Ακετόνη (mL)	PVA (mL)	Διάρκεια Υπερήχων (min)	Στροφές Φυγοκέντρησης (10 ³ rpm)
PLA_NPs_1	200	20	-	-	-	100	6	13
PLA_NPs_2	100	10	-	-	-	50	6	13
PLA_Nar_1	200	20	80	5	-	100	6	13
PLA_Nar_2	150	15	60	5	-	75	8	13
PLA_Nar_3	150	15	60	5	-	75	3	13
PLA_Nar_4	150	15	60	5	-	75	6	13
PLA_Nar_5	150	15	60	-	5	75	6	13
PLA_Nar_6	150	15	60	-	5	75	6	17
PLA_Nar_7	300	30	120	-	9	150	6	23
PLA_Nar_8	250	25	100	-	7	125	6	17

Πίνακας 4: Ποσότητες Δοκιμών NPs

Πίνακας 5: Ποσότητες Δοκιμών Επικαλυμμένων NPs

	Διάλυμα Χιτοζάνης (mL)	Ποσότητα Διασποράς (mg)
Coating_PLA_NPs_1	14	20
Coating_PLA_NPs_6	35	50

4.2 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα των αποδόσεων διεργασίας και εγκλεισμού, αλλά και τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS που χαρακτηρίζει τα νανοσωματίδια ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Επιπλέον, ακολουθεί μελέτη της δομής των νανοσωματιδίων μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), καθώς και μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων τους μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA). Τέλος, πραγματοποιείται η μελέτη απελευθέρωσης της ναρινγίνης από τα νανοσωματίδια in vitro και η αντιοξειδωτική δράση των φορτισμένων νανοσωματιδίων.

4.2.1 Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση εγκλεισμού

Η απόδοση της διεργασίας υπολογίζεται από την Εξίσωση 3.2.1 (σελ. 40). Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται από την Εξίσωση 3.2.2 (σελ. 41). Προκειμένου να υπολογισθεί, υπολογίζεται αρχικά η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια από την καμπύλη αναφοράς της ναρινγίνης (Διάγραμμα 1) που έχει κατασκευαστεί.

Ουσιαστικά, η συγκέντρωση της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$Abs = 46.905C + 0.0624 \qquad (4.1.1)$$

Όπου:

Abs = απορρόφηση του δείγματος στα 283.2 nm C = συγκέντρωση της ένωσης σε mol/L

Στη συνέχεια, αντίστροφοι υπολογισμοί από τις αραιώσεις δύναται να δώσουν τη θεωρητικά ολική μάζα της μη εγκλεισμένης ένωσης η οποία βρισκόταν στα υπερκείμενα υγρά.

Στον πίνακα (Πίνακας 6) που ακολουθεί παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας και εγκλεισμού για τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν.

	Απόδοση Διεργασίας (%)	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
PLA_NPs	54	-
PLA_Nar_1	14	36
PLA_Nar_2	14	40
PLA_Nar_3	14	42
PLA_Nar_4	24	41
PLA_Nar_5	7	46
PLA_Nar_6	65	60
PLA_Nar_7	65	42
PLA_Nar_8	52	64

Πίνακας 6: Προσδιορισμός Απόδοσης Διεργασίας και Απόδοσης Εγκλεισμού

Επομένως, επιβεβαιώθηκε για κάθε δείγμα ότι επιτεύχθηκε εγκλεισμός της ναρινγίνης στα νανοσωματίδια. Οι αποδόσεις εγκλεισμού των PLA NPs θεωρούνται καλές, με ελάχιστη τιμή 36% και μέγιστη 64%, με επαναλήψιμα αποτελέσματα καθώς η πλειοψηφία παρουσιάζει τιμή μεταξύ 40-46%. Η φόρτωση της δραστικής ένωσης αποτελεί κρίσιμη παράμετρος για τα σύστημα, καθώς επηρεάζει άμεσα τη διαθέσιμη θεραπευτική δόση.

Η έμμεση μέθοδος υπολογισμού στηρίζεται σε ισοζύγιο μάζας της ένωσης, πραγματοποιώντας την παραδοχή ότι δεν καταγράφονται απώλειες της ένωσης στα πολυάριθμα στάδια της παρασκευής των νανοσωματιδίων. Συγχρόνως, η χαμηλή διαλυτότητα της ναρινγίνης στο νερό ισοδυναμεί με διασπορά

της στα υπερκείμενα και όχι σε διάλυση της και κατά συνέπεια η πιθανότητα μη ομοιόμορφης συγκέντρωσης της ένωσης κατά τη δειγματοληψία από τα υπερκείμενα υγρά είναι ιδιαίτερα υψηλή οδηγώντας σε υποεκτίμηση ή υπερεκτίμηση της απόδοσης εγκλεισμού έμμεσα.

Η απόδοση της διεργασίας κυμαίνεται σε μεγάλο εύρος τιμών. Το στάδιο της φυγοκέντρησης είναι κατά πάσα πιθανότητα η αιτία της απώλειας νανοσωματιδίων. Ειδικότερα, οι παρτίδες των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ναρινγίνη (1-5), όπου παρατηρήθηκαν αρκετά χαμηλές αποδόσεις διεργασίας με τιμές 7-24%, δεν μπορούν να καταβυθιστούν πιθανόν λόγω των χαμηλότερων στροφών στη φυγόκεντρο. Αντίθετα, οι παρτίδες (6-8) παρουσιάζουν υψηλές αποδόσεις διεργασίας λόγω των υψηλότερων στροφών που εφαρμόστηκαν κατά το στάδιο της φυγοκέντρησης.





4.2.2 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων

Τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες προσδιορίστηκαν με την μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Τα αποτελέσματα του μέσου μεγέθους (mean particle size), του δείκτη διασποράς (polydispersity index, PdI) και του ζ-δυναμικού (ζ-potential) συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακας 7). Στο παράρτημα παρατίθενται τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια (Εικόνα 26-45, Παράρτημα Εικόνων).

	Διάμετρος (nm)	PdI	ζ - δυναμικό (mV)
PLA_NPs	186.0 ± 3.4	0.126 ± 0.015	-14.0 ± 1.4
PLA_Nar_1	201.2 ± 2.4	0.115 ± 0.018	-19.6 ± 0.2
PLA_Nar_2	223.5 ± 23.5	0.208 ± 0.034	-10.6 ± 1.4
PLA_Nar_3	142.1 ± 13.2	0.215 ± 0.047	-9.3 ± 2.5
PLA_Nar_4	184.3 ± 2.4	0.125 ± 0.020	-10.2 ± 1.9
PLA_Nar_5	210.2 ± 31.2	0.169 ± 0.122	-18.6 ± 4.4
PLA_Nar_6	166.0 ± 1.2	0.073 ± 0.015	-7.1 ± 0.3
PLA_Nar_7	183.7 ± 1.7	0.051 ± 0.001	-8.1 ± 1.5
Coating_PLA_Nar_1	335.5 ± 5.8	0.251 ±0.030	20.5 ± 1.2
Coating_PLA_Nar_6	467.2 ± 6.6	0.203 ± 0.005	8.9 ± 2.4

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μεγέθους, PDI, ζ-δυναμικού κενών, φορτωμένων και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων

Συγκεκριμένα, όλα τα νανοσωματίδια που συντέθηκαν παρουσίασαν μέσο μέγεθος σωματιδίου μεταξύ 142.1 nm με 223.5 nm και δείκτη πολυδιασποράς- ο οποίος αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας του μεγέθους- μεταξύ 0.051 και 0.215, υποδεικνύοντας ομοιογενή πληθυσμό νανοσωματιδίων καθώς τιμές του δείκτη πολυδιασποράς μεγαλύτερες από 0.2 υποδηλώνουν την ύπαρξη ευρείας κατανομής μεγέθους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των δειγμάτων (Εικόνα 28,34,36,38,40 Παράρτημα Εικόνων).

Δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες διαφορές ως προς το μέγεθος μεταξύ των κενών NPs και των φορτισμένων NPs, επιδεικνύοντας ότι η ενσωμάτωση της ναρινγίνης δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος των σωματιδίων.

Ως προς τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη NPs, παρατηρήθηκαν αυξανόμενα μεγέθη. Από τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους που προέκυψαν (Εικόνα 42, 44 Παράρτημα Εικόνων) παρατηρείται ως ένδειξη πως η χιτοζάνη δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην κατανομή.

Ως προς το ζ-δυναμικό των NPs, μια σημαντική παράμετρος για τον χαρακτηρισμό τους, αφού παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα του εναιωρήματος σε καθορισμένες συνθήκες, παρατηρήθηκε πως παρουσίασαν αρνητικές τιμές, μεταξύ -7.1 mV και -19.6 mV. Το αρνητικό φορτίο είναι αναμενόμενο και μπορεί να αποδοθεί στη παρουσία των καρβοξυλομάδων στη δομή του PLA. Αναλογιζόμενοι πως γενικά τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από το +20 mV και αντίστοιχα μικρότερες από -20 mV συνεπάγονται σταθερά μικρο/ νανο-σωματίδια, η πλειοψηφία των παρτίδων τείνουν να συσσωματωθούν.

Σ' αυτό το σημείο πρέπει να προστεθεί πως τα νανοσωματίδια που έχουν επικαλυφθεί με χιτοζάνη, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται με την αλλαγή του πρόσημου του ζ-δυναμικού σε θετικό, παρουσιάζουν ως επί το πλείστον τιμές του ζ- δυναμικού εντός των ορίων που τα καθιστούν σταθερά.

Επιπρόσθετα, παρατηρείται η επίδραση του χρόνου εφαρμογής υπερήχων κατά το στάδιο της γαλακτωματοποίησης αφού για τις παρτίδες PLA_Nar_2 και PLA_Nar_3, με χρονική διάρκεια 8 λεπτά και 3 λεπτά αντίστοιχα, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μεγαλύτερος από 0.2 και από στα γραφήματα κατανομής μεγέθους παρατηρείται τάση προς ανομοιομορφία (Εικόνα 30,32 Παράρτημα Εικόνων).

4.2.3 Μελέτη δομής νανοσωματιδίων μέσω Υπέρυθρης φασματομετρίας (FT-IR)

Η φασματοσκοπία FT-IR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πιθανόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ του «φιλοξενούμενου» μορίου και του μορίου «ξενιστή». Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των φασμάτων FT-IR του PLA, της ναρινγίνης, καθώς και των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 21. Φάσμα FT-IR PLA



Εικόνα 22. Φάσμα FT-IR Ναρινγίνη



Εικόνα 23. Φάσμα FT-IR PLA_Nar_6



Εικόνα 24. Φάσμα FT-IR Coating_PLA_Nar_6

Στο φάσμα του PLA, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3464 cm⁻¹, η οποία είναι οφειλόμενη στη δόνηση τάσης του δεσμού OH που βρίσκεται στη τελευταίες ομάδες της αλυσίδας του PLA χαμηλού μοριακού βάρους, στα 2998 cm⁻¹ που οφείλονται στη δόνηση τάσης των ασύμμετρων και συμμετρικών C-H της κύριας αλυσίδας του PLA, στα 1758 cm⁻¹ χαρακτηριστική της δόνησης τάσης των ομάδων του καρβονυλίου των επαναλαμβανόμενων εστερικών μονάδων, στα 1455 cm⁻¹ λόγω της δόνησης τάσης μεθυλίου/ μεθυλενίου, στα 1090 cm⁻¹ που αποδίδεται στη δόνηση της ομάδας C-O των ομάδων των εστέρων και στα 871 cm⁻¹ που αποδίδεται στην άμορφη περιοχή του PLA ενώ στα 755 cm⁻¹ στη κρυσταλλική του φάση.

Στο φάσμα της ναρινγίνης, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 3430 cm⁻¹ που οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού OH, στα 2919 cm⁻¹ και 2876 cm⁻¹ οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης των C-H των δακτυλίων που βρίσκονται στο μόριο, στα 1646 cm⁻¹ λόγω της δόνησης τάσης των ομάδων του καρβονυλίου, στα 1367 cm⁻¹ η κάμψη της ομάδας του μεθυλίου, στα 1296 cm⁻¹ λόγω της επίπεδης κάμψης του C- H και στα 1135 cm⁻¹ στη τάση δόνησης των ομάδων μεθυλενίου (-CH₂).

Στο φάσμα IR των PLA_Nar_6 παρουσιάζονται κυρίως οι απορροφήσεις που οφείλονται στην πολυμερική μήτρα PLA, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις αλληλεπικαλύπτονται με αυτές της εγκλεισμένης ένωσης. Παρατηρείται ότι στο φάσμα των PLA_Nar_6 υπάρχει μια ισχυρή ευρεία απορρόφηση στα 3430 cm⁻¹ και μια ασθενής απορρόφηση στα 1758 cm⁻¹ η οποία μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης της Ο-Η της ναρινγίνης που απορροφάται στην επιφάνεια των PLA_Nar_6 και μετατοπίζονται, σε σύγκριση με το φάσμα της καθαρής ένωσης. Οι μεταβολές αυτές αποδίδονται στις πιθανές αλληλεπιδράσεις της ουσίας με τον πολυμερικό φορέα.

Ανάλογα, στο φάσμα των Coating_PLA_Nar_6 παρατηρούνται τα πιο πάνω με μετατοπισμένες τις κορυφές, που οφείλονται στην αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με το σύστημα. Ωστόσο, η απορρόφηση που οφείλεται στην χιτοζάνη δεν παρουσιάζεται έντονα.

4.2.4 Θερμικές Ιδιότητες μέσω θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA)

Οι θερμικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, των κενών και με εγκλεισμένη ναρινγίνη, καθώς και της ενεργής ουσίας, ναρινγίνη, μελετήθηκαν μέσω της θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA).

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα (Εικόνα 25) η καμπύλη που αντιστοιχεί στην ναρινγίνη παρουσιάζει μικρή απώλεια μάζας μεταξύ της θερμοκρασιακής περιοχής 100-120 °C, η οποία πιθανόν οφείλεται σε απώλεια νερού καθώς η ναρινγίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε ένυδρη μορφή, και στη συνέχεια απώλεια μάζας (50%) που ξεκινάει από τη θερμοκρασία των 250 °C. Αντίστοιχα, από την καμπύλη των κενών NPs παρατηρείται η απώλεια μάζας (90%) να ξεκινάει από τη θερμοκρασία των 250 °C. Αντίστοιχα, από την καμπύλη των κενών NPs παρατηρείται η απώλεια μάζας (90%) να ξεκινάει από τη θερμοκρασία των 280 °C. Από την καμπύλη των NPs που περιέχουν την εγκλεισμένη ουσία, παρατηρείται πως η απώλεια μάζας (80%) ξεκινάει από την θερμοκρασία των 260 °C. Η μείωση της θερμοκρασίας, αναλογιζόμενοι με αυτά που αναφέρθηκαν, μπορεί να αποδοθεί στην θερμική αποικοδόμηση της ναρινγίνης που είναι εγκλεισμένη στα NPs. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε απώλεια νερού. Το στερεό υπόλειμμα των σωματιδίων μετά τη θερμική τους επεξεργασία ήταν συνάρτηση της περιεχόμενης ένωσής τους.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση TGA ήταν σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης FT-IR, υποδηλώνοντας τον επιτυχή εγκλεισμό της ναρινγίνης στα PLA-NPs αλλά και την προστασία της ένωσης.



Εικόνα 25. Συνολικό διάγραμμα TGA της Ναρινγίνης (πράσινο χρώμα), των κενών NPs (μπλε χρώμα) και των φορτισμένων NPs (κόκκινο χρώμα)

4.2.5 Μελέτη Απελευθέρωσης In Vitro

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρτικά πειράματα μελέτης απελευθέρωσης in vitro της ναρινγίνης από το σύστημα των NPs σε pH ίσο με 6.2 στους 37 ± 0.05 °C. Οι συγκεκριμένες συνθήκες, η τιμή του pH και της θερμοκρασίας επιλέχθηκαν καθώς το σύστημα προορίζεται για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας και με βάση τη βιβλιογραφία, οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στην περιοχή που υφίσταται η φλεγμονή.

Το προφίλ απελευθέρωσης για pH=6.2 παρουσιάζεται στο πιο κάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 3) και θεωρείται διφασικό προφίλ. Αρχικά, παρατηρήθηκε πως σε χρόνο ίσο με t=3 h παρουσιάστηκε ταχεία απελευθέρωση («burst effect») όπου συνολική ποσότητα 26% ναρινγίνης απελευθερώθηκε ενώ σταδιακά αρχίζει να σταθεροποιείται. Αυτό το φαινόμενο επιβεβαιώνει πως υπάρχει ποσότητα της ένωσης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται άμεσα. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε πως στις 24 ώρες, συνολική ποσότητα της τάξεως του 30% απελευθερώθηκε. Ακολούθως, η ναρινγίνη αποδεσμεύεται με σταθερό ρυθμό από τα πολυμερικά νανοσωματίδια, λόγω της διάχυσης μέσω τους ή μέσω των υφιστάμενων πόρων τους και συμβαίνει παράλληλα με την υδρόλυση και την σταδιακή αποικοδόμηση τους, φτάνοντας εν τέλει μέχρι και 48% αθροιστική απελευθέρωση μέσα σε 15 ημέρες.

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση της ναρινγίνης όπως παρατηρήθηκε από τη μελέτη, ευνοεί την ανάπτυξη νανοφαρμάκων με ενεργή ουσία την ναρινγίνη και παράλληλα καθώς το σύστημα είναι επιδεκτικό ως προς επιφανειακή τροποποίηση, παρέχεται και η δυνατότητα για στοχευμένη παράδοση του νανοφαρμάκου. Οι Kumari et al. (2011) μελέτησαν την απελευθέρωση της ένωσης κερσετίνης (quercetin), αντιοξειδωτικό φλαβονοειδές, από νανοσωματίδια PLA, σε pH= 7.4 στους 37 ± 0.5 °C. Στο προφίλ απελευθέρωσης παρατήρησαν ταχεία απελευθέρωση («burst effect») εντός των t=3h της τάξεως του 48% και στη συνέχεια η κερσετίνη αποδεσμεύτηκε με σταθερό ρυθμό ολοκληρώνοντας την απελευθέρωση εντός 14 ημερών.⁹⁰ Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τις ενώσεις οριδονίνη (oridonin) και κερσετίνη, εγκλεισμένες σε νανοσωματίδια PLA.



Διάγραμμα 3. Προφίλ απελευθέρωσης in vitro των PLA NPs με εγκλεισμένη ναρινγίνη (pH= 6.2, T= 37 oC). Πάνω: 0-24 ώρες, Κάτω: 0- ώρες.

Η επιλογή του βέλτιστού κινητικού μοντέλου για την περιγραφή του προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης έγινε με βάση τον δειγματικό συντελεστή συσχέτισης (R²). Την καλύτερη γραμμικότητα, με τον υψηλότερο συντελεστή R², 0.8522, παρουσίασε το κινητικό μοντέλο Higuchi, όπως φαίνεται και στον πίνακα (Πίνακας 8) που ακολουθεί, ενώ ο συντελεστής **n** της εξίσωσης Korsmeyer-Peppas υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης τον Quasi Fickian (σελ. 35) με n=0.3268 (Διάγραμμα 6). Ο λόγος που δεν χρησιμοποιείται το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas, παρόλο που παρουσιάζει το υψηλότερο R², είναι το γεγονός πως δεν αντιπροσωπεύει στο σύνολο τα πειραματικά δεδομένα απελευθέρωσης, παρά μόνο το πρώτο 60% και επομένως αποτελεί εμπειρικό μοντέλο.

Συνεπώς, από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης προέκυψε πως το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει το προφίλ της απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Higuchi, το οποίο περιγράφει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας μέσω διάχυσης βασισμένη στον νόμο του Fick, όπου εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα χρόνου. Γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ακολουθείται μηχανισμός Quasi Fickian, κατά τον οποίο κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης σε ψευδομόνιμη κατάσταση ισοροπίας. Η διάχυση είναι πιο ισχυρή από την χαλάρωση των πολυμερικών αλυσίδων. Η κινητική του συστήματος χαρακτηρίζεται από το ρυθμό διάχυσης και το σύστημα βρίσκεται σε ψευδο-μόνιμη κατάσταση ισορροπίας σε επίπεδο σωματιδίων.

Πίνακας 8: Συντελεστής R² για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης

	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer- Peppas
R ²	0.6987	0.3734	0.8619	0.8929



Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C



Διάγραμμα 5. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C



Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer- Peppas για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C



Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 ℃

4.2.6 Μελέτη Αντιοξειδωτικής δράσης

Κατά τη μελέτη, τα νανοσωματίδια με εγκλεισμένη τη ναρινγίνη δεν εμφάνισαν κάποια δράση στην ελεύθερη ρίζα του DPPH, καθώς δεν παρατηρήθηκε ο αναμενόμενος αποχρωματισμός του διαλύματος από πορφυρό χρώμα σε υποκίτρινο.

Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να προκύπτει από το γεγονός πως η εγκλεισμένη ναρινγίνη δεν έχει απελευθερωθεί στο χρονικό διάστημα που αφέθηκε το δείγμα κατά την πειραματική διαδικασία (30 λεπτά και 60 λεπτά), το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς από τη μελέτη απελευθέρωσης προκύπτει πως σημαντική ποσότητα ναρινγίνης απελευθερώνεται εντός 3 ωρών.

Πέραν αυτού, το αποτέλεσμα μπορεί να δικαιολογηθεί και με βάση του ότι η ρίζα όπου εντοπίζεται στο κέντρο της δομής του DPPH είναι προσβάσιμη κυρίως από μικρά μόρια ενώ τα μεγαλύτερα μόρια παρουσιάζουν περιορισμένη πρόσβαση λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.⁹³

Επίσης, η μέθοδος DPPH παρουσιάζει περιορισμούς σχετικά με την ικανότητα αντανάκλασης της κατανομής αντιοξειδωτικών που βρίσκονται σε σύστημα γαλακτώματος.⁸⁸

Επιπλέον, στην περίπτωση των φαινολικών ενώσεων, όπως είναι η ναρινγίνη, η αντιοξειδωτική δράση, εκφρασμένη μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH επηρεάζεται από:

- το πόσο σταθερή είναι η φαινολική ρίζα που δημιουργείται μετά τη μεταφορά υδρογόνου από την φαινολική ένωση στο DPPH
- τον αριθμό των ατόμων υδρογόνου που μπορεί να παρέχει κάθε μία από τις φαινολικές ενώσεις
- τη ταχύτητα με την οποία οι φαινολικές ενώσεις παρέχουν τα άτομα υδρογόνου
- το πόσο εύκολα οι ελεύθερες ρίζες των φαινολικών ενώσεων μπορεί να συνδυαστούν με πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες
- το αν μπορεί ή όχι να σχηματιστεί ένα νέο αντιοξειδωτικό μετά τη μεταφορά ατόμων Η από τη φαινολική ένωση

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε επιτυχής εγκλεισμός φλαβονοειδούς ένωσης με αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Naringin Hydrate) στον επιλεγμένο πολυμερικό φορέα πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA) (PLI005) με μοριακό βάρος 42 700 ± 5 400 g/mol και με ποσοστιαία φόρτωση ίση με 40%. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, βασίστηκε στην τεχνική της γαλακτωματοποίησης – εξάτμισης του διαλύτη και έλαβε χώρα χαρακτηρισμός των σωματιδίων που παρήχθησαν μέσω δυναμικής ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (DLS), φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και θερμικής ανάλυσης (TGA). Μελετήθηκε η in vitro απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από τα νανοσωματίδια, η αντιοξειδωτική δράση των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ναρινγίνη και η ικανότητα επικάλυψης των νανοσωματιδίων με χιτοζάνη.

Με βάση τις δοκιμές σε ορισμένες παραμέτρους της διαδικασίας διαπιστώθηκε η επίδραση τους στα χαρακτηριστικά των σωματιδίων και στις αποδόσεις, με αποτέλεσμα την επιλογή του καταλληλότερου συστήματος νανοεγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκε.

- Η ακετόνη ως κοινός διαλύτης του φορέα και της ουσίας οδήγησε σε πιο ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους.
- Ο χρόνος εφαρμογής των υπερήχων με βέλτιστό χρόνο τα 6 λεπτά οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα ως προς την κατανομή του μεγέθους και την ομοιομορφία των νανοσωματιδίων.
- Οι συνθήκες της φυγοκέντρησης ήταν αποτελεσματικότερες στις 17 000 rpm καθώς παρατηρήθηκαν υψηλότερες αποδόσεις διεργασίας σε σχέση με τα αποτελέσματα από τις 13 000 rpm ενώ οι 23 000 rpm έδωσαν αντίστοιχο ύψος απόδοσης με τις 17 000 rpm.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προσδιοριζόμενες αποδόσεις εγκλεισμού ήταν ικανοποιητικές με ελάχιστη τιμή 36% και μέγιστη 64%, με επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού η πλειοψηφία παρουσιάζει τιμή μεταξύ 40-46%, γεγονός που αποδίδεται στον υδρόφοβο χαρακτήρα των ενώσεων και τη χαμηλή διαλυτότητά τους στο νερό. Επιπλέον, οι αποδόσεις της διεργασίας παραγωγής παρουσίασαν μεγάλο εύρος τιμών. Ειδικότερα, οι παρτίδες των φορτισμένων σωματιδίων (1-5) έδωσαν χαμηλές αποδόσεις διεργασίας με τιμές 7-24% ενώ οι παρτίδες (6-8) έδωσαν υψηλές αποδόσεις διεργασίας με τιμές 52-65%, οι οποίες αντιστοιχούν με την τιμή απόδοσης των κενών σωματιδίων (54%).

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων ήταν επαναλήψιμη και παραλήφθηκαν κάθε φορά, σε κάθε παρτίδα που λήφθηκε, ίδιου τύπου νανοσωματίδια.

- Τα σωματίδια που παρήχθησαν είχαν μεγέθη στην περιοχή της νανοκλίμακας, 142.1nm 223.5 nm, η οποία οριοθετείται στην περιοχή 1-1000 nm και ο προσδιοριζόμενος δείκτης πολυδιασποράς είχε τιμές μεταξύ 0.051-0.215.
- Επομένως, τα μεγέθη των σωματιδίων δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις οπότε τα μεγέθη ήταν σχετικά μονοδιάσπαρτα.
- Δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες διαφορές ως προς το μέγεθος μεταξύ των κενών NPs και των φορτισμένων NPs, επιδεικνύοντας ότι η ενσωμάτωση της ναρινγίνης δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος των σωματιδίων.
- Όσον αφορά την ιδιότητα του ζ-δυναμικού, η πλειοψηφία των παραγόμενων διασπορών των σωματιδίων κρίθηκε ασταθής, δηλαδή παρουσιάζουν τάση για συσσωμάτωση, εξαιτίας των χαμηλών απόλυτων τιμών ζ-δυναμικού που προσδιορίστηκαν μέσω DLS, οι οποίες κυμαίνονταν στην περιοχή -7.1 mV έως -10.6 mV.

 Το αρνητικό πρόσημο του ζ-δυναμικού αποδόθηκε στις ουδέτερες συνθήκες pH των διασπορών και στην παρουσία των καρβοξυλομάδων του πολυμερικού φορέα του PLA.

Σημαντικά συμπεράσματα προέκυψαν από τα γραφήματα FT-IR και TGA, για τα σωματίδια με ή χωρίς εγκλεισμένη ένωση.

- Η ανάλυση μέσω FT-IR επιβεβαίωσε τον επιτυχή εγκλεισμό της ναρινγίνης στα πολυμερικά νανοσωματίδια, με βάση της αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν από τα φάσματα.
- Η ανάλυση μέσω TGA παρουσίασε τις θερμικές ιδιότητες των σωματιδίων, όπου διαπιστώθηκε η προστασία της εγκλεισμένης ναρινγίνης από το πλέγμα του PLA.

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρτικά πειράματα μελέτης απελευθέρωσης in vitro της ναρινγίνης από το σύστημα των NPs σε pH ίσο με 6.2 στους 37 \pm 0.05 °C.

- Παρατηρήθηκε η εμφάνιση ταχείας απελευθέρωσης ("burst effect") εντός των 3 ωρών με το ποσοστό απελευθέρωσης να αντιστοιχεί στο 26% της εγκλεισμένης δραστικής ουσίας.
- Η ναρινγίνη αποδεσμεύτηκε με σταθερό ρυθμό από τα πολυμερικά νανοσωματίδια φτάνοντας εν τέλει μέχρι και 48% αθροιστική απελευθέρωση μέσα σε 15 ημέρες.
- Συνολικά, παρατηρήθηκε διφασικό προφίλ όπου σε πρώτη φάση η ταχεία απελευθέρωση οφείλεται σε ποσότητα της ένωσης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται άμεσα ενώ σε δεύτερη φάση η σταθερή και βραδέα απελευθέρωση οφείλεται στη διάχυση της ένωσης μέσω των νανοσωματιδίων ή μέσω των υφιστάμενων πόρων τους και συμβαίνει παράλληλα με την υδρόλυση και την σταδιακή αποικοδόμηση του πολυμερούς.

Από την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης προέκυψε το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει το προφίλ της απελευθέρωσης.

- Το μοντέλο Higuchi περιγράφει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας μέσω διάχυσης βασισμένη στον νόμο του Fick, όπου εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα χρόνου. Γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το κινητικό μοντέλο Korsmeyer- Peppas, με βάση τον συντελεστή n, ο οποίος υποδεικνύει πως ακολουθείται μηχανισμός Quasi Fickian, κατά τον οποίο κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης σε ψευδο-μόνιμη κατάσταση.
- Με βάση τα πιο πάνω συμπεράσματα είναι δυνατή η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης του συστήματος με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεταφοράς της δραστικής ουσίας μέσω του νανοσυστήματος.

Από την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη την ναρινγίνη με τη μέθοδο DPPH, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το εξεταζόμενο σύστημα δεν παρουσίασε την ικανότητα να δεσμεύσει την ελεύθερη ρίζα του DPPH.

Η επικάλυψη των PLA-NPs με εγκλεισμένη ναρινγίνη από χιτοζάνη θεωρήθηκε επιτυχής, γεγονός που αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα του ζ-δυναμικού, συγκεκριμένα από την εναλλαγή στο πρόσημο από αρνητικό σε θετικό, η οποία οφείλεται στην παρουσία της χιτοζάνης. Η τροποποίηση αυτή επιδρά θετικά στο σύστημα, καθώς από τα αποτελέσματα του DLS παρατηρούνται σταθερότερα νανοσωματίδια και από το φάσμα του FT-IR δεν προκύπτει κάποια αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ χιτοζάνης και νανοσωματιδίων.

Τέλος, οι δυσκολίες που συναντήθηκαν κατά τη διαδικασία παρασκευής των σωματιδίων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο πολυπαραμετρικός χαρακτήρας της διεργασίας οδηγεί στην ανάγκη σχεδιασμού πειραμάτων και μοντελόποιησης ιδίως για τη μετάβαση από την εργαστηριακή στην εμπορική κλίμακα. Πληθώρα παραμέτρων ρυθμίστηκαν κατάλληλα με βάση τη βιβλιογραφία και την πειραματική παρατήρηση μέχρι τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των σωματιδίων να είναι αποδεκτά.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από το σύνολο της παρούσας εργασίας συμπεραίνεται ότι ο σχηματισμός νανοσωματιδίων και ο εγκλεισμός δραστικών ουσιών σε αυτά αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη φαρμακευτική βιομηχανία και όχι μόνο. Βάση των πειραμάτων που έγιναν και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθούν κάποια σημεία της έρευνας περαιτέρω με επιπλέον συμπληρωματικά πειράματα τα οποία θα δώσουν πληροφορίες για τη βιωσιμότητα της εφαρμογής νανοσωματιδίων στη φαρμακευτική βιομηχανία ενισχύοντας τις επιδόσεις των αντίστοιχων προϊόντων. Έτσι, προτείνονται οι εξής προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

Μελέτη μορφολογίας των NPs

Σε πρώτη μέριμνα πρέπει να είναι πειράματα που αφορούν την εξακρίβωση της μορφολογίας και του μεγέθους των σωματιδίων. Επομένως, απαιτείται η εξέταση των σωματιδίων είτε σε λυοφιλοποιημένη μορφή είτε σε μορφή διασποράς με κατάλληλες τεχνικές όπως η SEM και η TEM. Θα είναι δυνατή η εξακρίβωση των διαφοροποιήσεων ως προς το μέγεθος με βάση αυτά που υπολογίζονται στη διάταξη DLS, ενώ δύναται να δώσουν και πληροφορίες για τη μορφολογία των παραγόμενων σωματιδίων.

Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων των NPs

Η Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) αποτελεί μία διαδεδομένη μέθοδο θερμικής ανάλυσης πολυμερικών υλικών για την τη μελέτη των θερμικών μεταπτώσεών τους. Μέσω της DSC δύναται να προσδιοριστούν φυσικές ή χημικές αλλαγές σε ένα δείγμα ως συνέπεια της μεταβολής της θερμοκρασίας. Σε αυτές τις αλλαγές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Tg), η θερμοκρασία (Tc) και η ενθαλπία (ΔHc) κρυσταλλώσεως, η θερμοκρασία (Tm) και η ενθαλπία (ΔHm) τήξης κρυσταλλικών πολυμερών και η θερμοκρασία θερμικής διάσπασης (Td). Από τη μελέτη της ανάλυσης μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα τόσο για τις αλληλεπιδράσεις της ένωσης και του πολυμερικού φορέα αλλά και για την επίδραση των χαρακτηριστικών τους κατά τη μελέτη απελευθέρωσης.

Μελέτη των επικαλυμμένων με χιτοζάνη νανοσωματιδίων

Επικείμενο στόχο αποτελεί η εξέταση των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων ως προς τα μορφολογικά, δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους ώστε να εξαχθούν ολοκληρωμένα συμπεράσματα ως προς τον τρόπο που επηρεάζουν το σύστημα των PLA-NPs με εγκλεισμένη ναρινγίνη και επιπλέον θεωρείται σκόπιμη η μελέτη απελευθέρωσης της ναρινγίνης από τα επικαλυμμένα με χιτοζάνη PLA-NPs, ώστε να γίνει συγκριτική μελέτη των συστημάτων απελευθέρωσης.

Μελέτη ζ-δυναμικού

Πέρα από τα ανωτέρω, μία ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος που αφορά τα σωματίδια είναι το ζδυναμικό. Στη δεδομένη διπλωματική εργασία δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη του ζ-δυναμικού ως συνάρτηση του pH το οποίο αποτελεί την κρισιμότερη παράμετρο αυτού του μεγέθους αλλά προσδιορισμός του σε μία μοναδική τιμή για κάθε διασπορά σωματιδίων. Η μελέτη του ζ-δυναμικού ως συνάρτηση του pH μπορεί να δώσει πληροφορίες για το ισοηλεκτρικό σημείο, αλλά και για τις περιοχές pH στις οποίες τα σωματίδια θα είναι σταθερά εντός της διασποράς. Επομένως, η μελέτη αυτού του μεγέθους ως συνάρτηση αυτής της παραμέτρου δύναται να δώσει σημαντικές πληροφορίες για το περιβάλλον που θα πρέπει να βρίσκονται τα σωματίδια για την εκάστοτε εφαρμογή.

Μελέτη και βελτιστοποίηση της διεργασίας σχηματισμού NPs

Σκόπιμη θεωρείται η περεταίρω μελέτη των παραγόντων της διεργασίας εγκλεισμού σε νανοσωματίδια με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης, είτε αφορά τα χρησιμοποιούμενα υλικά (π.χ. πολυμερικός φορέας, συστατικά προς εγκλεισμό, επιφανειοδραστικές ενώσεις κ.α.) είτε τις γενικότερες τεχνικές (π.χ. τεχνική γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη, φυγοκέντρηση, ξήρανση με κατάψυξη κ.α.) είτε τις παραμέτρους των διεργασιών (π.χ. θερμοκρασία, αναλογίες υλικών κλπ.), καθώς επιδέχονται τροποποιήσεις και εκ νέου επιλογές με τελικό στόχο τη βελτίωση του παραγόμενου αποτελέσματος, δηλαδή του προϊόντος.

Έλεγχος βελτίωσης των ιδιοτήτων της εγκλεισμένης ένωσης

Μελέτη της βιολογικής δράσης (αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική, αντικαρκινική, τοξικότητας) των νανοσωματιδίων που περιέχουν την εγκλεισμένη ουσία. Διερεύνηση της διαλυτότητας των νανοσωματιδίων με την εγκλεισμένη ένωση σε νερό και σε κοινούς οργανικούς διαλύτες.

Μελέτη της σταθερότητας των νανοσωματιδίων που περιέχουν τη ναρινγίνη

Προτείνεται να πραγματοποιηθούν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για διαφορετικούς χρόνους και συνθήκες αποθήκευσης, ώστε να μελετηθεί η σταθερότητα του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Τελευταίο κομμάτι αποτελεί η διαδικασία μεταφοράς από την εργαστηριακή κλίμακα σε πιλοτική κλίμακα και στη συνέχεια σε βιομηχανική κλίμακα (scale up) προκειμένου όλα τα προηγούμενα πειράματα να γνωρίσουν εμπορική εφαρμογή. Φυσικά, η μεταφορά από μία κλίμακα παραγωγής εργαστηρίου σε μία κλίμακα βιομηχανίας αποτελεί διαχρονικά ένα από τα δυσκολότερα προβλήματα που έχει να αντιμετωπίσει ο χημικός μηχανικός και παρόμοιες ειδικότητες, αφού οι διαφοροποιήσεις στις συμπεριφορές των προϊόντων είναι συνήθως χαώδεις. Τότε απαιτείται η γεφύρωση και εξάλειψη αυτών των διαφοροποιήσεων προκειμένου τα προϊόντα να επιδέχονται βιομηχανικής παραγωγής. Η μετάβαση αυτή μπορεί να είναι δυνατή μέσω πειραματικού σχεδιασμού και μοντελοποίησης ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η ακρίβεια των δόσεων του φαρμάκου αλλά και να μειωθεί το κόστος και ο χρόνος χωρίς να χρειάζεται επιπλέον πειραματική μελέτη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



Εικόνα 26. Κατανομή μεγέθους PLA_NPs



Εικόνα 27. ζ-δυναμικό PLA_NPs



Εικόνα 28. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_1



Εικόνα 29. ζ-δυναμικό PLA_Nar_1



Εικόνα 30. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_2



Εικόνα 31. ζ-δυναμικό PLA_Nar_2



Εικόνα 32. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_3



Εικόνα 33. ζ-δυναμικό PLA_Nar_3



Εικόνα 34. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_4



Εικόνα 35. ζ-δυναμικό PLA_Nar_4



Εικόνα 36. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_5



Εικόνα 37. ζ-δυναμικό PLA_Nar_5



Εικόνα 38. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_6



Εικόνα 39. ζ-δυναμικό PLA_Nar_6



Εικόνα 40. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_7



Εικόνα 41. ζ-δυναμικό PLA_Nar_7



Εικόνα 42. Κατανομή μεγέθους Coating_PLA_Nar_1



Εικόνα 43. ζ-δυναμικό Coating_PLA_Nar_1



Εικόνα 44. Κατανομή μεγέθους Coating_PLA_Nar_6



Εικόνα 45. ζ-δυναμικό Coating_PLA_Nar_6

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΔΣ1. I. Pitterou, I. Kostopoulou, **G. Petridou**, S. Papastefanou, E. Kavetsou, A. Detsi, EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, 1-5 September **2019**, Athens, Greece.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Williams A. C., Grayer J. R. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports, 21,* 539-573. DOI: 10.1039/B311404J
- 2. Panche N. A., Diwan A. D., Chandra R. S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*(47), 1-15. doi:10.1017/jns.2016.41
- 3. Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics, 96*, 67-202.
- Middleton E. Jr, Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52 (4), 673-751.
- 5. Tapas A.R.; Sakarkar D.M.; Kakde R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3), 1089-1099.
- 6. Martens S, Mithöfer A. (2005). Flavones and flavones synthases. Phytochemistry, 66, 2399-2407
- Marais J. P. J., Deavours B., Dixon R. A., Ferreira D. (2005). The Stereochemistry of Flavonoids. In Grotewold E. (Ed.) The Science of Flavonoids (pp. 1-46). Columbus, Ohio, USA: Springer Science_Business Media, Inc.
- 8. Pan M., Lai C., Ho C. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct., 1*, 15-31. doi:10.1039/C0FO00103A
- 9. Dey P.M. and Harborne J.B. (1989). Methods in Plant Biochemistry. Vol. I pp. 197- 441, Academic Press: London.
- 10. Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics, 96*, 67-202.
- 11. Andersen O. M., Markham K. R. (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- 12. Rice- Euans A. C., Packer L. (2003). *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker.
- 13. Eung-Ryoung L., Geun-Ho K., Ssang-Goo C. (2007). Effect of Flavonoids on Human Health: Old Subjects but New Challenges. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(2), 139-150.
- 14. Korkina LG, Afanas'ev IB. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol, 38*, 151–63.
- 15. Brunetti C., Ferdinando M., Fini A., Pollastri S., Tattini M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3540-3555. doi:10.3390/ijms14023540
- 16. Nishizuka υ. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, *334* (6184), 661–665.
- 17. T. Hunter. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell, 80* (2), 225–236.
- 18. Y. Li, H. Fang, W. Xu, (2007). Recent Advance in the Research of Flavonoids as Anticancer Agents. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, *16*, 663-678.
- 19. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chemistry*, *104*, 466–479.
- 20. Tomás-Navarro M., Vallejo F., Tomás-Barberán F. A. (2014). Chapter 40 Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans. *Polyphenols in Human Health and Disease, 1,* 537-551.
- 21. Braverman JBS. (1949). Citrus products. Chemical composition and chemical technology. New York: Interscience Publishers.
- 22. Sinclair WB. (1972). The grapefruit: its composition, physiology & products. Berkeley: UC ANR publications.

- 23. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Naringoside, CID=4441, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/naringin (accessed on May 30, 2019)
- 24. A. Scheepens, K. Tan, J.W. Paxton. (2010). Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr, 5,* 75–87.
- 25. Marston, A.; Hostettmann, K. (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. In Andersen, Ø. M., Markham K. R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications* (pp. 1), Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- 26. Chen Y.T., Zheng R. L., Jia Z. J., Ju Y. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free *Radical Biology and Medicine*, 9 (1), 19-21.
- 27. Bacanli M, Basaran AA, Basaran N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem Toxicol, 81,* 160–170.
- 28. Jagetia GC, Reddy TK, Venkatesha VA, Kedlaya R. (2004). Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta*, *347*, 189–197.
- 29. Anh NT, Nishitani M, Harada S, Yamaguchi M, Kamei K. (2011). A Drosophila model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants. *Mol Cell Biochem*, *352*, 91–98.
- 30. Anucha K, Pari L. (2011). Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact, 193*, 57–64.
- 31. Pari L, Amudha K. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol, 650*, 364–370.
- 32. Cariño-Cortés R, Alvarez-González I, Martino-Roaro L, Madrigal-Bujaidar E. (2010). Effect of naringin on the DNA damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes. *Biol Pharm Bull,* 33, 697–701.
- 33. Luo YL, Zhang CC, Li PB, Nie YC, Wu H, Shen JG, Su WW. (2012). Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke. *Int Immunopharmacol*, 13,301–307.
- 34. Lewinska A, Siwak J, Rzeszutek I, Wnuk M. (2015). Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. *Toxicol in Vitro., 29*, 417–425.
- 35. Tan TW, Chou YE, Yang WH, Hsu CJ, Fong YC, Tang CH. (2014). Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126. *Int. Immunopharmacol., 22*, 107–114.
- 36. Ramesh E, Alshatwi AA. (2013). Naringin induces death receptor and mitochondria- mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food Chem Toxicol., 51*, 97–105.
- 37. N. R. J. H. Bhuvanesh Gupta. (2007). Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in polymer science*, 32, 455-482.
- 38. L. Xiao, B. Wang, G. Yang, M. Gauthier. (2012). Poly(lactic acid) Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Intech*, 248-282.
- 39. R. Auras, L. T. Lim, S. E. Selke, H. Tsuji. (2010). Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processes and Application. Eds. John Wiley & Sons, New Jersey.
- 40. D. E. Henton, P. Gruber, J. Lunt, J. Randall. (2005). Poly(lactic acid) Technology. *Natural Fibers, Biopolymers and Biocomposites, 16,* 529-578.
- 41. J. Ahmed, S. Varshney. (2010). Polylactides- Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review. *International Journal of Food Properties*, 14 (1), 37-58.
- 42. G. Perego, G. D. Cella, C. Bastioli. (1996). Effect of molecular weight and crystallinity on Poly(lactic acid) Mechanical Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, *59*, 37-43.
- 43. I. Engelberg, J. Kohn. (1991). Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medicinal applications: a comparative study. *Biomaterials, 12,* 292-304.
- 44. R. Auras, B. Harte, S. Selke. (2004). An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*, *4*, 835-864.
- 45. Smith R. (2005). Biodegradable polymers for industrial applications. *Woodhead Publishing Limited*.
- 46. Bastioli C. (2005). Handbook of Biodegradable Polymers, Rapra Technology Limited.
- 47. Gupta A.P., Kumar V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymersPolylactide: A critique. *Eur. Pol. J., 43*, 4053.
- 48. Agarwal M., Koelling K.W., Chalmers J.J. (1998). Characterization of the degradation of Polylactic Acid Polymer in a solid substrate environment, *Biotechnology*, *14*, 517-526.
- 49. Kulkami, R. K. Moore, E. G. Hegyeli, A. F. Leonard. (1971). Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *Journal of Biomedical Materials Research, 5,* 169-181.
- 50. Albertsson A, Indra K. Varma. (2002). Aliphatic polyesters: Synthesis, properties and applications. *Advances in Polymer Science*, *157*, 1-40.
- 51. Ikada Y, Tsuji H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, *21*,117-132.
- 52. Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci., 31, 603–632.
- 53. Gavhane Y.N., Gaurav A.S., Yadav A.V. (2013). Chitosan and its application: A review of literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical*, *4*, 312-331.
- 54. P. K. Dutta, J. Dutta, V. S. Tripathi. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research, 63*, 20-31.
- 55. Prabaharan B (2008). Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. J Biomater Appl., 23(1), 5-36.
- 56. L. Liu, Y. Li, H. Liu, Y. Fang. (2004). Synthesis and characterization of chitosan-graftpolycaprolactone copolymers. *European Polymer Journal, 40*, 2739–2744.
- 57. Carreno-Gomez, B., A. Duncan. (1997). Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutical*, *148*, 231-240.
- 58. Kumari A, Kumar Yadav S., Yadav S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*, 1–18.
- 59. Mora-Huertasa C.E., Fessia H., Elaissaria A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *385*, 113–142.
- 60. Mahapatro A., Singh D.K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnol.*, *9*, 55.
- 61. Kissel T., Maretschek S., Packhäuser C., Schnieders J., Seidel N. (2006). Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry, in *Microencapsulation Methods and Industrial Applications, Second Edition*, ed. Simon Benita, New York, USA: CRC Press.
- 62. Finch A. C., Bodmeier R. (2011). Microencapsulation, in Elvers B., Hawkins S., Schulz G., Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley- VCH.
- Kulkarni A. A., Rao P. S. (2013). Synthesis of polymeric nanomaterials for biomedical applications, in Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and Applications, A. K. Gaharwar et al., Eds. Philadelphia, U.S.A: Woodhead Publishing Limited, ch. 2, pp. 27-63.
- 64. Rao J., Geckeler K.. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size control parameters. *Progress in polymer science, 36*, 887-913.
- 65. Reis C., Neufeld R., Ribeiro A. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2*, 8–21.
- 66. Elias Fattal, Herv Hillaireau, Simona Mura, Julien Nicolas, and Nicolas Tsapis, (2012). Targeted Delivery Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles, in *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Juergen Siepmann, Ronald A. Siegel, and Michael J. Rathbone, Eds. New York, U.S.A: Springer Science & Business Media, ch. 10, 255-288.
- 67. Mahapatro A., Singh D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, *9*, 55.

- 68. Ming L., Olivier R., Poncelet D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process. *International Journal of Pharmaceutics*, *363* (1-2), 26–39.
- 69. O'Donnell B. P., McGinity W. J. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews, 28* (1), 25–42.
- 70. Patel H.M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 9,* 39-90.
- 71. Moghimi, S.M., Davis, S.S. (1994). Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 11,* 31-59.
- 72. Xiao R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M. (2010). Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *5*, 1057–1065.
- 73. Moghimi, S.M., Porter, C.J.H., Muir, I.S., Illum, L., Davis, S.S. (1991). Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: Influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 177,* 861-866.
- 74. Hunter R.J. (1991). In: Zeta Potential in Colloid Science: principles and applications. London, UK: Academic Press.
- 75. Shenoy D.B., Amiji M.M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceuticals*, 293 (1–2), 261–270
- Reis C. P., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2*(1), 8-21.
- 77. Chacon M., Molpeceres J., Berges L., Guzman M., Aberturas M.R. (1999). Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D, L lactide-glycolide) carriers. *Eur. J. Pharm. Sci., 8*, 99–107.
- 78. Franks F. (1998). Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 221–229.
- 79. Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H. (2006). Freeze drying of nanoparticles: Formulation, process and storage consideration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *58*, 1688–1713.
- 80. Bharti, S. et al. (2014). Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Med., 80,* 437–451.
- 81. <u>https://www.fda.gov/science-research/nanotechnology-programs-fda/fdas-approach-regulation-nanotechnology-products</u>
- 82. <u>https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols</u>
- 83. Lin P.C., Lin S., Wang P.C., Sridhar R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv., 32* (4), 711-26. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006
- Ullmann F., Bohet M. (2005). Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley VCH, 23, 157-172.
- 85. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev.* doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- 86. Peppas NA, Narasimhan B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *J Control Release, 190,* 75-81. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.041
- 87. Mohanraj VJ, Chen Y. (2006). Nanoparticles A Review. Trop J Pharm Res., 5, 561-573.
- 88. Kedare B. S., Singh P. R. (2001). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol., 48(4), 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- 89. Cummings NA, Nordby GL. (1966). Measurement of synovial fluid pH in normal and arthritic knees. *Arthritis Rheum., 9* (1), 47-56.

- 90. Kumari A, Kumar Yadav S., Chaudhary A., Yadav S.C. (2011). Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 82,* 224-232.
- 91. Xing J., Zhang D., Tan T. (2007). Studies on the oridonin-loaded poly(d, l-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40 (2), 153–158.
- 92. Weng XC, Huang Y. (2014). Relationship structure-antioxidant activity of hindered phenolic compounds. *Grasas y Aceites*, 65(4). doi:10.3989/gya.0225141
- 93. Prior RL, Wu X, Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*, *53*(10), 4290-4302. doi:10.1021/jf0502698

EYPETHPIO

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Βασική δομή φλαβονοειδών8
Εικόνα 2. Οι τρεις επιμέρους ομάδες των φλαβονοειδών8
Εικόνα 3. Υποομάδες φλαβονοειδών9
Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικά φλαβονοειδή από κάθε υποομάδα και οι φυσικές πηγές τους (A) flavones, (B) flavonols, (C) flavanols, (D) flavanones, (E) isoflavones, (F) anthocyanidins. ⁸
Εικόνα 5. Βιοσύνθεση φλαβονοειδών ⁹ 11
Εικόνα 6. Συνοπτική αναπαράσταση των ρόλων των φλαβονοειδών σε διάφορες βιολογικές δραστηριότητες στην γεωργία και ανθρώπινη υγεία ² 12
Εικόνα 7. Η δομή της ναρινγίνης13
Εικόνα 8. Επισκόπηση των διάφορων ασθενειών και συνθηκών στις οποίες η ναρινγίνη παρουσιάζει προστατευτική και θεραπευτική δράση ⁸⁰ 15
Εικόνα 9. Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά)
Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της χιτίνης σε χιτοζάνη
Εικόνα 11. Είδη νανοσωματιδίων21
Εικόνα 12. Ιδιότητες νανοσωματιδίων22
Εικόνα 13. Παραγόμενες δομές σωματιδίων από διαδικασίες εγκλεισμού ενώσεων σε πολυμερή 23
Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου απλού γαλακτώματος
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διπλού γαλακτώματος
Εικόνα 16. Μηχανισμοί απελευθέρωσης: (Α) Διάχυση μέσω πόρων νερού, (Β) Διάχυση μέσω του πολυμερούς, (C) Ωσμωτική άντληση και (D) Διάβρωση32
Εικόνα 17. Ανοικτά τετράγωνα: απότομη απελευθέρωση και ταχεία φάση ΙΙ, πλήρεις κύκλοι: τριφασική απελευθέρωση με σύντομη φάση ΙΙ. Διασταυρώσεις: απότομη απελευθέρωση μηδενικής τάξης. Γεμάτα διαμάντια: τριφασική απελευθέρωση. Παύλες: διφασική απελευθέρωση
Εικόνα 18. Γραφική απεικόνιση μαθηματικών μοντέλων κινητικής απελευθέρωσης
Εικόνα 19. Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH43
Εικόνα 20. Αντίδραση της DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών43

Εικόνα 21. Φάσμα FT-IR PLA	50
Εικόνα 22. Φάσμα FT-IR Ναρινγίνη	50
Εικόνα 23. Φάσμα FT-IR PLA_Nar_6	51
Εικόνα 24. Φάσμα FT-IR Coating_PLA_Nar_6	51
Εικόνα 25. Συνολικό διάγραμμα TGA της Ναρινγίνης (πράσινο χρώμα), των κενών NPs (μ των φορτισμένων NPs (κόκκινο χρώμα)	ιπλε χρώμα) και 53
Εικόνα 26. Κατανομή μεγέθους PLA_NPs	63
Εικόνα 27. ζ-δυναμικό PLA_NPs	63
Εικόνα 28. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_1	63
Εικόνα 29. ζ-δυναμικό PLA_Nar_1	64
Εικόνα 30. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_2	64
Εικόνα 31. ζ-δυναμικό PLA_Nar_2	64
Εικόνα 32. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_3	65
Εικόνα 33. ζ-δυναμικό PLA_Nar_3	65
Εικόνα 34. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_4	65
Εικόνα 35. ζ-δυναμικό PLA_Nar_4	66
Εικόνα 36. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_5	66
Εικόνα 37. ζ-δυναμικό PLA_Nar_5	66
Εικόνα 38. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_6	67
Εικόνα 39. ζ-δυναμικό PLA_Nar_6	67
Εικόνα 40. Κατανομή μεγέθους PLA_Nar_7	67
Εικόνα 41. ζ-δυναμικό PLA_Nar_7	68
Εικόνα 42. Κατανομή μεγέθους Coating_PLA_Nar_1	68
Εικόνα 43. ζ-δυναμικό Coating_PLA_Nar_1	68
Εικόνα 44. Κατανομή μεγέθους Coating_PLA_Nar_6	69
Εικόνα 45. ζ-δυναμικό Coating_PLA_Nar_6	69

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς Ναρινγίνης (λmax=283.2 nm)41
Διάγραμμα 2. Γραφική παράσταση της συσχέτισης των στροφών της φυγοκέντρησης σε σχέση με την απόδοση διεργασίας
Διάγραμμα 3. Προφίλ απελευθέρωσης in vitro των PLA NPs με εγκλεισμένη ναρινγίνη (pH= 6.2, T= 37 oC). Πάνω: 0-24 ώρες, Κάτω: 0- ώρες
Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Μηδενικής τάξης για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C55
Διάγραμμα 5. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Πρώτης τάξης για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C56
Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer- Peppas για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C
Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για την απελευθέρωση της ναρινγίνης από τα PLA-NPs σε pH=6.2 στους 37 ± 0.5 °C57 Ευρετήριο Σχημάτων
Σχήμα 1. Στάδια βιοαποικοδόμησης PLA18
Σχήμα 2. Ταξινόμηση τεχνικών σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων
Σχήμα 3. Γραφική απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας παρασκευής και συλλογής νανοσωματιδίων 37 Ευρετήριο Πινάκων
Πίνακας 1: Επίδραση παραμέτρων της διεργασίας στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων
Πίνακας 2: Κύριες τεχνικές για την αξιολόγηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των πολυμερικών NPs
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των μαθηματικών μοντέλων για κινητική της απελευθέρωσης
Πίνακας 4: Ποσότητες Δοκιμών NPs46
Πίνακας 5: Ποσότητες Δοκιμών Επικαλυμμένων NPs46
Πίνακας 6: Προσδιορισμός Απόδοσης Διεργασίας και Απόδοσης Εγκλεισμού
Πίνακας 7: Αποτελέσματα μεγέθους, PDI, ζ-δυναμικού κενών, φορτωμένων και επικαλυμμένων νανοσωματιδίων
Πίνακας 8: Συντελεστής R ² για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης