



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ
ΠΟΛΥΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ**

Τερψιχόρη Καββαθά

Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, σε συνεργασία με την εταιρεία φυσικών προϊόντων Κορρές. Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε ο εγκλεισμός του αντιοξειδωτικού υδροξυτυροσόλη σε βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια πολυγαλακτικού οξέος, με στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας της δραστικής ουσίας κατά την ενσωμάτωσή της σε καλλυντική κρέμα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ Αναστασία Δέτση, Επίκουρο Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη διάθεση που έδειξε και το χρόνο που αφιέρωσε για να στηρίξει την επιθυμία μου, να διεξαχθεί η παρούσα διπλωματική σε συνεργασία με την εταιρεία Κορρές.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κύριο Γιώργο Κορρέ, Φαρμακοποιό-Πρόεδρο του Ομίλου Κορρές, που δέχθηκε χωρίς δεύτερη σκέψη, να πραγματοποιηθεί η παρούσα διπλωματική εργασία σε συνεργασία με την εταιρεία Κορρές και στην κυρία Λένα Φιλίππου, Χημικό Μηχανικό-Διευθύντρια Ανάπτυξης του Ομίλου Κορρές, που με στήριξε, τόσο στην επιλογή του θέματος της εργασίας όσο και καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Δρ Σταματίνα Βουγιούκα, Λέκτορα ΕΜΠ, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την καθοριστική βοήθειά της και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Δρ Αντώνη Καραντώνη, Επίκουρο Καθηγητή ΕΜΠ, για τη συνεισφορά του στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στην Δρ Μαρίνα Ρουσσάκη, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και τη συμπαράσταση που μου έδειχνε σε κάθε βήμα της ερευνητικής αυτής εργασίας. Χωρίς το χρόνο που αφιέρωσε, την υπομονή και τις πολύτιμες συμβουλές της, δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η εργασία αυτή.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ θερμά τη Χρυσούλα Σταματογιάννη, Χημικό Μηχανικό-RnD Formulator της εταιρείας Κορρές, για το χρόνο που αφιέρωσε και τις συμβουλές τις, οι οποίες διευκόλυναν σημαντικά την προσπάθειά μου.

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών, για το θετικό κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν στο εργαστήριο και τη Διπλωματούχο Χημικό Μηχανικό ΕΜΠ Τζούλια Διαμάντη, με την οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους, που στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού βιοδραστικών μορίων έχουν ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων, καθώς προστατεύουν τις εγκλεισμένες ενώσεις και βελτιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Η μέθοδος αυτή βρίσκει ήδη εφαρμογές σε διάφορες βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας των καλλυντικών. Σήμερα πραγματοποιείται έρευνα για την ανάπτυξη πολλών νανοσωματιδιακών δομών εγκλεισμού βιοδραστικών μορίων.

Πολλές από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα σε καλλυντικά σκευάσματα μειονεκτούν ως προς τη σταθερότητά τους. Επομένως, η προσθήκη σταθερότερων δομών αντιοξειδωτικών ουσιών σε καλλυντικά προϊόντα θα βελτίωνε συνολικά την απόδοσή τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυγαλακτικού οξέος για την προστασία της κατά την ενσωμάτωσή της σε καλλυντικό προϊόν. Η ένωση που επιλέχθηκε, ανήκει στην κατηγορία των πολυφαινόλων, απαντάται φυσικά στην ελιά και παρουσιάζει ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιήθηκε μέσω δύο αντιδράσεων, με απόδοση 75%. Το πολυμερές που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε από την υδρολυτική διάσπαση εμπορικού δείγματος πολυγαλακτικού οξέος και ακολούθησε ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης στα νανοσωματίδια πολυγαλακτικού οξέος, σύμφωνα με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη. Η διαδικασία του εγκλεισμού επαναλήφθηκε σε μεγάλη κλίμακα, ώστε να παραχθεί η απαραίτητη ποσότητα νανοσωματιδίων για την ενσωμάτωσή τους στην κρέμα. Η απόδοση του εγκλεισμού ήταν άκρως ικανοποιητική (72.24-92.59%) και προσδιορίστηκε έμμεσα, με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιαφοράς και το ζ-δυναμικό, μέσω της μεθόδου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός(DLS). Για τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν βρέθηκε ότι έχουν μέγεθος της τάξης των 500 nm και αποτελούν σταθερές νανοσωματιδιακές δομές. Η μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα φάνηκε να μην επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, ελάττωσε όμως την απόδοση του εγκλεισμού. Η ενσωμάτωσή των νανοσωματιδίων στην κρέμα πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και ο έλεγχος σταθερότητας έδειξε ότι η ενσωμάτωση αυτή δεν επηρέασε τη σταθερότητα του προϊόντος.

ABSTRACT

Encapsulation of active ingredients in nanoparticles has a wide range of potential, as it can protect the encapsulated compounds and improves their physicochemical properties. This method has already been applied in many industries, including the cosmetic industry. Nowadays, many kinds of nanoparticles are under various stages of development.

Due to their biological properties antioxidants are widely used as ingredients of cosmetics however, they often present stability issues. Consequently, the integration of more stable ingredients in cosmetics can improve the products.

This project focuses on the encapsulation of hydroxytyrosol in biodegradable poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles, in order to protect the compound in cosmetic formulations. The selected compound, member of the polyphenols family, can be found naturally in olive leaves and exhibits strong antioxidant activity.

The synthetic hydroxytyrosol was produced by a sequence of two reactions (accuracy 75%). The PLA used was obtained by degradation of polymer of high molecular weight and the properties of the produced polymer were determined. Hydroxytyrosol was encapsulated, using the emulsification-solvent evaporation method. The encapsulation procedure was scaled-up, in order to produce the quantity of nanoparticles required for the formulation of the cream. Encapsulation efficiency (EE) of hydroxytyrosol in PLA nanoparticles was determined indirectly using UV-Vis spectrometry. The results of EE were satisfactory, ranging from 72.24 % to 92.59%. Size, polydispersity index and ζ -potential determinations were performed by dynamic light scattering methods (DLS). It was found that the nanoparticles were stable and their diameter was about 500 nm. Scale-up influenced the EE but not the characteristics of the nanoparticles. Nanoparticles were added in cream successfully and the stability test indicated that the nanoparticles did not influence the stability of the product.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	iii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	iv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	vi
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών	1
1.1.1 Γενικές έννοιες-Ορισμοί.....	1
1.1.2 Σκοπός και εφαρμογές του νανοεγκλεισμού.....	3
1.1.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε μικρο/νάνο-σωματίδια.....	4
1.1.4 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη	7
1.1.5 Ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας.....	9
1.1.6 Ιδιότητες των Νανოსωματιδίων.....	12
1.1.7 Χαρακτηρισμός των Νανοςωματιδίων	14
1.2 Υδροξυτυροσώλη	15
1.2.1 Προέλευση της υδροξυτυροσώλης.....	15
1.2.2 Χημική δομή της υδροξυτυροσώλης	16
1.2.3 Η Υδροξυτυροσώλη ως φυσικό αντιοξειδωτικό	16
1.3 Πολυγαλακτικό οξύ	18
1.3.1 Εισαγωγή.....	18
1.3.2 Χημική Δομή και ιδιότητες του PLA	18
1.3.3 Υδρολυτική διάσπαση του PLA	20
1.3.4 Κύκλος Ζωής του PLA	21
1.4 Γαλακτώματα-Εφαρμογές στην καλλυντική βιομηχανία.....	22
1.4.1 Γαλάκτωμα-Τύποι γαλακτωμάτων.....	22
1.4.2 Σταθερότητα των καλλυντικών κρεμών-Σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων	25
1.4.3 Έλεγχος Σταθερότητας Γαλακτώματος.....	26

2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	29
3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
3.1	Όργανα και συσκευές.....	31
3.2	Υλικά.....	31
3.3	Μέθοδοι.....	32
3.3.1	Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης (3).....	32
3.3.2	Υδρολυτική διάσπαση του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και προσδιορισμός των ιδιοτήτων του	33
3.3.3	Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός της ένωσης.....	42
3.3.4	Ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε κρέμα.....	46
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	49
4.1	Χαρακτηρισμός δομής νέων παραγώγων.....	49
4.1.1	Φασματοσκοπική μελέτη και ταυτοποίηση της δομής του μεθυλεστέρα του 3,4-διυροξυ-φαινυλοξικού οξέος.....	49
4.1.2	Φασματοσκοπική μελέτη και ταυτοποίηση της δομής της Υδροξυτυροσόλης.....	51
4.2	Χαρακτηρισμός του Πολυγαλακτικού Οξέος	53
4.3	Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων	56
4.3.1	Χαρακτηρισμός κενών πολυμερικών νανοσωματιδίων	56
4.3.2	Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη.....	59
4.4	Μελέτη σταθερότητας των νανοσωματιδίων.....	61
4.5	Απόδοση εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης	62
4.6	Έλεγχος Σταθερότητας της κρέμας	65
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	73
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

PLA_1: Δείγμα πολυγαλακτικού οξέος μετά από υδρόλυση 1 ημέρας

PLA_2: Δείγμα πολυγαλακτικού οξέος μετά από υδρόλυση 2 ημερών

PLA_3: Δείγμα πολυγαλακτικού οξέος μετά από υδρόλυση 3 ημερών

PLI005: Ονομασία του εμπορικού δείγματος PLA

Blank_1: Σχηματισμός κενών νανοσωματιδίων του πολυμερούς PLA_1

Blank_2: Σχηματισμός κενών νανοσωματιδίων του πολυμερούς PLA_2

Blank_3: Σχηματισμός κενών νανοσωματιδίων του πολυμερούς PLA_3

NP_1: Πείραμα εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε μεγάλη κλίμακα

NP_2: Πείραμα εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε μικρή κλίμακα

FTC: Κύκλος ψύξης-απόψυξης

BC: Βάση κρέμας (Base cream)

BCA: Βάση κρέμας μετά την προσθήκη των νανοσωματιδίων (Base cream with active)

FTC_BC: Δείγμα BC μετά τον κύκλο ψύξης-απόψυξης (Freeze-Thaw Cycle)

FTC_BCA: Δείγμα BCA μετά τον κύκλο ψύξης-απόψυξης

BC_5, BCA_5: Δείγματα BC και BCA που αποθηκεύτηκαν στους 5 °C

BC_25, BCA_25: Δείγματα BC και BCA που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C

BC_40, BCA_40: Δείγματα BC και BCA που αποθηκεύτηκαν στους 40 °C

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Δομές βιοαποδομήσιμων νανοσωματιδίων	2
Εικόνα 1.2: Σχηματική περιγραφή της τεχνικής απλού γαλακτώματος	7
Εικόνα 1.3: Σχηματική περιγραφή της μεθόδου διπλού γαλακτώματος	8
Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση των κατηγοριών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης	11
Εικόνα 1.5: Υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης.....	15
Εικόνα 1.6: Η χημική δομή της υδροξυτυροσόλης	16
Εικόνα 1.7: Χημική δομή του PLA	19
Εικόνα 1.8: Στεreo-ισομερείς δομές του PLA	19
Εικόνα 1.9: Υδρολυτική διάσπαση PLA	20
Εικόνα 1.10: Ο κύκλος ζωής του PLA	21
Εικόνα 1.11: Τύποι γαλακτώματος: (α) λάδι σε νερό-o/w, (β) νερό σε λάδι-w/o	22
Εικόνα 1.12: Ταξινόμηση των γαλακτωμάτων με βάση το δείκτη HLB	24
Εικόνα 3.1: Αντίδραση εστεροποίησης.....	32
Εικόνα 3.2: Αντίδραση αναγωγής	33
Εικόνα 3.3: Ιξωδόμετρο τύπου Ubbelonde	35
Εικόνα 3.4: Αυτόματος τιτλοδότης για τον αναλυτικό προσδιορισμό ακραίων ομάδωνομάδων.	38
Εικόνα 3.5: Συσκευή Mettler DSC 1 STARe System.....	40
Εικόνα 3.6: Shaker Gallenkamp.....	43
Εικόνα 3.7: Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής	45
Εικόνα 3.8: Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	45
Εικόνα 3.9: Φυγόκεντρος Digicen 20, Ιξωδόμετρο Brookfield, Μικροσκόπιο	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1: Πειραματικό πλάνο υδρόλυσης σε όξινο περιβάλλον	34
Πίνακας 3.2: Τιμές των σταθερών που χρησιμοποιούνται στην ιξωδομετρία.....	36
Πίνακας 3.3: Ονομασίες εκφράσεων ιξώδους.....	37
Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα ιξωδομετρίας των δειγμάτων PLA	53
Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ακραιών Ομάδων	54
Πίνακας 4.3: Πειραματικά αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης.....	55
Πίνακας 4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης TGA.....	56
Πίνακας 4.5: Πειράματα σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων.....	57
Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος των κενών νανοσωματιδίων.	57
Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα DLS για το Z-δυναμικό των κενών νανοσωματιδίων	58
Πίνακας 4.8: Συνθήκες εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε μεγάλη κλίμακα	59
Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα DLS για το πείραμα NP_1.....	59
Πίνακας 4.10: Συνθήκες εγκλεισμού της HT (NP_2)	60
Πίνακας 4.11: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το πείραμα NP_2.....	60
Πίνακας 4.12: Συγκριτικός πίνακας των ποσοτήτων των δύο πειραμάτων εγκλεισμού.....	60
Πίνακας 4.13: Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS για τα δύο πειράματα εγκλεισμού	61
Πίνακας 4.14: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τη σταθερότητα του μεγέθους των νανοσωματιδίων	62
Πίνακας 4.15: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στα 277nm	63
Πίνακας 4.16: Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis.....	64
Πίνακας 4.17: Απόδοση εγκλεισμού.....	64
Πίνακας 4.18: Αρχικά χαρακτηριστικά της κρέμας.....	65
Πίνακας 4.19: Αποτελέσματα Κύκλου ψύξης-απόψυξης 5-45°C για την κρέμα χωρίς την προσθήκη NP's (FTC_BC)	66
Πίνακας 4.20: Αποτελέσματα Κύκλου ψύξης-απόψυξης 5-45°C για την κρέμα μετά την προσθήκη NP's (FTC_BCA).....	66
Πίνακας 4.21: Συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων σε κλιβάνους στο σκοτάδι	67
Πίνακας 4.22: Αποτελέσματα ελέγχου σταθερότητας των δειγμάτων BC_25 και BCA_25 στους 25 °C	67
Πίνακας 4.23: Αποτελέσματα ελέγχου σταθερότητας των δειγμάτων BC_40 και BCA_40 στους 40 °C	68
Πίνακας 4.24: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων για τα δείγματα BC_5 και BCA_5, μετά τον τρίτο μήνα στους 5 °C.....	68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1: Παράδειγμα καμπύλης DSC πολυγαλακτικού οξέος	39
Διάγραμμα 3.2: Παράδειγμα Θερμογραφήματος TGA	42
Διάγραμμα 4.1: Φάσμα ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (2)	49
Διάγραμμα 4.2: Φάσμα ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (2)	50
Διάγραμμα 4.3: : Φάσμα ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) της υδροξυτυροσόλης (3)	51
Διάγραμμα 4.4: Φάσμα ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) της υδροξυτυροσόλης (3)	52
Διάγραμμα 4.5: Μέσου ιξώδους μοριακό βάρος κατά την υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον στους 60 $^\circ\text{C}$	53
Διάγραμμα 4.6: Σύγκριση καμπυλών τήξης των πολυμερών PLA_2 και PLA_3	55
Διάγραμμα 4.7: Κατανομή μεγέθους του δείγματος Blank_2	58
Διάγραμμα 4.8: Κατανομή του δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Blank_2	58
Διάγραμμα 4.9: Καμπύλη αναφοράς της υδροξυτυροσόλης (HT)	63

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νανοεγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών

Ο εγκλεισμός ενεργών συστατικών, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο, κυρίως στις βιομηχανίες των φαρμάκων και των καλλυντικών. Πρόκειται για μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για να εγκλωβιστούν βιοδραστικά μόρια σε μία πολυμερική μήτρα ή κέλυφος και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο (Tomas Kissel, 2006). Σκοπός του εγκλεισμού είναι να παρέχει προστασία στην εγκλεισμένη δραστική ουσία από οξείδωση, να διαφοροποιήσει κατάλληλα ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η λιποφιλικότητα ή υδροφιλικότητα κ.α. Στη βιομηχανία των τροφίμων, η μέθοδος αυτή βρίσκει, επίσης πολλές εφαρμογές. Τα μικρο/ νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη τη δραστική ουσία χρησιμοποιούνται ως φορείς αρώματος αλλά δρουν και προστατευτικά, εμποδίζοντας για παράδειγμα, την εξάτμιση πτητικών ενώσεων και ανεπιθύμητες αντιδράσεις (Zeller et al., 1999).

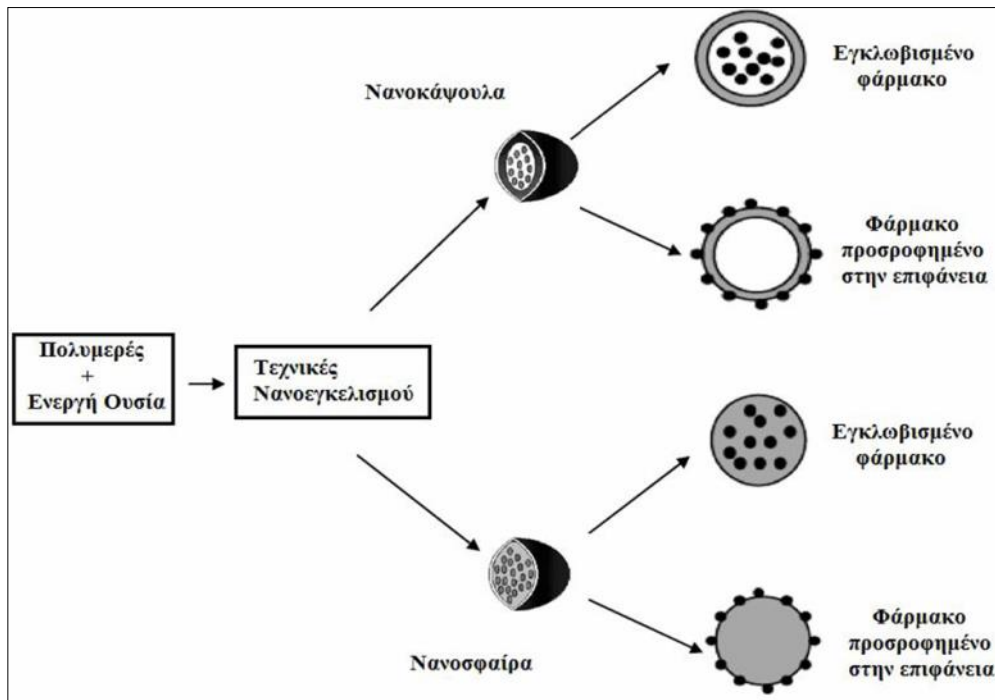
1.1.1 Γενικές έννοιες-Ορισμοί

Νανοτεχνολογία είναι η δημιουργία νέων υλικών, διαδικασιών και συσκευών που βασίζονται στην ελεγχόμενη διάταξη ατόμων/μορίων, με αντικειμενικό σκοπό την χρήση των νέων ιδιοτήτων υλικών με διαστάσεις στην κλίμακα του νανομέτρου.

Ο **νανοεγκλεισμός** είναι η διεργασία κατά την οποία μια ενεργός ουσία είτε επικαλύπτεται από μία πολυμερική μεμβράνη είτε δεσμεύεται σε μία πολυμερική μήτρα. Η ενεργός ουσία που εγκλείεται μπορεί να είναι στερεή, υγρή, ή αέρια ενώ το πολυμερές που χρησιμοποιείται ως μήτρα ή μεμβράνη επιλέγεται με βάση τόσο τις ιδιότητες της ενεργούς ουσίας όσο και την τελική εφαρμογή των νανοσωματιδίων/νανοκαψουλών. Το υλικό αυτό, μπορεί να είναι οργανικό ή ανόργανο πολυμερές, ή ακόμα και κάποιο μέταλλο (Finch, 1990). Με τον εγκλεισμό είναι δυνατό να τροποποιηθούν κάποιες ιδιότητες της δραστικής ουσίας όπως, το χρώμα, η πυκνότητα, και το σχήμα. Η εγκλεισμένη ουσία παραμένει ανέπαφη στο εσωτερικό των νανοσωματιδίων ενώ μπορεί να αποδεσμευθεί όταν αυτό απαιτείται. Τα νανοσφαιρίδια και οι νανοκάψουλες χαρακτηρίζονται από το μέγεθός τους και την κατανομή του μεγέθους, τη γεωμετρία και τη μορφολογία, την ικανότητα

εγκλεισμού, την περιεκτικότητα, την κατανομή των δραστικών ουσιών και το μηχανισμό αποδέσμευσης τους, τη σταθερότητα αποθήκευσης και άλλες παραμέτρους.

Τα νανοσωματίδια που σχηματίζονται είναι νανοσφαιρίδια ή νανοκάψουλες. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορούν να οριστούν οι όροι, **νανοσφαιρίδιο** και **νανοκάψουλα**. Επικρατέστερα, ο όρος νανοκάψουλα χρησιμοποιείται για σχηματισμούς στους οποίους η ενεργός ουσία βρίσκεται εγκλεισμένη σε μορφή πυρήνα που περιβάλλεται πλήρως από το πολυμερές ενώ ο όρος νανοκάψουλα για σχηματισμούς που εμφανίζουν δομή τύπου μήτρας.



Εικόνα 1.1: Δομές βιοαποδομήσιμων νανοσωματιδίων

Τα πολυμερή που επιλέγονται για την παρασκευή νανοσωματιδίων είναι είτε βιοδιασπώμενα είτε μη βιοδιασπώμενα. Στη χορήγηση φαρμάκων, ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι οι πολυεστέρες λόγω της βιοσυμβατότητας και της βιοαποικοδόμησής τους (Abdelwahed et al., 2006).

1.1.2 Σκοπός και εφαρμογές του νανοεγκλεισμού

Ο εγκλεισμός, όπως έχει ήδη αναφερθεί εφαρμόζεται με σκοπό την προστασία των δραστικών ουσιών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τη βελτίωση των ιδιοτήτων της ,προς εγκλεισμό, δραστικής ουσίας αλλά διευκολύνει και τη διαχείριση ευαίσθητων ουσιών και τη φύλαξη τοξικών ουσιών.

Η μέθοδος του εγκλεισμού βρίσκει ήδη εμπορικές εφαρμογές σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας, όπως στις βιομηχανίες των τροφίμων, των καλλυντικών, των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων, των καυσίμων, στις γραφικές τέχνες και στα εκτυπωτικά και φωτογραφικά είδη, με κυρίαρχη όμως εφαρμογή στη βιομηχανία των φαρμάκων.

Αναλυτικότερα οι κύριοι λόγοι για τους οποίους εφαρμόζεται ο εγκλεισμός δραστικών ουσιών είναι οι εξής:

Προστασία βιοδραστικών μορίων: Ευαίσθητες ουσίες, όπως βιταμίνες πρωτεΐνες και υγροσκοπικά υγρά, εγκλωβίζονται με σκοπό να προστατευθούν από αλλοιώσεις που προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ακτινοβολία, η υγρασία, η θερμότητα και το οξυγόνο. Επιπροσθέτως, χημικά ενεργές ουσίες, όταν εγκλωβίζονται, προστατεύονται από χημική προσβολή.

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

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

Ελεγχόμενη αποδέσμευση: Η απόδοση της δραστικής ουσίας στο περιβάλλον ελέγχεται από μηχανισμούς διάχυσης μέσω του υλικού της μήτρας ή της μεμβράνης, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται διάφορα είδη αποδέσμευσης, ανάλογα με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Εφαρμογές με σκοπό την ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας υπάρχουν ήδη. Επιπλέον έχουν μελετηθεί τεχνικές αποδέσμευσης οι οποίες είναι δυνητικά εφαρμόσιμες.

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

1.1.3 Τεχνικές εγκλεισμού σε μικρο/νάνο-σωματίδια

Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών εγκλεισμού δραστικής ουσίας σε μικρο/νάνο-σωματίδια. Επιπλέον οι τεχνικές αυτές συνεχώς τροποποιούνται ή/και αναπτύσσονται νέες τεχνικές με σκοπό να εξασφαλιστεί η επιθυμητή συμπεριφορά του προϊόντος για κάθε εφαρμογή. Οι τεχνικές του εγκλεισμού ταξινομούνται με βάση το μέσο στο οποίο παράγονται τα σωματίδια. Διακρίνονται έτσι, 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.

Στις φυσικοχημικές μεθόδους ανήκουν οι παρακάτω τεχνικές:

Διαχωρισμός φάσεων κολλοειδών συστημάτων: Στη μέθοδο αυτή, ένα κολλοειδές διάλυμα πολυμερούς διαχωρίζεται σε δύο φάσεις υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, της μεταβολής του pH ή της προσθήκης ουσιών και λαμβάνεται υπό μορφή σταγονιδίων, που στη συνέχεια επικάθονται γύρω από τον πυρήνα του ενεργού συστατικού σχηματίζοντας τη μεμβράνη της μικροκάψουλας.

Διεπιφανειακός πολυμερισμός: Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από μία αντίδραση πολυσυμπύκνωσης, που πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια δύο μη αναμίξιμων φάσεων, μεταξύ ενός χλωριδίου οξέος και ενός μονομερούς που περιέχει ενεργά άτομα υδρογόνου. Η ουσία που πρόκειται να εγκλωβιστεί βρίσκεται διεσπαρμένη σε μία από τις δύο φάσεις μαζί με ένα από τα δύο μονομερή. Στη συνέχεια προστίθεται το δεύτερο μονομερές με αποτέλεσμα την παραγωγή μια μεμβράνη πολυμερούς.

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

Εξάτμιση διαλύτη από γαλάκτωμα: Στη μέθοδο αυτή η οργανική φάση που αποτελείται από το πολυμερές και τη δραστική ουσία σε οργανικό διαλύτη διασπείρεται σε μία υδατική φάση που περιέχει κατάλληλο σταθεροποιητή, ενώ στη συνέχεια εξατμίζεται ο οργανικός διαλύτης.

Δικτύωση σε αιώρημα: Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη διάλυση ή τη διασπορά της δραστικής ουσίας σε ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς, το σχηματισμό ενός γαλακτώματος ύδατος/ελαίου, με την προσθήκη του διαλύματος του πολυμερούς σε ένα ελαιώδες διάλυμα που περιέχει σταθεροποιητή και στη συνέχεια τη σκλήρυνση των σταγόνων του πολυμερούς με την προσθήκη του μέσου δικτύωσης.

Δικτύωση με πήξη: Στην τεχνική αυτή η ενεργός ουσία και το πολυμερές διασπείρονται σε μια συνεχή φάση. Οι σταγόνες της διεσπαρμένης φάσης μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια με πήξη.

Λιποσώματα και μέσα μικροεγκλεισμού μοριακής κλίμακας: Τα μέσα εγκλεισμού μοριακής κλίμακας περιλαμβάνουν τα λιποσώματα, πολυμερικά σωματίδια και κυτταρικούς φορείς. Τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν στο εσωτερικό τους μέρος του διαλύτη μέσα στον οποίο αιωρούνται.

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

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

Πολυμερισμός αιωρήματος: Η μέθοδος αυτή είναι παρόμοια με τον πολυμερισμό γαλακτώματος με διαφορά ότι ο εκκινητής προστίθεται στο μίγμα των μονομερών,

χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα σταθεροποιητή και τα τελικά σωματίδια είναι μεγαλύτερα.

Στις φυσικομηχανικές μεθόδους ανήκουν οι παρακάτω τεχνικές:

Ξήρανση με εκνέφωση: Στην τεχνική αυτή ένα αιώρημα της ενεργούς ουσίας και του πολυμερούς διέρχεται μέσω ειδικού ακροφυσίου και ρεύματος θερμού αέρα με αποτέλεσμα την εξάτμιση του διαλύτη.

Πήξη με εκνέφωση: Η τεχνική αυτή είναι παρόμοια με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι η ενεργός ουσία διασπείρεται σε τήγμα του πολυμερούς και όχι σε διάλυμά του.

Μέθοδος ρευστοστερεάς κλίσης: Η τεχνική αυτή είναι μια τεχνική επικάλυψης των στερεών σωματιδίων με υδατοδιαλυτά πολυμερικά υλικά. Αποτελείται από ένα τμήμα ψεκασμού, όπου το πολυμερές που ψεκάζεται καλύπτει τα σωματίδια και ένα τμήμα εκτόνωσης, όπου τελικά τα σωματίδια επιβραδύνονται και υπό την επίδραση της βαρύτητας αρχίζουν να κινούνται προς τα κάτω.

Ηλεκτροστατικός μικροεγκλεισμός: Στην τεχνική αυτή το πολυμερές και η δραστική ουσία ψεκάζονται σε κοινό θάλαμο και φορτίζονται με αντίθετα φορτία. Χάρη στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται σχηματίζονται τα επιθυμητά σωματίδια.

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

Φυγοκεντρική εκβολή: Η μέθοδος αυτή γίνεται με τη χρήση μιας συσκευής, η οποία περιλαμβάνει έκκεντρα ακροφύσια από τα οποία εκβάλλονται ταυτόχρονα η δραστική ουσία και το πολυμερές, το οποίο στη συνέχεια περιβάλλει τη δραστική ουσία.

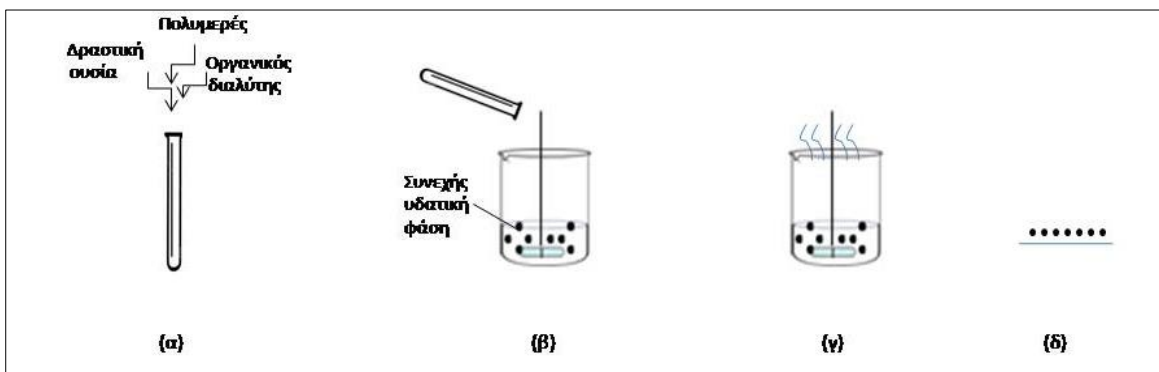
Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, αποτελεί το πρώτο αλλά και ένα πολύ σημαντικό βήμα για εφαρμογή της τεχνικής του μικρο/νάνο-εγκλεισμού. Τα κριτήρια για την επιλογή της μεθόδου είναι το είδος της προς εγκλεισμό ουσίας, η τελική εφαρμογή των σχηματιζόμενων σωματιδίων και τα χαρακτηριστικά που τους αποδίδει η κάθε μέθοδος (Pinto Reis et al., 2006).

1.1.4 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη

Η μέθοδος αυτή εμφανίζει δύο παραλλαγές ανάλογα με την ουσία που πρόκειται να εγκλωβιστεί.

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

Η τεχνική του απλού γαλακτώματος, χρησιμοποιείται για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων ουσιών. Το υλικό επικάλυψης των νανοσωματιδίων, συνήθως πολυμερές, διαλύεται σε πτητικό οργανικό διαλύτη, μη αναμίξιμο με το νερό. Η ουσία που πρόκειται να εγκλωβιστεί διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, και το διάλυμα αυτό ενώνεται με το διάλυμα του πολυμερούς. Η οργανική αυτή φάση γαλακτωματοποιείται μέσα σε μία υδατική φάση που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μιας επιφανειοδραστικής ουσίας (χολικό νάτριο ή πολυβυνιλική αλκοόλη). Στη συνέχεια ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται υπό ήπιες συνθήκες (ελαφριά θέρμανση, εφαρμογή κενού). Με την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη, προκύπτει η σκλήρυνση του περιβλήματος. Τα μικρο/νάνο-σωματίδια που σχηματίζονται συλλέγονται με διήθηση ή φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια επαναδιασπείρονται σε απιονισμένο νερό και λυοφιλοποιούνται (O'Donnell P. et al., 1997).



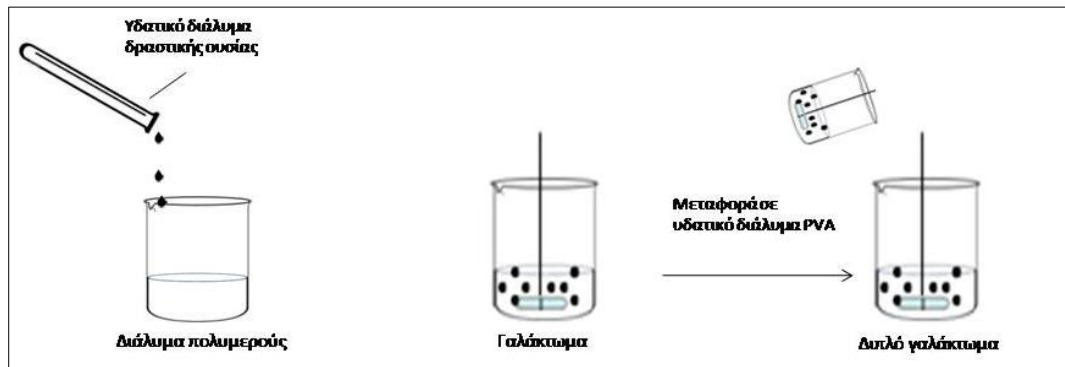
Εικόνα 1.2: Σχηματική περιγραφή της τεχνικής απλού γαλακτώματος

Τα πρώτα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με αυτή την τεχνική ήταν νανοσωματίδια πολύ-γαλακτικού οξέος στα οποία είχε εγκλωβιστεί τεστοστερόνη. Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε roloxamer 188 και το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων ήταν 450 nm (Gurny, 1981).

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

Η τεχνική του διπλού γαλακτώματος, χρησιμοποιείται όταν η, προς εγκλωβισμό ουσία, είναι υδρόφιλη. Αρχικά η δραστική ουσία διαλύεται σε μια υδατική φάση. Η υδατική αυτή φάση,

γαλακτωματοποιείται μέσα σε πτητική οργανική φάση, μέσα στην οποία βρίσκεται διαλυμένο το πολυμερές. Το γαλάκτωμα που σχηματίζεται, διασπείρεται σε μια δεύτερη υδατική φάση με αποτέλεσμα το σχηματισμό του διπλού γαλακτώματος. Στη συνέχεια, η διαδικασία είναι όμοια με την τεχνική του απλού γαλακτώματος, ακολουθεί δηλαδή η ανάκτηση των σωματιδίων και η λυοφιλοποίηση τους.



Εικόνα 1.3: Σχηματική περιγραφή της μεθόδου διπλού γαλακτώματος

Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη, για την παρασκευή νανοσωματιδίων από πολυγαλακτικό οξύ (PLA) αλλά και από το συμπολυμερές του PLGA έχει μελετηθεί αρκετά, λόγω της βιοσυμβατότητας των πολυμερών αυτών (Chien et al., 1985, O'Donnell P., et al., 1997). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για το σχηματισμό νανοσωματιδίων από PLA και PLGA, στα οποία είχαν εγκλωβιστεί ουσίες με διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες (Sanders et al., 1984, Jalil, 1990).

1.1.4.1 Παράμετροι της διεργασίας

Έχουν μελετηθεί αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται με την τεχνική της γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη. Παρά, τα εκτεταμένα συμπεράσματα που προκύπτουν από πολλές μελέτες, η επίδραση των παραγόντων δεν είναι απόλυτη. Δεν υπάρχει κάποιος κανόνας, στον οποίο υπακούουν όλα τα υλικά. Σε κάθε εφαρμογή, το κατάλληλο σύστημα νανοεγκλεισμού προσδιορίζεται με δοκιμή και σφάλμα (Kumari, 2010).

Παρακάτω, παρατίθενται, όπως έχουν προκύψει από τη βιβλιογραφία ορισμένοι παράγοντες και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια, με εφαρμογή της τεχνικής του απλού γαλακτώματος.

Η ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας, ο ρυθμός εξάτμισης του διαλύτη, ο τύπος του διαλύτη και το μοριακό βάρος του πολυμερούς, επιδρούν στα φυσικοχημικά

χαρακτηριστικά των σωματιδίων, στην αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού και στην απελευθέρωση των αδιάλυτων ουσιών από το νανοσωματίδιο (Bodmeier et al., 1989, Uchida et al., 1995, Sato et al., 1985). Σε άλλη μελέτη, αναφέρεται η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης, της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής ουσίας, του όγκου της οργανικής φάσης, και της φόρτωσης της ουσίας, στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, στην περιεκτικότητα της ουσίας στα νανοσωματίδια αλλά και στην αποδέσμευσή της από αυτά. Συγκεκριμένα, με αύξηση των παραπάνω παραμέτρων παρατηρείται μείωση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων. Σχετικά με το ρυθμό αποδέσμευσης, έχει παρατηρηθεί ότι στα μικρότερου μεγέθους σωματίδια η δραστική ουσία απελευθερώνεται με μεγαλύτερο ρυθμό (Sansdrap et al., 1993). Ο τύπος του διαλύτη, στον οποίο διαλύεται το πολυμερές, και το πως αυτός διαχέεται στην υδατική φάση, επηρεάζει τη διεργασία (Bodmeier and McGinity, 1988). Η φόρτωση της ουσίας στα νανοσωματίδια, βρέθηκε ότι ενισχύεται με την προσθήκη, αναμίξιμων με το νερό, οργανικών διαλυτών, στην οργανική φάση του συστήματος. Επιπλέον, αναφέρεται ότι ο εγκλεισμός της δραστικής ουσίας στο πολυμερές παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση και η επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι πιο λεία, όταν ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, σε σχέση με περιπτώσεις που ο διαλύτης εξατμίζεται σε ατμοσφαιρικές συνθήκες. Ο ρυθμός αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας αυξάνεται με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης της ουσίας. Στην περίπτωση της εξάτμισης του διαλύτη σε ατμοσφαιρικές συνθήκες η αύξηση του ρυθμού αποδέσμευσης είναι μικρότερη, συγκριτικά με την περίπτωση εξάτμισης του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση (Izumikawa et al., 1993).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, οι μεταβλητές της μεθόδου του εγκλεισμού δραστικής ουσίας σε πολυμερικά σωματίδια με την τεχνική του απλού γαλακτώματος είναι οι εξής:

1. Ρυθμός και τρόπος εξάτμισης του διαλύτη
2. Υλικά (πολυμερές, επιφανειοδραστική ουσία, ουσία προς εγκλεισμό κ.α.)
3. Συνθήκες της διεργασίας (ρυθμός ανάδευσης, θερμοκρασία κ.α.)
4. Ποσότητες/Αναλογίες(όγκος οργανικής φάσης, συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας, ποσοστό φόρτωσης κ.α.)

1.1.5 Ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας

Σκοπός της τεχνολογίας της ελεγχόμενης αποδέσμευσης μιας ουσίας που βρίσκεται εγκλεισμένη σε ένα πολυμερικό, συνήθως, φορέα, είναι αποδέσμευσή της με τρόπο ώστε να μεγιστοποιείται η δράση της, τόσο σε ένταση όσο σε διάρκεια χρόνου. Η αποδέσμευση

της δραστικής ουσίας από τον φορέα που την περιέχει, στηρίζεται πάντα σε κάποιο μηχανισμό διάχυσης.

Ανάλογα με το μηχανισμό λειτουργίας τους, τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης: Σε αυτά τα συστήματα, η δραστική ουσία απελευθερώνεται με συγκεκριμένο ρυθμό. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλο σχεδιασμό του συστήματος, ώστε ο ρυθμός της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας να ελέγχεται από τη διάχυσή της ή από τη διείδυση του διαλύτη, ακολουθώντας τους νόμους του Fick. Τα ελεγχόμενα μέσω διάχυσης συστήματα χωρίζονται σε συστήματα δεξαμενής (reservoir) και συστήματα πλέγματος (matrix). Στην πρώτη περίπτωση, η δραστική ουσία περιβάλλεται από μια πολυμερική μεμβράνη. Εάν η ποσότητα της δραστικής ουσίας στον πυρήνα διατηρείται σε επίπεδα κορεσμού, τότε η μεταφορά της κατά μήκος της μεμβράνης θα είναι συνεχής, αφού και η κινητήριος δύναμη θα παραμένει σταθερή. Όμως ακόμα και όταν τηρούνται όλες οι προϋποθέσεις ώστε η αποδέσμευση να είναι σταθερή, ο ρυθμός της αποδέσμευσης δύσκολα παραμένει σταθερός, στο αρχικό και στο τελικό στάδιο της αποδέσμευσης. Πολλές φορές, είναι δυνατό να παρουσιαστεί ένας χρόνος καθυστέρησης (lag time) ή μια ξαφνική απελευθέρωση σημαντικής ποσότητας της δραστικής ουσίας (burst effect). Στα συστήματα πλέγματος ο ρυθμός αποδέσμευσης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου ως αποτέλεσμα της αύξησης της απόστασης που απαιτείται να διασχίσουν τα μόρια της δραστικής ουσίας από τον πυρήνα προς την επιφάνεια του πλέγματος. Η συγκέντρωση του δραστικού συστατικού που αποδεσμεύεται σε δεδομένο χρόνο είναι συνήθως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου που έχει διανυθεί. Επιπλέον, τα μόρια της εγκλεισμένης ουσίας μπορούν να βρουν διέξοδο μέσω των καναλιών που σχηματίζονται από την διαλυτοποίηση και απομάκρυνση της ποσότητας της δραστικής ουσίας που έχει ήδη αποδεσμευτεί.

Στα παραπάνω συστήματα, οι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητική της αποδέσμευσης είναι οι εξής:

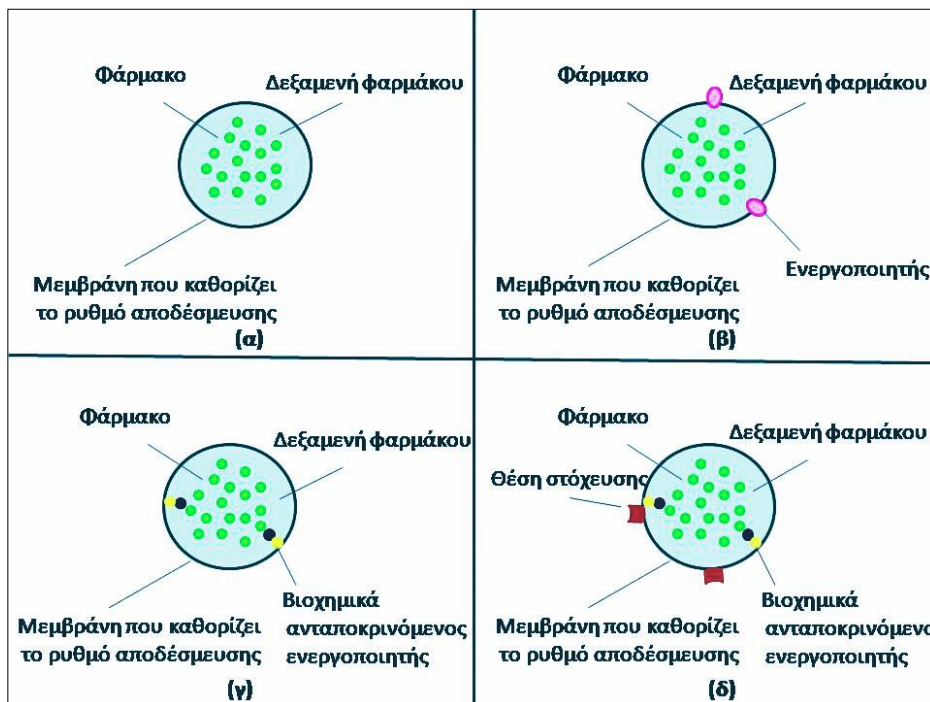
- οι φυσικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας
- ο βαθμός πλήρωσης του συστήματος σε δραστικό συστατικό
- το μέγεθος των σωματιδίων
- η διαλυτότητα της ουσίας στην πολυμερική μήτρα και η ικανότητα διάχυσης σε αυτή
- το σχήμα του πολυμερικού συστήματος

Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης: Τα συστήματα αυτά αποτελούν εξέλιξη των συστημάτων της προηγούμενης κατηγορίας. Η αποδέσμευση του ενεργού συστατικού ενεργοποιείται από κάποιες φυσικές, χημικές ή βιολογικές διαδικασίες ή υποβοηθείται από εξωτερικά παρεχόμενη ενέργεια. Ο ρυθμός της αποδέσμευσης της εγκλεισμένης ουσίας ελέγχεται, ρυθμίζοντας κατάλληλα τη διαδικασία ενεργοποίησης ή την παρεχόμενη ενέργεια.

Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης: Στην κατηγορία αυτή, η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας ρυθμίζεται από ένα βιοχημικά αποκρινόμενο αισθητήρα, ο οποίος ανιχνεύει μια βιοχημική ουσία, που δρα ως ενεργοποιητής για το σύστημα. Ο ρυθμός αποδέσμευσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας. Τα συστήματα αυτά χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- ρυθμιζόμενα συστήματα μέσω βιοδιάσπασης (bioerosion-regulated)
- βιο-αποκρινόμενα (bioresponsive) συστήματα
- αυτό-ρυθμιζόμενα (self-regulated) συστήματα

Συστήματα στόχευσης: Σκοπός των συστημάτων αυτών είναι η εκλεκτική αποστολή της δραστικής ουσίας στη θέση δράσης της. Τα τελευταία χρόνια, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στο σχεδιασμό των συστημάτων στόχευσης, χάρη στη μεγάλη ανάπτυξη στον τομέα της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας.



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση των κατηγοριών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης

1.1.6 Ιδιότητες των Νανοσωματιδίων

1.1.6.1 Μέγεθος (size)

Το επιθυμητό μέγεθος των νανοσωματιδίων, αλλάζει ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. Εξαρτάται δε από το είδος του πολυμερούς και της δραστικής ουσίας, αλλά και από τις παραμέτρους και τις συνθήκες της διεργασίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Θεωρητικά, το μέγεθος των νανόσφαιρων κυμαίνεται από 100 έως 200 nm, ενώ των νανοκαψουλών μεταξύ 100-300 nm (Xiao et al., 2010).

Οι περιορισμοί γύρω από το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι μεγάλοι. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες να νανοσωματίδια δεν πρέπει να υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος, και άλλες, όπου τα νανοσωματίδια δεν επιτρέπεται να είναι μικρότερα από ένα προκαθορισμένο μέγεθος. Για παράδειγμα, σε φαρμακευτικές εφαρμογές όπου τα νανοσωματίδια χορηγούνται ενδοφλέβια, το μέγεθός τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5μm, αλλά και η διάμετρός τους να είναι μικρότερη από 200 nm, ώστε να μην διηθούνται από τον σπλήνα (Moghimi et al., 1991).

Το πολύ μικρό μέγεθος των σωματιδίων, έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια σε σύγκριση με τα μικροσωματίδια, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενδοκυτταρική πρόσληψη. Έχει αποδειχθεί ότι νανοσωματίδια μεγέθους 100nm έχουν 2,5 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη στην κυτταρική μεμβράνη του CaCO₂ σε σχέση με σωματίδια μεγέθους 1 μm και 6 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη συγκριτικά με σωματίδια μεγέθους 10μm (Desai et al., 1997). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν ίδιας σύνθεσης νανοσωματίδια και μικροσωματίδια δοκιμάστηκαν *in situ* σε ποντίκια. Τα νανοσωματίδια (100nm) είχαν περίπου 16 φορές μεγαλύτερη πρόσληψη σε σχέση με τα μικροσωματίδια (1 και 10 μm) (Desai et al., 1997).

1.1.6.2 Ζ-δυναμικό (zeta potential)

Η εμφάνιση φορτίου επιφανείας στα περισσότερα εναιωρήματα σωματιδίων σε υδατικά μέσα οφείλεται στην ύπαρξη φορτισμένων ομάδων στα σωματίδια ή και στην προσρόφηση ιόντων από το μέσο διασποράς. Τα ιόντα, που είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, έλκουν από το διάλυμα θετικά ιόντα δημιουργώντας το ηλεκτροκινητικό ή ζ δυναμικό που αποτελεί την διαφορά δυναμικού μεταξύ της σταθερά δεσμευμένης στοιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων με την ηλεκτρικά ουδέτερη περιοχή του διαλύματος. Στην διάχυτη στοιβάδα το δυναμικό μηδενίζεται. Κατά την κίνηση του σωματιδίου, η διάχυτη στοιβάδα απομακρύνεται και αποκαλύπτει το δυναμικό επιφάνειας, το οποίο και ονομάζεται ζ-δυναμικό (Ney, 1973, Hunter, 1981). Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από

το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων (κυρίως ιονικών επιφανειοδραστικών) και την σύνθεση του μέσου διασποράς. Το ζήτα δυναμικό υπολογίζεται με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου.

Το ζήτα δυναμικό σχετίζεται με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Για σωματίδια τα οποία είναι αρκετά μικρά, ένα υψηλό δυναμικό ζήτα θα προσδώσει σταθερότητα, δηλαδή, το διάλυμα ή διασπορά θα αντιστέκονται στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Όταν το δυναμικό είναι χαμηλό, η έλξη υπερβαίνει την άπωση και η διασπορά θα αρχίσει να εμφανίζει φαινόμενα κροκίδωσης και συσσωματωμάτων. Έτσι, τα συστήματα με υψηλό ζήτα δυναμικό (αρνητικό ή θετικό) είναι ηλεκτρικά σταθεροποιημένα ενώ τα συστήματα με χαμηλό ζήτα δυναμικό τείνουν να πήζουν ή να κροκιδώνονται (Greenwood et al., 1999, Hanaor et al., 2012).

1.1.6.3 Φυσικοχημική Σταθερότητα (stability)

Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το pH της υδατικής διασποράς, τον τύπο του πολυμερούς, τη χημική σταθερότητα της δραστικής ουσίας και τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Abdelwahed et al., 2006). Ο βασικός λόγος ο οποίος εμποδίζει την ευρεία χρήση των πολυμερικών νανοσωματιδίων σχετίζεται με την αστάθειά τους. Όταν υδατικά διαλύματα των πολυμερικών νανοσωματιδίων αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρείται συχνά δημιουργία συσσωματωμάτων (φυσική αστάθεια) ή/και υδρόλυση του πολυμερούς, διαρροή της δραστικής ουσίας (χημική αστάθεια) (Chacon et al., 1999, Auvillain et al., 1989).

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) (Franks, 1998). Η διεργασία αυτή βασίζεται στην απομάκρυνση του νερού από ένα παγωμένο δείγμα μέσω εξάχνωσης και εκρόφησης υπό κενό. Παρόλα αυτά η διεργασία αυτή προκαλεί αρκετές καταπονήσεις στο δείγμα. Γι' αυτό καθίσταται πολλές φορές αναγκαία η προσθήκη συστατικών που θα προστατεύσουν το δείγμα από τις καταπονήσεις αυτές (Abdelwahed et al., 2006).

1.1.7 Χαρακτηρισμός των Νανοσωματιδίων

Η δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering, DLS), είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος για το χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων σε εναιώρημα. Με τη μέθοδο αυτή εκτός από το μέγεθος, προσδιορίζεται η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων και το ζ δυναμικό.

Η μέθοδος αυτή (επίσης γνωστή ως PCS-Photon Correlation Spectroscopy) μετρά την κίνηση Brown και τη συσχετίζει με το μέγεθος των σωματιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται με το φωτισμό των σωματιδίων με ένα λέιζερ και με ανάλυση των διακυμάνσεων της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός. Στην πράξη, τα σωματίδια που αιωρούνται σε ένα υγρό δεν είναι ποτέ στάσιμα. Τα σωματίδια κινούνται συνεχώς λόγω της κίνησης Brown. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της κίνησης Brown είναι ότι τα μικρά σωματίδια κινούνται γρήγορα και μεγάλα σωματίδια κινούνται πιο αργά.

Η μέθοδος παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, κυρίως όσον αφορά τον εύκολο χειρισμό και την ταχύτητα λήψης των αποτελεσμάτων. Επίσης, η μέθοδος δεν είναι καταστροφική. Ωστόσο, η μέτρηση του μεγέθους μπορεί να επηρεαστεί από τη συγκέντρωση του διαλύματος, τη σύνθεση των διαλυτών και τη σκόνη. Επιπλέον, συσσωματώματα μικρότερων σωματιδίων συχνά υπολογίζονται ως ένα μεγάλο σωματίδιο. Προκειμένου λοιπόν, τα αποτελέσματα να είναι έγκυρα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην προετοιμασία του δείγματος. Συγκεκριμένα, πρέπει να μειωθούν οι πιθανότητες να εισχωρήσει σκόνη στο διάλυμα αλλά και να επιτευχθεί ικανοποιητική διασπορά (Yang et al., 2014).

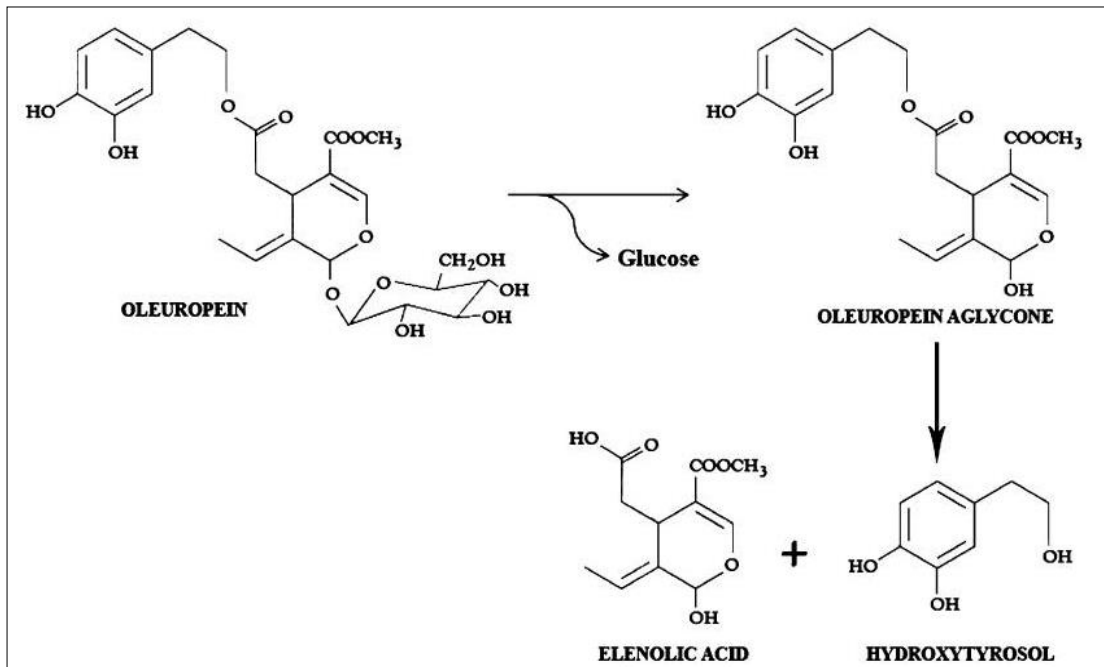
Συχνά, χρησιμοποιείται η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Αποτελεί, αμεσότερη μέθοδο χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων, καθώς επιτρέπει την παρατήρησή τους. Έτσι, εκτός από το μέγεθος, προκύπτουν συμπεράσματα και για την επιφάνεια και το σχήμα των σωματιδίων. Ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων χρησιμοποιείται το μικροσκόπιο φωτός (light microscope), το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM) ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (Transmission Electron Microscope, TEM).

Η μέθοδος αυτή μειονεκτεί στο ότι το δείγμα πρέπει να ξηρανθεί πριν οδηγηθεί για μέτρηση με αποτέλεσμα ορισμένες φορές το δείγμα να αλλοιώνεται. Επιπλέον, το δείγμα μπορεί να καταστεί ασταθές από την επαφή του με τη δέσμη ηλεκτρονίων, οπότε να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα.

1.2 Υδροξυτυροσόλη

1.2.1 Προέλευση της υδροξυτυροσόλης

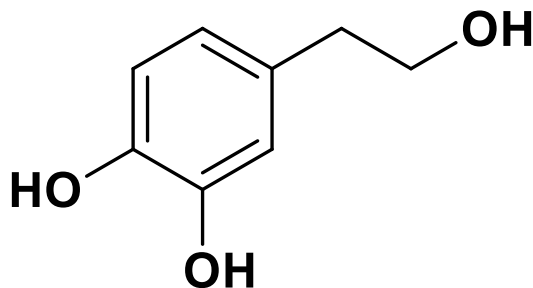
Τα φύλλα της ελιάς, χρησιμοποιούνταν ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική, στις περιοχές της Μεσογείου. Τα βασικά συστατικά των φύλλων της ελιάς είναι σεκοϊριδοειδή, όπως η ελαιοευρωπεΐνη, η λιγοςτροσίδη, η διμέθυλοελαιοευρωπεΐνη και η ολεοσίδη (Gariboldi et al., 1986). Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν ακόμα флаβονοειδή (απιγενίνη, кемπερόλη, λουτεολίνη) καθώς και φαινολικά συστατικά (καφεϊκό οξύ, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη). Η ελαιοευρωπεΐνη, το κυρίαρχο συστατικό του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς, βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στα φύλλα ενώ περιέχεται σε μικρότερη ποσότητα στο ελαιόλαδο και ευθύνεται για την πικρή γεύση και το οξύ άρωμα του (Soler-Rivas et al., 2000). Από την υδρόλυση της γλυκοζυλιωμένης ελαιοευρωπεΐνης προκύπτουν η υδροξυτυροσόλη, το ελενολικό οξύ, γλυκόζη και η μη γλυκοζυλιωμένη ελαιοευρωπεΐνη (Manna et al., 2004).



Εικόνα 1.5: Υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης

1.2.2 Χημική δομή της υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη είναι μια πολυφαινόλη, η οποία όπως αναφέρθηκε συναντάται φυσικά στην ελιά. Η χημική της δομή φαίνεται στην Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6: Η χημική δομή της υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη, είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση, έχει όμως αποδειχθεί η ευρύτερη σημασία της στην ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, έχει εκδηλωθεί ενδιαφέρον για να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στα τρόφιμα και στα καλλυντικά.

1.2.3 Η Υδροξυτυροσόλη ως φυσικό αντιοξειδωτικό

Τα αντιοξειδωτικά έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή χάρη στην ιδιότητά τους να ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες, το οποίο σχετίζεται άμεσα με χρόνιες παθήσεις. Τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου αλλά και κάποιων τύπων καρκίνου, στην περιοχή της Μεσογείου, οδήγησαν στην υπόθεση ότι μια διατροφή πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά, έχει θετική επίδραση στην υγεία.

Το βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, το ελαιόλαδο, από το παρελθόν οφείλει την ευεργετική για την υγεία, δράση του στο ελαϊκό οξύ. Πλέον, όλο και περισσότερες μελέτες συνδέουν τα οφέλη που προκύπτουν από το ελαιόλαδο με ενώσεις περιέχει που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό, οι οποίες αποτελούν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Τα φαινολικά συστατικά χωρίζονται στα φαινολικά οξέα και στις φαινολικές αλκοόλες, στις οποίες ανήκει και η υδροξυτυροσόλη. Εξαιτίας του πολικού χαρακτήρα τους, τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα υπολείμματα των διεργασιών επεξεργασίας του ελαιολάδου. Για το λόγο αυτό τα παραπροϊόντα της παραγωγής του ελαιολάδου αποτελούν σημαντική πηγή υδροξυτυροσόλης.

Η υδροξυτυροσόλη είναι γνωστή κυρίως για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση της, συγκρίσιμη με αυτή των γνωστών συνθετικών αντιοξειδωτικών όπως 2,6-δι-tert-βουτυλο-p-υδροξυτολουόλιο (BHT) και 3-tert-βουτυλο-6-υδροξυανισόλη (BHA) (Chimi et al., 1988).

Για να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ιδιότητα ενός συστατικού, χρησιμοποιούνται συχνά τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη, λόγω του ιδιαίτερου ρόλου τους ως φορείς οξυγόνου. Αν στα ερυθρά αιμοσφαίρια παραχθούν μεγάλες ποσότητες δραστικών ειδών οξυγόνου, όπως H_2O_2 και O_2^- , θα προκληθεί μια κατάσταση οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, πρόσφατα μελετήθηκε η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης και κάποιων μεταβολιτών της, να προστατεύουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από την οξειδωτική βλάβη. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η υδροξυτυροσόλη, συμβάλλει σημαντικά στην προστατευτική δράση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Paiva-Martins et al., 2013). Άλλες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου βοηθούν στη σταθερότητα του προϊόντος και το προστατεύουν από την οξείδωση. Γι' αυτό και αναφέρουν ότι χρειάζεται η προσθήκη φαινολικών συστατικών στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο (Bouaziz et al., 2010).

Αν και οι μελέτες για την τοξικότητα της υδροξυτυροσόλης σπανίζουν, έχει βρεθεί ότι για πρόσληψη κάτω από 2000 mg ανά κιλό σωματικού βάρους την ημέρα δεν έχουν παρατηρηθεί δυσμενείς επιπτώσεις. Συγκεκριμένα, σε πείραμα που διεξήγαγαν οι D' Angelo et al., κατά το οποίο χορήγησαν σε ποντίκια 2 gr υδροξυτυροσόλης ανά κιλό σωματικού βάρους δεν παρατηρήθηκε τοξική δράση αλλά ούτε και κάποιου είδους αλλοίωση των οργάνων.

Μετά από πολλές και διαφορετικές μελέτες είναι πλέον γνωστή η σημασία της υδροξυτυροσόλης στην υγεία. Η υδροξυτυροσόλη εκτός από τις αντιοξειδωτικές τις ιδιότητες για τις οποίες είναι γνωστή, έχει επίσης αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, βοηθά στον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων και στην προστασία από καρδιοαγγειακή νόσο (Granados-Principal et al. 2010). Τέλος μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και αθηροσκλήρωσης (Piersanti et al., 2011).

1.3 Πολυγαλακτικό οξύ

1.3.1 Εισαγωγή

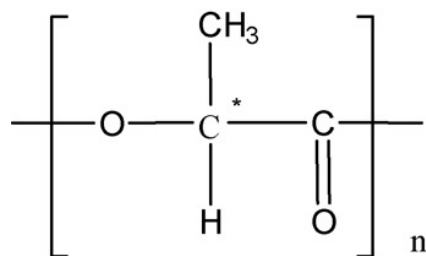
Το πολυγαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια σε εφαρμογές στην οδοντιατρική, στην ορθοπεδική και στη χορήγηση φαρμάκων (Gilding et al.,1979).

Η σημασία των μελετών γύρω από τα βιοδιασπώμενα πολυμερή έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν τα συνθετικά πολυμερικά προϊόντα (Kalb and Pennings, 1979). Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα και χρησιμοποιούμενα πολυμερή, αντικαθιστώντας τα συμβατικά πετροχημικά πολυμερή. Πρόσφατα, έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες πάνω το PLA με σκοπό την επίτευξη χημικών, μηχανικών και βιολογικών ιδιοτήτων, ισοδύναμων ή και καλύτερων από αυτές των συμβατικών πολυμερών (Rasal et al., 2009).

Το πολυγαλακτικό οξύ είναι βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό, ανακυκλώσιμο και κομποστοποιήσιμο υλικό, το οποίο επιπλέον προέρχεται και από ανανεώσιμες πηγές (π.χ. καλαμπόκι, σιτάρι) (Sawyer,2003, Drumright et al.,2000). Επιπλέον, παρέχει περισσότερες δυνατότητες επεξεργασίας, σε σχέση με άλλα πολυμερή (Auras et al., 2004). Η παραγωγή του πολυγαλακτικού οξέος, απαιτεί αρκετά λιγότερη ενέργεια συγκριτικά με την παραγωγή άλλων πολυμερών. Έτσι, λόγω του χαμηλότερου κόστους της παραγωγής του, καθίσταται ανταγωνιστικό (Vink et al., 2003). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα, τα οποία περιορίζουν τη χρήση του σε ορισμένες εφαρμογές, όπως η ανθεκτικότητά του και ο χαμηλός ρυθμός αποικοδόμησής του. Επίσης, είναι χημικά αδρανές και σχετικά υδρόφοβο. Πολλές μελέτες διεξάγονται με στόχο την τροποποίηση του PLA, προκειμένου να αρθούν οι παραπάνω περιορισμοί (Rasal et al., 2009).

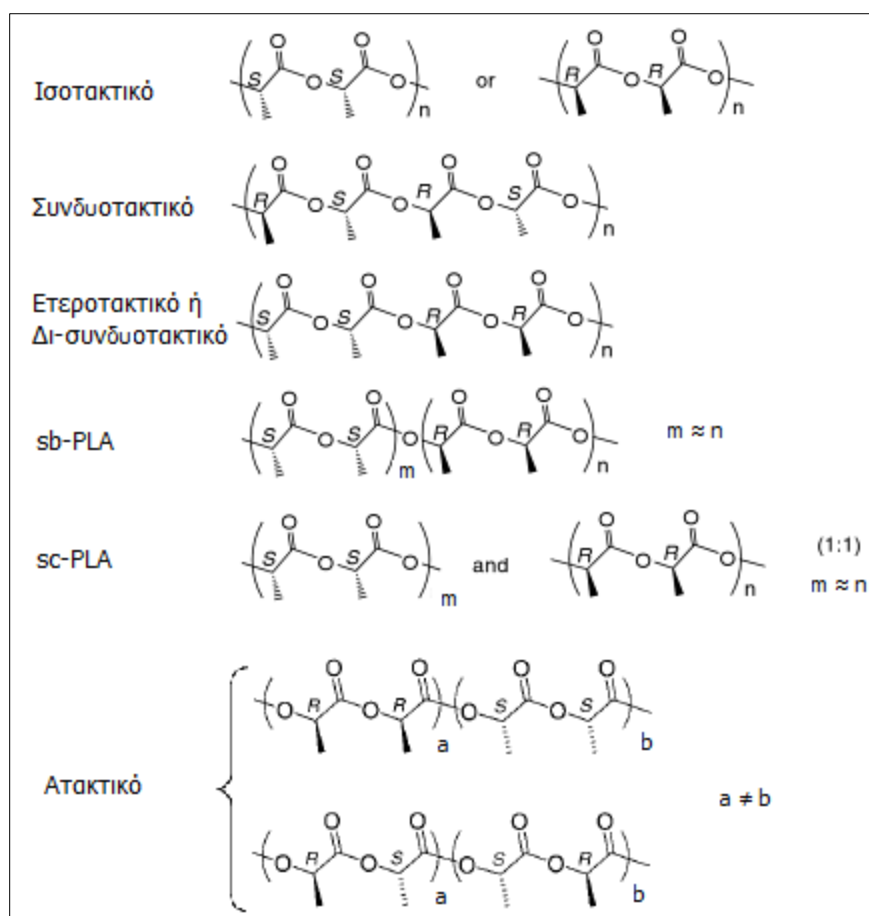
1.3.2 Χημική Δομή και ιδιότητες του PLA

Το πολυγαλακτικό οξύ παράγεται από το γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ, με χημικό τύπο $C_3H_6O_3$, συναντάται σε δύο οπτικά ισομερείς αντίποδες το L- και το D-. Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα του PLA φαίνεται στην Εικόνα 1.7. Είναι και αυτό χειρόμορφο ευρισκόμενο σε δύο οπτικά ισομερείς αντίποδες, το L- και το D- (Maharana et al., 2009).



Εικόνα 1.7: Χημική δομή του PLA

Με βάση τις δομικές του μονάδες μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές στερεο-ισομερείς μορφές, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.8:

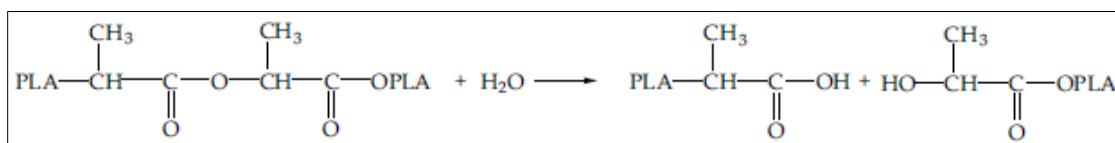


Εικόνα 1.8: Στερεο-ισομερείς δομές του PLA

Η πυκνότητα του PLA είναι περίπου $1,24 \text{ g/cm}^3$, ενώ έχει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) περίπου $58 \text{ }^\circ\text{C}$. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης εξαρτάται από την οπτική καθαρότητα αλλά και από το μοριακό του βάρος. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης αυξάνεται με αύξηση του μοριακού βάρους. Επιπροσθέτως, η T_g εξαρτάται και από τη θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί το πολυμερές (Lim et al., 2008). Η T_g αυξάνεται ραγδαία όταν το μοριακό βάρος του PLA αυξάνεται σε 80-100 kg/mol, όμως στη συνέχεια η τιμή της παραμένει σταθερή (Saeidlou et al., 2012). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) εξαρτάται επίσης από την οπτική καθαρότητα του PLA. Η θερμοκρασία τήξης του πολυγαλακτικού οξέος κυμαίνεται μεταξύ $130\text{-}160 \text{ }^\circ\text{C}$. Το PLA είναι άμορφο ή ημικρυσταλλικό, ανάλογα με τη στερεοχημεία του και με την θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί. Οι μηχανικές του ιδιότητες ποικίλουν και έτσι θεωρείται κάποιες φορές ως μαλακό και ελαστικό πλαστικό και άλλες, ως σκληρό υλικό με υψηλή αντοχή (Lim et al., 2008).

1.3.3 Υδρολυτική διάσπαση του PLA

Το πολυγαλακτικό οξύ, υδρολύεται προς χαμηλότερου μοριακού βάρους ολιγομερή. Η υδρόλυση του PLA, πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στην Εικόνα 1.9, κατά την οποία οι εστερικοί δεσμοί του πολυμερούς διασπώνται παρουσία νερού.



Εικόνα 1.9: Υδρολυτική διάσπαση PLA

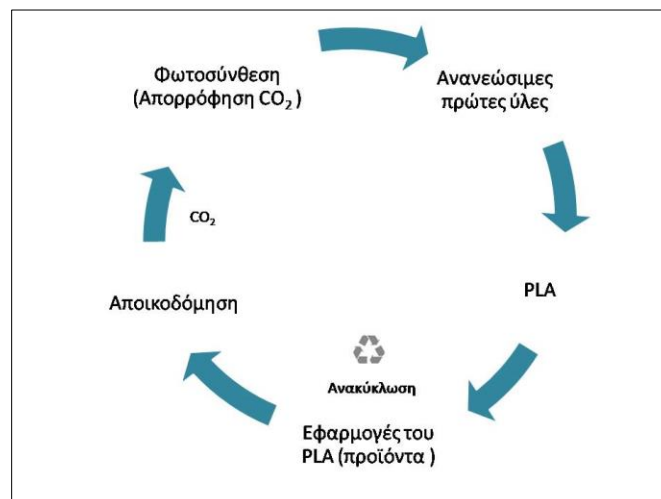
Η υδρόλυση των εστερικών δεσμών καταλύεται από τις ακραίες καρβοξυλομάδες. Αυτό συμβαίνει, διότι οι καρβοξυλομάδες του PLA και των ολιγομερών του έχουν εξαιρετικά χαμηλή τιμή pK_a σε σύγκριση με άλλες καρβοξυλομάδες. Οι δύο μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά την αντίδραση της υδρόλυσης είναι η τυχαία σχάση της μακροαλυσίδας (random scission reaction) και η απόσπαση άκρων της μακροαλυσίδας (chain-end scission). Ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται σημαντικά σε θερμοκρασίες άνω της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (T_g). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι

κρυσταλλικές περιοχές του PLA υδρολύονται πιο αργά σε σύγκριση με τις άμορφες περιοχές (Mohanty et al., 2005).

1.3.4 Κύκλος Ζωής του PLA

Κάθε βιοπλαστικό έχει το δικό του κύκλο ζωής, με διαφορετικές επιπτώσεις στην κοινωνία και το περιβάλλον, και εξαρτάται, για παράδειγμα από τις πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται ή και από τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι πρώτες ύλες έχουν παραχθεί. Μεγάλη σημασία έχουν και οι δυνατότητες χρήσης του πολυμερούς στο τέλος του κύκλου ζωής του. Συγκεκριμένα, τα βιοπλαστικά ολοκληρώνοντας τον κύκλο ζωής τους μπορούν να ανακυκλωθούν, να κομποστοποιηθούν ή να βιοδιασπασθούν. Επιπλέον, μπορούν να επεξεργαστούν με διεργασίες αναερόβιας χώνευσης και να ανακτηθεί μέσω της καύσης τους ενέργεια. Τέλος, είναι εφικτή και η ανάκτηση των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των πλαστικών, με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους σε κάποια άλλη διεργασία.

Ο κύκλος ζωής του PLA, μπορεί να αναπαρασταθεί γραφικά μέσω ενός κλειστού βρόχου. Ο κύκλος αυτός, έρχεται σε συμφωνία με τις περιβαλλοντικές ανάγκες της εποχής, που θέλουν τα προϊόντα να ανακυκλώνονται και να επαναχρησιμοποιούνται όσο το δυνατόν περισσότερο αλλά και στο τέλος του κύκλου ζωής τους να μετατρέπονται σε πρώτες ύλες για την παραγωγή άλλων προϊόντων (www.purac.com).



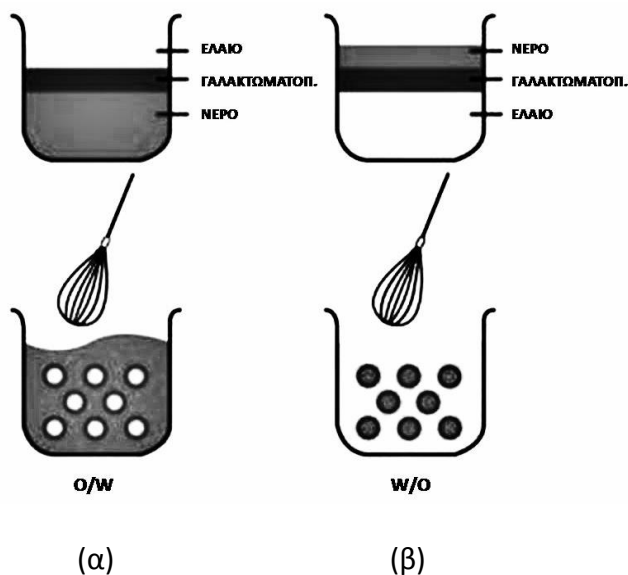
Εικόνα 1.10: Ο κύκλος ζωής του PLA

1.4 Γαλακτώματα-Εφαρμογές στην καλλυντική βιομηχανία

1.4.1 Γαλάκτωμα-Τύποι γαλακτωμάτων

Ως γαλάκτωμα ορίζεται η διασπορά μακροσκοπικών σταγονιδίων ενός υγρού σε ένα άλλο υγρό, με τη διάμετρο των σταγονιδίων να κυμαίνεται συνήθως από 0.5 έως 100 μm (Becher, 1965). Το διεσπαρμένο υγρό ονομάζεται εσωτερική ή ασυνεχής φάση, ενώ το διεσπαρμένο μέσο ως εξωτερική ή συνεχή φάση. Το γαλάκτωμα σταθεροποιείται μέσω ενός γαλακτωματοποιητή. Οι γαλακτωματοποιητές είναι παράγοντες που έχουν μαζί ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα στη χημική τους δομή. Συγκεντρώνονται και απορροφούνται στη διεπιφάνεια ελαίου-ύδατος, μειώνουν τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων των δύο μη αναμίξιμων ρευστών και επιτρέπουν την ανάμιξή τους.

Κρέμα (cream) λέγεται το καλλυντικό προϊόν, που το ιξώδες του έχει τέτοια τιμή, ώστε να μπορεί να ρέει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι κρέμες είναι προϊόντα με μεγάλη συνοχή, απαλή υφή, απλώνονται εύκολα και προορίζονται για εξωτερική χρήση. Συνήθως αποτελούνται από δύο φάσεις, την ελαιώδη ή λιπαρή φάση και την υδατική. Η δραστική ουσία είναι διαλυμένη σε μια ή και στις δύο φάσεις. (Τσιρίβας, 2013).



Εικόνα 1.11: Τύποι γαλακτώματος: (α) λάδι σε νερό-o/w, (β) νερό σε λάδι-w/o

Για την παρασκευή ενός γαλακτώματος πρέπει αρχικά να επιλεγθεί ο τύπος του γαλακτώματος. Ένα γαλάκτωμα είναι τύπου λάδι σε νερό (oil in water, o/w), όταν η υδατική

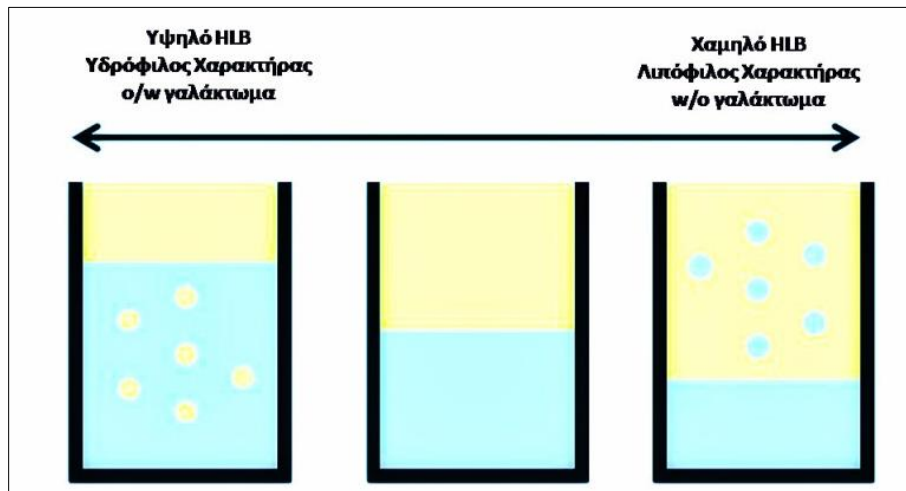
φάση ξεπερνά το 45% του συνολικού βάρους του γαλακτώματος. Αντίθετα, ένα γαλάκτωμα ονομάζεται τύπου νερό σε λάδι (water in oil, w/o), όταν η υδατική φάση αποτελεί λιγότερο από 45% του συνολικού βάρους. Ο τύπος γαλακτώματος ο/w, επιλέγεται κυρίως για τοπικές εφαρμογές υδατοδιαλυτών δραστικών ουσιών, δεν έχει την αναμενόμενη λιπαρή υφή και απομακρύνεται εύκολα από το δέρμα. Οι ενυδατικές κρέμες, που στόχος τους είναι η αποφυγή απομάκρυνσης της υγρασίας από το δέρμα, είναι πιο αποτελεσματικές, όταν έχουν σχηματιστεί από γαλάκτωμα ο/w. Μεγάλη σημασία έχει η επιλογή της λιπαρής φάσης, καθώς έχει σημαντική επίδραση στο ιξώδες της κρέμας αλλά και στη μεταφορά της δραστικής ουσίας στο δέρμα (Barry, 2002). Επισημαίνεται ότι, η λιπαρή και η υδατική φάση ενός γαλακτώματος δεν αποτελούνται μόνο από λάδι και νερό αντίστοιχα. Ως υδατική φάση εννοείται το νερό και όλες οι υδατοδιαλυτές ουσίες, που βρίσκονται διαλυμένες μέσα στο νερό, όπως η γλυκερίνη και η προπυλενογλυκόλη. Ομοίως, η ελαιώδης φάση περιέχει όλες τις λιποδιαλυτές ουσίες, όπως παραφινέλαιο, λανολίνη και βαζελίνη. Εκτός από τα δύο είδη γαλακτωμάτων που αναφέρθηκαν, υπάρχουν και τα διπλά γαλακτώματα τα οποία είναι υγρά συστήματα διασποράς στα οποία τα σταγονίδια μιας διεσπαρμένης φάσης είναι περαιτέρω διεσπαρμένα σε ένα άλλο υγρό. Είναι συνήθως τύπου w/o/w και πιο σπάνια ο/w/o. Στα w/o/w, τα σταγονίδια του λαδιού είναι διεσπαρμένα στο νερό, ενώ περιέχουν και σταγονίδια νερού, ενώ στα ο/w/o τα σταγονίδια νερού είναι διεσπαρμένα στο λάδι, ενώ περιέχουν και σωματίδια λαδιού. Θεωρείται ότι τα διπλά γαλακτώματα προσφέρουν ελεγχόμενη αποδέσμευση των δραστικών συστατικών, αφού τα εσωτερικά σταγονίδια χρησιμεύουν ως αποθήκη των δραστικών ουσιών(Τσιρίβας, 2013).

Η υφή μιας καλλυντικής κρέμας είναι κάτι που εξετάζεται σε βάθος, καθώς αποτελεί ένα από τα βασικότερα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά. Ιδανικά, τα γαλακτώματα θα πρέπει να παρουσιάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες των πλαστικών/ ψευδοπλαστικών και των θιξοτροπικών ρευστών. Για τη ρύθμιση των ρεολογικών ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι.

Μεγάλη προσοχή δίνεται επιπλέον στην επιλογή του γαλακτωματοποιητή, η οποία εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως η τοξικότητα, η ικανότητα γαλακτωματοποίησης και ο τρόπος χορήγησης του γαλακτώματος. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για πολλούς τύπους γαλακτωματοποιητών (Billany, 2002). Ως γαλακτωματοποιητές χρησιμοποιούνται οι επιφανειοδραστικές ουσίες, τα υδρόφιλα και λιπόφιλα κολλοειδή διαλύματα και τα λεπτώς διαμελισμένα στερεά. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες απορροφούνται με μορφή μονομοριακού στρώματος στη διαχωριστική επιφάνεια νερού-λαδιού, με αποτέλεσμα να μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση και την ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια. Τα υδρόφιλα κολλοειδή διαλύματα, σχηματίζουν ένα πολυμοριακό στρώμα, γύρω από τα διεσπαρμένα σταγονίδια σε γαλακτώματα τύπου ο/w. Τέλος, τα

λεπτώς διαμελισμένα σωματίδια στερεών ουσιών, προσροφούνται στην επιφάνεια διαχωρισμού και σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα στερεών σωματιδίων που εμποδίζει τα σταγονίδια να συνενωθούν (Τσιρίβας, 2013).

Καλύτερα και πιο σταθερά γαλακτώματα σχηματίζονται με χρήση περισσότερων από έναν γαλακτωματοποιητές(συν-γαλακτωματοποιητές). Ένα σύστημα που έχει αναπτυχθεί με βάση το οποίο επιλέγεται ο τύπος και η ποσότητα των γαλακτωματοποιητών, ικανών να σχηματίσουν ένα σταθερό γαλάκτωμα ονομάζεται HLB (hydrophile-lipophile balance) και έχει εύρος τιμών 1-20. Αν ένας γαλακτωματοποιητής έχει χαμηλό δείκτη HLB, υπάρχει μικρός αριθμός υδρόφιλων ομάδων στο μόριο, και έτσι θα έχει λιπόφιλο χαρακτήρα. Αντιθέτως, όταν ένας γαλακτωματοποιητής έχει υψηλό δείκτη HLB, τότε υπάρχουν πολλές υδρόφιλες ομάδες στο μόριο, και συνεπώς θα έχει υδρόφιλο χαρακτήρα (Φωτοπούλου, 2007).



Εικόνα 1.12: Ταξινόμηση των γαλακτωμάτων με βάση το δείκτη HLB

1.4.2 Σταθερότητα των καλλυντικών κρεμών-Σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων

Η πλέον σημαντική παράμετρος σε σχέση με τις καλλυντικές κρέμες είναι η σταθερότητα του τελικού προϊόντος. Για να χαρακτηριστεί σταθερό ένα γαλάκτωμα, πρέπει με την πάροδο του χρόνου να μην διαχωρίζονται οι φάσεις του, να διατηρείται το χρώμα, το άρωμα και άλλες φυσικές ιδιότητες. Μια περίπτωση αστάθειας των γαλακτωμάτων είναι η αναστροφή φάσης, η αλλαγή δηλαδή του τύπου του γαλακτώματος από ο/w σε w/o και αντίστροφα (Garti and Aserin, 1996).

Σχετικά με τη χημική αστάθεια ενός προϊόντος, η χημική αντίδραση της δραστικής ουσίας μιας κρέμας, μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της συγκέντρωσής της. Για το λόγο αυτό μειώνεται και η δραστηριότητα της κρέμας, κάτι που αποτελεί αναγνωρισμένη αιτία κακής ποιότητας ενός προϊόντος. Η υποβάθμιση της δραστικής ουσίας μπορεί να κάνει το προϊόν αισθητικά μη αποδεκτό, εφόσον έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές στο χρώμα και την οσμή. Επιπλέον, είναι δυνατόν τα προϊόντα της αντίδρασης να είναι τοξικά. Κατά τη χημική αποδόμηση της δραστικής ουσίας, ανάλογα με τη χημική δομή της ουσίας, μπορεί να πραγματοποιηθεί υδρόλυση, αφυδάτωση, ισομερισμός, οξείδωση, φωτοαποικοδόμηση. Τα διάφορα μονοπάτια της χημικής αποδόμησης της δραστικής ουσίας, εξαρτώνται από τη χημική δομή του μορίου. Η χημική σταθερότητα καθορίζεται από εγγενείς παράγοντες, όπως η μοριακή δομή της δραστικής ουσίας, αλλά και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία κ.α.. Επιπλέον, η χημική σταθερότητα ενός συστατικού του γαλακτώματος μπορεί να είναι διαφορετική όταν το συστατικό αυτό ενσωματωθεί σε άλλο γαλάκτωμα (Sheraz, 2009).

Πολλές βάσεις για κρέμα περιέχουν, μαζί με την υδατική και τη λιπαρή φάση, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Οι βάσεις αυτές είναι ευπαθείς σε μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες. Η μικροβιακή ανάπτυξη αποτελεί σημαντικό κίνδυνο εμφάνισης τοξικής δράσης και καταστρέφει ουσιαστικά την κρέμα. Στις κρέμες αυτές επιβάλλεται η προσθήκη κατάλληλων συντηρητικών, που εμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και διατηρούν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Επιπροσθέτως, κάποιες κρέμες είναι πιθανό να περιέχουν λιπαρά και έλαια, ευπαθή στην οξείδωση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η προσθήκη αντιοξειδωτικών καθυστερεί την οξείδωση και ελαχιστοποιεί αλλαγές στο χρώμα και στην υφή του γαλακτώματος (Barry, 2002).

Υπάρχουν κάποιοι μηχανισμοί με βάση τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί η σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων. Με χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών, μειώνεται η

επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια των δύο φάσεων και μειώνεται η ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια.

Ένας άλλος μηχανισμός με βάση των οποίου μπορεί να σταθεροποιηθεί ένα γαλακτώμα είναι η αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης και μείωση της κινητικότητας των σωματιδίων της εξωτερικής φάσης. Η αύξηση του ιξώδους πραγματοποιείται με χρήση πηκτοματοποιητών, που μπορεί να είναι υδρόφιλα ή λιπόφιλα κολλοειδή ή συνθετικά πολυμερή.

Επιπλέον, με χρήση ειδικών συσκευών, που ονομάζονται ομογενοποιητές, πραγματοποιείται ομοιόμορφη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, με συνέπεια να μειώνεται και η πιθανότητα προσκόλλησης μεταξύ τους.

Τέλος, με τη χρήση των γαλακτωματοποιητών, δημιουργείται ένα στρώμα που περιβάλλει τα διεσπαρμένα σταγονίδια ώστε να μειώνεται η άμεση επαφή μεταξύ τους. Έτσι μειώνεται ο κίνδυνος συνένωσης των σταγονιδίων (Τσιρίβας, 2013).

1.4.3 Έλεγχος Σταθερότητας Γαλακτώματος

Στις βιομηχανίες καλλυντικών δεν επιβάλλεται κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο από τη νομοθεσία για τον έλεγχο σταθερότητας των προϊόντων. Έτσι, η κάθε εταιρεία, μετά από έρευνα και λαμβάνοντας υπόψη της συνδυαστικά βιβλιογραφικά δεδομένα, σχεδιάζει το δικό της πρωτόκολλο, το οποίο ακολουθεί κατά τον έλεγχο σταθερότητας των καινούριων προϊόντων που αναπτύσσει αλλά και εκείνων που κυκλοφορούν ήδη στην αγορά.

Η εκτίμηση της φυσικής σταθερότητας πραγματοποιείται μέσω της εξέτασης της υφής, της εμφάνισης, όπως επίσης και ορισμένων ακόμη χαρακτηριστικών του γαλακτώματος μετά από την πάροδο ενός χρονικού διαστήματος από την παρασκευή του. Είναι σημαντικό να ελεγχθεί κατά πόσο οι φάσεις του συστήματος παραμένουν αναμιγμένες και δεν έχει αρχίσει ο διαχωρισμός τους. Σε αυτούς τους ελέγχους είναι αρκετά χρήσιμη η σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών προϊόντων.

Επίσης, χρησιμοποιούνται συχνά η εξέταση του δείγματος στο μικροσκόπιο και ηλεκτρονικές συσκευές μέτρησης των σωματιδίων, για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων του γαλακτώματος. Αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων, ειδικά με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού τους, υποδηλώνει συσσωμάτωση.

Μεγάλη σημασία για τον έλεγχο σταθερότητας έχει η τιμή του ιξώδους της κρέμας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ιξώδες είναι πολλοί. Μεταβολή στην τιμή του φαινομένου ιξώδους μπορεί να οφείλεται σε μεταβολή του μεγέθους ή του αριθμού των σωματιδίων ή σε εξαφάνιση του γαλακτωματοποιητή μετά από την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος.

Για πιο ασφαλή αποτελέσματα, πραγματοποιούνται μετρήσεις σε προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί επιταχυνόμενη γήρανση, καθώς αποθηκεύονται για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα σε υψηλές θερμοκρασίες.

Σύμφωνα με τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA), οι καλλυντικές κρέμες πρέπει να αξιολογούνται ως προς την εμφάνιση, το χρώμα, τη διαύγεια, την ομοιογένεια, την οσμή, το pH, το ιξώδες, τη συνεκτικότητα, την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, τη χημική σταθερότητα, τα προϊόντα της αποδόμησης, τα συντηρητικά και τα αντιοξειδωτικά (όπου υπάρχουν), την επάρκεια ως προς τη μικροβιολογική του συντήρηση και την απώλεια βάρους. Επιπλέον, κρατούνται δείγματα από παρτίδες παραγωγής τα οποία είναι αποδεκτά, για να υποβληθούν σε ελέγχους σε περίπτωση που ένα προϊόν παρουσιάσει πρόβλημα αργότερα. Τα δείγματα που έχουν κρατηθεί ελέγχονται παράλληλα με τον έλεγχο των προϊόντων που επιστρέφονται προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το πρόβλημα οφείλεται στην παρασκευή ή στην αποθήκευση. Για προϊόντα που είναι συσκευασμένα σε σωληνάρια παρέχονται οι ενδεδειγμένες πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα και το χρόνο ζωής, αφού το προϊόν έχει ανοιχθεί και έχει έρθει σε επαφή με το καπάκι. Επίσης, πραγματοποιούνται έλεγχοι συμβατότητας του προϊόντος με τον τελικό περιέκτη προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει πιθανή αλληλεπίδραση με το υλικό συσκευασίας.

Σκοπός του ελέγχου σταθερότητας είναι να προσδιορίσει εάν το προϊόν έχει επαρκή χρόνο ζωής κατά την αποθήκευσή του στα ράφια των καταστημάτων και κατά τη χρήση του από τους καταναλωτές (Sheraz, 2009).

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία συστατικών που βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, στο τσάι, στο ελαιόλαδο και παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση. Ένα από τα πιο δραστικά συστατικά της κατηγορίας αυτής είναι η υδροξυτυροσόλη, που μπορεί να απομονωθεί από τον καρπό και τα φύλλα της ελιάς. Η αντιοξειδωτική της δράση αποτελεί την πλέον μελετημένη ιδιότητά της και έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο δραστική ακόμα και από αντιοξειδωτικές βιταμίνες αλλά και συνθετικά αντιοξειδωτικά (Rietjens et al., 2007).

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία των καλλυντικών, τόσο με στόχο την αντιγήρανση του δέρματος, όσο και τη συντήρηση του ίδιου του προϊόντος. Η υδροξυτυροσόλη, είναι ένα από τα αντιοξειδωτικά που βρίσκουν ήδη εφαρμογές στην κοσμετολογία (Lueder, 2011). Όπως όλα τα αντιοξειδωτικά έτσι και η υδροξυτυροσόλη έχει μεγάλη ευαισθησία στο φως και τη θερμοκρασία, παρουσιάζοντας έτσι περιορισμένη σταθερότητα (Paiva-Martins et al., 2002, Attya et al., 2010).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυμερούς, ώστε να προστατευθεί και να βελτιωθεί η σταθερότητά της, διατηρώντας όμως τη δράση και τις ιδιότητες όταν αποδεσμεύεται. Στόχος είναι η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη σε καλλυντική κρέμα και ο έλεγχος της σταθερότητας του τελικού προϊόντος.

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Όργανα και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

- Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) Varian Gemini 2000 (300MHz)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotary Evaporator
- Αντλία υψηλού κενού Edwards
- Συσκευή ποτενσιομετρικής τιτλοδότησης 716 DMS Titrino
- Mettler Toledo DSC/TGA 1 STAR^e System
- Φυγόκεντρος High Speed Refrigerated Centrifuge ALC 4239R
- Φυγόκεντρος Beckman J2-21
- Συσκευή Temperature Controlled Shaker (Gallenkamp)
- Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP
- Φασματογράφος ορατού υπεριώδους UV-Vis διπλής δέσμης, Perkin Elmer LAMBDA 25
- Φυγόκεντρος Digicen 20, Orto alresa

3.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Πολυγαλακτικό οξύ (PLA) ,με εμπορική ονομασία PLI005, της εταιρείας Natureplast.
- Πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), της εταιρείας Alsa Aesar, υψηλού μοριακού βάρους, υδρολυμένη κατά 87–89%.
- 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ, της εταιρείας Fluka.

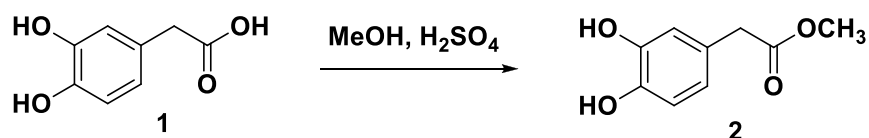
Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας εμπορικά διαθέσιμα.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Σύνθεση της υδροξυτυροσόλης (3)

Η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιήθηκε μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων οι οποίες αναλύονται στη συνέχεια.

A. Μεθυλεστέρας του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (2)



Εικόνα 3.1: Αντίδραση εστεροποίησης

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται 0.5 g (3 mmol) 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος, 0.5 mL πυκνού H₂SO₄ και 17.5 mL μεθανόλης. Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες, στη θερμοκρασία βρασμού του διαλύτη (78°C).

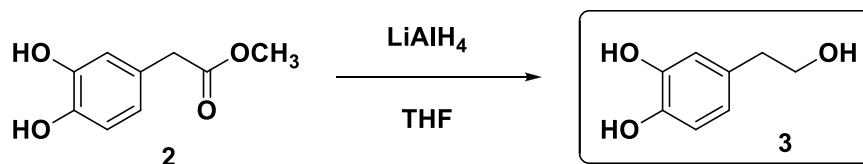
Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα προκειμένου να εξατμιστεί η μεθανόλη που έχει παραμείνει. Στο υπόλειμμα, προστίθενται 17.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και το διάλυμα εκχυλίζεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν λαμβάνεται σε ελαιώδη μορφή με ανοιχτό καφέ χρώμα και οδηγείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

Απόδοση: 377mg (67 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.75-6.59 (m, 3H, αρωματικά H), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.48 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 40.34, 52.37, 115.51, 116.424, 121.577, 125.963, 143.243, 143.994, 173.863

B. Υδροξυτυροσώλη (3)



Εικόνα 3.2: Αντίδραση αναγωγής

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL διαλύονται 0,377g του εστέρα **2** σε 24 mL άνυδρου THF και κατόπιν προστίθενται 0,16 g υδριδίου λιθίου-αργιλίου (LiAlH_4). Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, προστίθενται 9 mL υδατικού διαλύματος 5% HCl και πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με 6 mL EtOAc , η κάθε εκχύλιση. Το διάλυμα τοποθετείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το τελικό προϊόν είναι υψηλής καθαρότητας, όπως πιστοποιείται από τη φασματοσκοπία NMR και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

Απόδοση : 350 mg (75 %)

^1H , NMR, (300 MHz, CD_3OD) δ 6.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 145.77, 144.25, 131.61, 121.18, 116.95, 116.22, 64.39, 39.31

3.3.2 Υδρολυτική διάσπαση του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και προσδιορισμός των ιδιοτήτων του

3.3.2.1 Υδρολυτική διάσπαση

Το πολυμερές υπόκειται σε υδρολυτική διάσπαση με σκοπό την παραλαβή μικρότερου μοριακού βάρους PLA.

Συγκεκριμένα, 50g εμπορικού πολύ-γαλακτικού οξέος τοποθετούνται σε ξηραντήρα μαζί με 900 mL απιονισμένο νερό ενώ προστίθενται σταγόνες οξικού οξέος μέχρις ότου επιτευχθεί όξινο περιβάλλον ($\text{pH}=3$). Ο ξηραντήρας αφήνεται σε φούρνο στους 60°C , και το υλικό υποβάλλεται σε στερεάς κατάστασης υδρολυτική αποικοδόμηση. Μετά από μία ημέρα παραλαμβάνονται 15g πολυμερούς από τον ξηραντήρα(δείγμα PLA_1), το υλικό διηθείται και στη συνέχεια εκπλένεται με 150 mL απιονισμένο νερό. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται 7

φορές και το υλικό αφήνεται σε φούρνο στους 60°C για 24 ώρες. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά από 2 και 3 ημέρες, για τα δείγματα PLA_2 και PLA_3 αντίστοιχα. Τα τρία δείγματα PLA διαφορετικού μοριακού βάρους φυλάσσονται σε ξηραντήρα, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό της υδροξυτυροσόλης.

Πίνακας 3.1: Πειραματικό πλάνο υδρόλυσης σε όξινο περιβάλλον

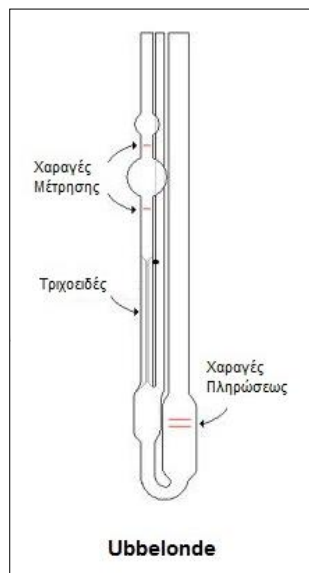
Δείγμα	Διάρκεια Υδρόλυσης
PLA_1	1 ημέρα
PLA_2	2 ημέρες
PLA_3	3 ημέρες

3.3.2.2 Προσδιορισμός μέσου-ιξώδους μοριακού βάρους του πολυμερούς

Το μοριακό βάρος του πολυγαλακτικού οξέος, στην παρούσα εργασία προσδιορίζεται με μετρήσεις ιξωδομετρίας.

Στη συγκεκριμένη εργασία, για τις μετρήσεις ιξωδομετρίας χρησιμοποιείται ιξωδόμετρο τριχοειδούς μορφής τύπου Ubbelonde σταθεράς $K= 0.002807 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$.

Αρχικά ζυγίζονται 0.05 g ξηραμένου δείγματος PLA, τα οποία διαλύονται σε 25 mL χλωροφορμίου (CHCl_3) σε κωνική φιάλη, για την παρασκευή διαλύματος 0.2% κ/β διαλύτη. Η κωνική φιάλη αφήνεται για ανάδευση για τουλάχιστον τρεις ώρες μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές. Στη συνέχεια το προς μέτρηση διάλυμα εισάγεται στο ιξωδόμετρο και με αναρρόφηση η στάθμη του υγρού φτάνει σε σημείο πάνω από την άνω χαραγή του ιξωδομέτρου το οποίο βρίσκεται σε λουτρό θερμοκρασίας 30°C. Μετρείται ο χρόνος εκροής του διαλύματος ανάμεσα στις δύο χαραγές του ιξωδομέτρου. Για κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις, η απόκλιση μεταξύ των οποίων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2%. Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων. Για λόγους αξιοπιστίας, από κάθε δείγμα προς μέτρηση παρασκευάζονται και μετρούνται δύο διαλύματα. Τέλος, επισημαίνεται ότι πριν από κάθε μέτρηση είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του ιξωδομέτρου ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα από προηγούμενες μετρήσεις ή ακαθαρσίες, όπως σκόνη.



Εικόνα 3.3: Ιξωδόμετρο τύπου Ubbelonde

Το απόλυτο ιξώδες συσχετίζεται με το χρόνο εκροής του υγρού και με τις διατάσεις του ιξωδομέτρου σύμφωνα με την εξίσωση του Poiseuille:

$$\eta = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8Vl} \quad (\text{Εξίσωση 3.1})$$

όπου, ΔP : η διαφορά πίεσης ανάμεσα στα δυο άκρα του τριχοειδούς (mPa)

r : η ακτίνα του τριχοειδούς (cm)

t : ο χρόνος εκροής του υγρού (s)

V : ο όγκος του εκρέοντος υγρού (mL)

l : το μήκος του τριχοειδούς του ιξωδομέτρου (cm)

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

$$\eta = \frac{\rho g h \pi r^4 t}{8Vl} \quad (\text{Εξίσωση 3.2})$$

ή

$$\eta = K_{\text{ιξωδομέτρου}} \cdot t \cdot \rho \quad (\text{Εξίσωση 3.3})$$

όπου, η : το απόλυτο ιξώδες (cP)

ρ : η πυκνότητα του υγρού (g/mL)

$$K_{\text{ξωδομέτρου}} = \frac{gh\pi r^4}{8Vl} : \eta \text{ σταθερά του ξωδομέτρου (mm}^2/\text{s}^2)$$

t: ο χρόνος εκροής (s)

Στην παρούσα εργασία, το σχετικό και το ειδικό ξώδες υπολογίζονται απευθείας από το χρόνο εκροής του διαλύματος του πολυμερούς και το χρόνο εκροής του καθαρού διαλύτη αντίστοιχα, καθώς οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο ίδιο ξωδόμετρο και η πυκνότητα του διαλύματος θεωρείται ίση με αυτή του διαλύτη, λόγω των αραιών διαλυμάτων.

Έτσι, το σχετικό ξώδες υπολογίζεται από την εξής απλοποιημένη σχέση:

$$RV = t/t_0 \text{ (Εξίσωση 3.4)}$$

Ο προσδιορισμός του οριακού αριθμού ξώδους $[\eta]$, για το υπό μελέτη σύστημα πολυγαλακτικού οξέος-χλωροφορμίου στους 30 °C, γίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$[\eta] = \frac{1}{c} \sqrt{2(\eta_{sp} - l\eta_{red})} \text{ (Εξίσωση 3.5)}$$

Ο οριακός αριθμός ξώδους συνδέεται με το μέσου-ξώδους μοριακό βάρος, \overline{M}_v , μέσω της εξίσωσης Mark-Houwling-Sakurada:

$$[\eta] = K \overline{M}_v^a \text{ (Εξίσωση 3.6)}$$

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

Η σταθερές που χρησιμοποιούνται φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.2: Τιμές των σταθερών που χρησιμοποιούνται στην ξωδομετρία

Υλικό	K (dL g ⁻¹)(g mol ⁻¹) ^{-a}	a	Συνθήκες διάλυσης
PLA	1.31·10 ⁻⁴	0.777	30°C σε χλωροφόρμιο

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ξωδομετρίας αποτυπώνονται σε διάφορες εκφράσεις ξώδους. Η ονομασία των εκφράσεων ξώδους που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη εργασία φαίνονται στο Πίνακα 3.3:

Πίνακας 3.3: Ονομασίες εκφράσεων ιξώδους

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

3.3.2.3 Χαρακτηρισμός του πολυμερούς

Αναλυτικός προσδιορισμός των ελεύθερων ομάδων με τιτλοδότηση

Ο αναλυτικός προσδιορισμός των ελεύθερων ομάδων ενός πολυμερούς αποτελεί μία μη-θερμοδυναμική μέθοδο προσδιορισμού του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους, \overline{M}_n , των πολυμερών, η οποία στηρίζεται στον προσδιορισμό του αριθμού των γραμμομορίων των ακραίων ομάδων σε δεδομένη μάζα πολυμερούς. Ο αριθμός των ακραίων ομάδων συνδέεται με τον αριθμό των μορίων του πολυμερούς και υπολογίζεται, έτσι, ο συνολικός αριθμός μακρομορίων, που περιέχονται σε συγκεκριμένη μάζα δείγματος.

Η ανάλυση των ακραίων ομάδων, συγκεκριμένα των καρβοξυλομάδων πραγματοποιείται με ποτεσιονμετρική τιτλοδότηση. Κατά την ποτεσιονμετρική τιτλοδότηση παρακολουθείται η μεταβολή του δυναμικού του συστήματος και δημιουργούνται αντίστοιχα διαγράμματα, ικανά να προσδιορίσουν το τελικό ή ισοδύναμο σημείο της αντίδρασης εξουδετέρωσης. Το ισοδύναμο σημείο (equivalence point, EP) είναι το σημείο της σταδιακής προσθήκης του τιτλοδότη, όπου ισοδύναμα ποσά του τιτλοδότη και της προς προσδιορισμό ουσίας έχουν αντιδράσει, με αποτέλεσμα η αντίδραση να έχει περατωθεί ποσοτικά. Ο προσδιορισμός του τελικού σημείου γίνεται με τη χρήση των καμπυλών τιτλοδότησης και πιο συγκεκριμένα με προέκταση του κατακόρυφου τμήματος των καμπυλών στον άξονα των τετμημένων. Όσο μεγαλύτερο είναι το κάθετο τμήμα της καμπύλης και όσο πλησιάζει προς ευθεία, τόσο πιο απότομη είναι η μεταβολή του μεγέθους και άρα τόσο ακριβέστερη η τιτλοδότηση.

Η συγκέντρωση των καρβοξυλομάδων σχετίζεται με το μοριακό βάρος του δείγματος, υπολογίζεται από την Εξίσωση 3.7 και εκφράζεται σε χιλιογραμμοϊσοδύναμα ομάδων ανά

κίλο πολυμερούς (meq/kg πολυμερούς) ή σε γραμμοϊσοδύναμα ανά 10^6 γραμμάρια πολυμερούς (equivalent/10⁶ g πολυμερούς).

$$C = \frac{1000 N_{\text{τιτλοδότη}} V_{EP}}{m} \quad (\text{Εξίσωση 3.7})$$

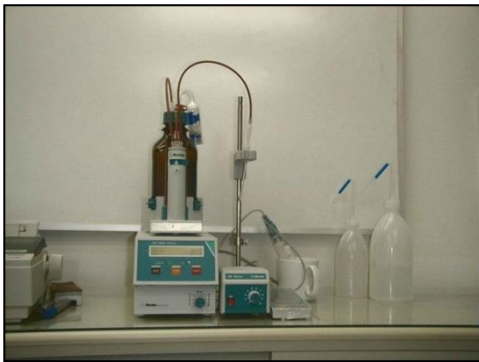
Όπου, C: η συγκέντρωση των ακραίων ομάδων (meq/kg)

V_{EP} : ο όγκος του τιτλοδότη που χρειάστηκε ώστε να καταγραφεί το ισοδύναμο σημείο (mL)

$N_{\text{τιτλοδότη}}$: η κανονικότητα του τιτλοδότη (meq/mL)

m: η μάζα του διαλυμένου πολυμερούς (g)

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται ποτενσιομετρική τιτλοδότηση με αυτόματο τιτλοδότη (716 DMS Titrino, Brinkmann Instruments, INC.). Ο αυτόματος τιτλοδότης αποτελείται από ένα δοχείο με το μέσο τιτλοδότησης, που τροφοδοτεί ένα κύλινδρο 10 mL, ο οποίος γεμίζει και αδειάζει αυτόματα, και από ένα δοσομετρικό που συνδέεται με τον κύλινδρο και καταλήγει στο διάλυμα, που τιτλοδοτείται. Το δυναμικό του διαλύματος προσδιορίζεται από δυο ηλεκτρόδια: από το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το ηλεκτρόδιο μέτρησης. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο αργύρου Ag/AgCl Li^+Cl^- (Metrohm 6.0729.100), το οποίο φυλάσσεται σε κορεσμένο διάλυμα LiCl σε αιθανόλη. Ως ηλεκτρόδιο μέτρησης χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υάλου (Metrohm 6.0133.100), το οποίο φυλάσσεται σε απιονισμένο νερό (Metrohm manual).



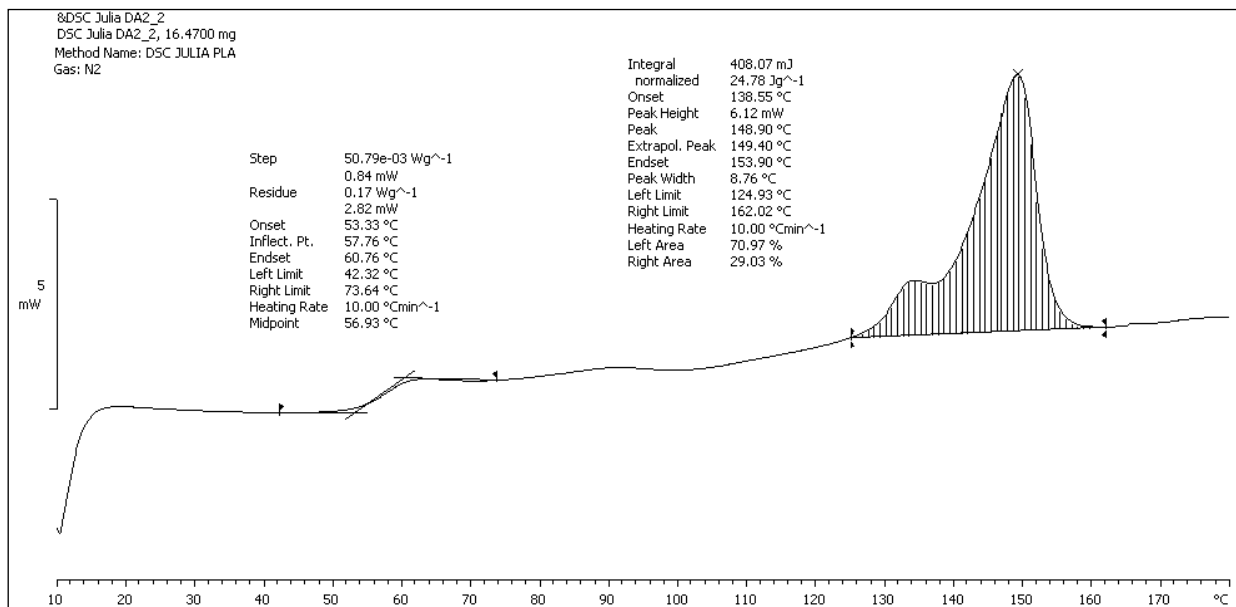
Εικόνα 3.4: Αυτόματος τιτλοδότης για τον αναλυτικό προσδιορισμό ακραίων

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα του πρόκειται να τιτλοδοτηθεί. Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 0,5 g του πολυμερούς και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 40 mL χλωροφορμίου (CHCl_3). Η κωνική φιάλη αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πολυμερές και το διάλυμα είναι έτοιμο για τιτλοδότηση. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο μετρήσεις και ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο μέσος όρος τους. Επισημαίνεται ότι κάθε δείγμα του οδηγείται για μέτρηση έχει προηγουμένως ξηρανθεί.

Ανάλυση διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calometry, DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θερμικών μεταπτώσεων και του ποσοστού κρυσταλλικότητας των πολυμερών. Η διάταξη DSC "σαρώνει" μία καθορισμένη θερμοκρασιακή περιοχή και μελετά τη συμπεριφορά του δείγματος του πολυμερούς καθώς η θερμοκρασία μεταβάλλεται (Βουγιούκα, 2004).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς στη ροή θερμότητας μεταξύ ενός δείγματος πολυμερούς και ενός δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία, όταν τα δύο δείγματα υπόκεινται σε ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή/και ψύξης (Παπά, 2004).



Διάγραμμα 3.1: Παράδειγμα καμπύλης DSC πολυγαλακτικού οξέος

Με την τεχνική αυτή μετρείται σημαντικός αριθμός φυσικών ή χημικών αλλαγών σε ένα πολυμερές. Ενδόθερμες και εξώθερμες διεργασίες καταγράφονται ως κορυφές στα αντίστοιχα γραφήματα DSC και τα αντίστοιχα εμβαδά εκφράζουν την απορροφούμενη ή εκλυόμενη θερμότητα αντίστοιχα, η οποία ανάγεται στη μάζα του δείγματος που έχει χρησιμοποιηθεί. Σε αυτές τις αλλαγές περιλαμβάνονται, η θερμοκρασία (T_c), η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), η ενθαλπία κρυσταλλώσεως (ΔH_c), η θερμοκρασία τήξης (T_m), και η ενθαλπία τήξης (ΔH_m).

Το εμβαδόν κάτω από την κορυφή συσχετίζεται άμεσα με τις μεταβολές της ενθαλπίας που λαμβάνουν χώρα. Η ενδόθερμη κορυφή που παρατηρείται κατά την τήξη αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της κρυσταλλικότητας του πολυμερούς. Έτσι, αν η ενθαλπία τήξης, ΔH_f , ενός τέλει κρυσταλλικού πολυμερούς είναι γνωστή, υπολογίζεται το ποσοστό κρυσταλλικότητας (x_c), από τη σχέση:

$$x_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_f} \cdot 100\% \text{ (Εξίσωση 3.8)}$$

Για τις αναλύσεις DSC χρησιμοποιείται η συσκευή Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System.



Εικόνα 3.5: Συσκευή Mettler DSC 1 STAR^e System

Κάθε δείγμα, πριν οδηγηθεί για μέτρηση ζυγίζεται, αφού πρώτα έχει ξηρανθεί για μια ημέρα στους 60 °C. Στη συνέχεια η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε κατάλληλο καψίδιο αλουμινίου, το οποίο σφραγίζεται αεροστεγώς και τοποθετείται στον έναν εκ των δύο θερμαινόμενων υποδοχέων του οργάνου. Το θερμοκρασιακό εύρος για τις μετρήσεις κυμαίνεται από 10 έως 180 °C με συνεχή ροή φέροντος αζώτου 10 mL min⁻¹ και ρυθμούς θέρμανσης 10 °C min⁻¹. Αποτέλεσμα της θερμοκρασιακής σάρωσης είναι η εξαγωγή ενός θερμογραφήματος από το οποίο, με τη βοήθεια του λογισμικού που συνοδεύει το όργανο, εξάγονται οι επιθυμητές πληροφορίες (T_g , T_m , ΔH_m και x_c).

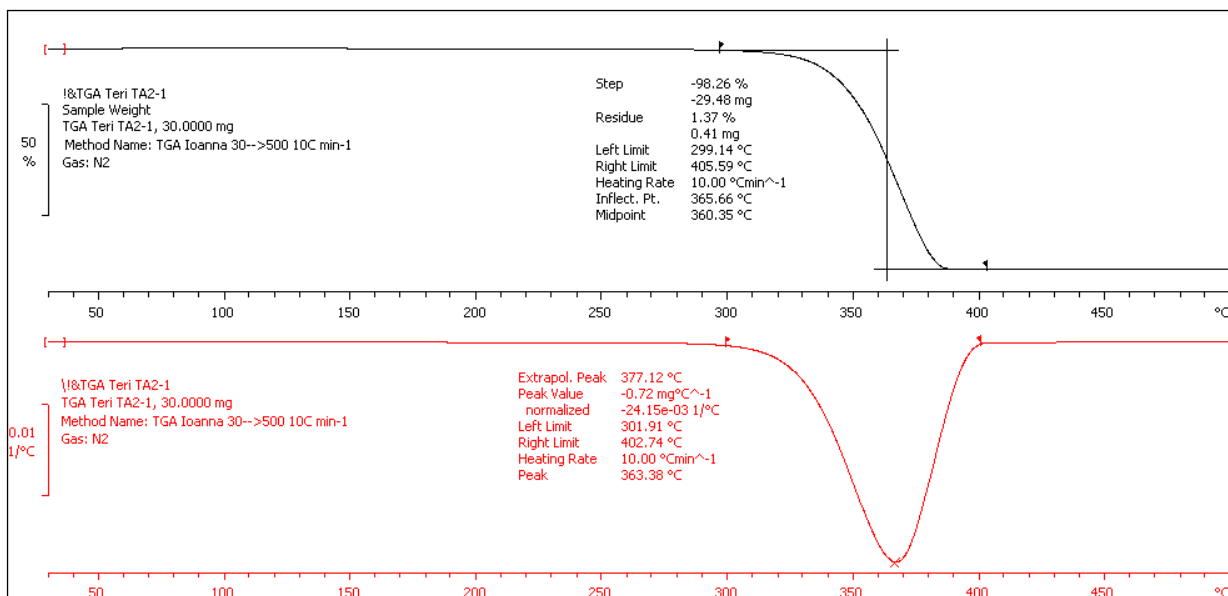
Θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)

Η Θερμοσταθμική Ανάλυση, χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητας ενός υλικού. Επιπλέον, εφαρμόζεται στην παρακολούθηση φαινομένων αποσύνθεσης και οξειδωσης ή την μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων, που εμφανίζονται κατά την θερμική καταπόνηση ενός δείγματος και έχουν σαν συνέπεια μεταβολές στη μάζα του (Βουγιούκα, 2004).

Κατά τη θερμοσταθμική ανάλυση, το υπό εξέταση δείγμα, θερμαίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες (περιβάλλον αερίου, ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας, τελική θερμοκρασία) και καταγράφεται συνεχώς το βάρος του, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Από τα αποτελέσματα εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με τη θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση (για δυναμική καταπόνηση), το χρόνο που πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση (για ισοθερμοκρασιακή καταπόνηση), την κινητική των αντιδράσεων διάσπασης και τις ποσότητες των σωμάτων που αντέδρασαν. Από τις δύο προαναφερθείσες παρατηρήσεις είναι δυνατόν να εξαχθούν ποιοτικά κυρίως συμπεράσματα, ενώ από τις τελευταίες μπορούν να γίνουν ποσοτικοί υπολογισμοί. Σημαντικές παράμετροι στην θερμοσταθμική ανάλυση είναι ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος, η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, ο χρόνος ισοθερμοκρασιακής καταπόνησης, το περιβάλλον αερίου μέσα στο φούρνο και η ποσότητα του αναλυόμενου δείγματος (Παπά, 2004).

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο θερμοζυγό Mettler Toledo TGA/DSC 1 STAR^e System. Κάθε δείγμα, πριν οδηγηθεί για μέτρηση ζυγίζεται, αφού πρώτα έχει ξηρανθεί για μια ημέρα στους 60 °C. Το θερμοκρασιακό εύρος κατά τις μετρήσεις κυμαίνεται από 30 έως 500 °C με ρυθμό θέρμανσης 10 °C min⁻¹ και συνεχή παροχή αζώτου 20 mL min⁻¹. Το αποτέλεσμα της θερμοκρασιακής σάρωσης είναι η εξαγωγή ενός θερμογραφήματος από το οποίο, με κατάλληλη επεξεργασία εξάγονται η θερμοκρασία αποικοδόμησης και το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας. Το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας είναι το επί τοις εκατόν κλάσμα της μάζας του δείγματος που έχει παραμείνει στον θερμοζυγό προς την αρχική μάζα του δείγματος:

$$\% \text{Υπόλειμμα μάζας} = \frac{m_{\text{τελική}}}{m_{\text{αρχική}}} \cdot 100\% \text{. (Εξίσωση 3.9)}$$



Διάγραμμα 3.2: Παράδειγμα Θερμογραφήματος TGA

3.3.3 Σχηματισμός Νανοσωματιδίων και Εγκλεισμός της ένωσης

Από τις διάφορες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για την παρασκευή νανοσωματιδίων από πολυγαλακτικό οξύ επιλέχθηκε, για την παρούσα πειραματική εργασία, η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του οργανικού διαλύτη.

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

Παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) περιεκτικότητας 1% w/v, με σκοπό να αποτελεί την υδατική φάση στα πειράματα νανοεγκλεισμού. Σε ποτήρι ζέσεως των 1000 mL τοποθετήθηκαν 10 g PVA και 1 L απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες σε μαγνητικό αναδευτήρα στους 50 °C. Στη συνέχεια το διάλυμα φυλάχθηκε σε κλειστό μπουκάλι από το οποίο λαμβανόταν κατάλληλη ποσότητα για κάθε πείραμα.

3.3.3.2 Παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα PLA σε ακετόνη, συγκέντρωσης 10 mg/mL. Συγκεκριμένα, 23 mg PLA και 2,3 mL ακετόνης τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκαν για 15min σε αναδευτήρα *Vortex* μέχρι να διαλυθεί τελείως το πολυμερές. Στη συνέχεια σε ποτήρι ζέσεως, που περιείχε 30 mL από το υδατικό διάλυμα της PVA, πραγματοποιήθηκε η

έγχυση του διαλύματος του PLA με σύριγγα, υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα και θερμοκρασία δωματίου. Κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του γαλακτώματος. Η ανάδευση συνεχίστηκε για 10 λεπτά και στη συνέχεια το ποτήρι ζέσεως που περιείχε το γαλάκτωμα τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα (shaker), στις 80 στροφές/λεπτό για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την εξάτμιση της ακετόνης και το σχηματισμό των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 3.6: Shaker Gallenkamp

Στη συνέχεια για την απομόνωση των νανοσωματιδίων πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές φυγοκentrήσεις.

Η πρώτη φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στις 5000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη φυγοκέντρηση αυτή κατακάθονται τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σωματίδια, τα οποία απορρίπτονται και το υπερκείμενο υγρό (S1) ανακτάται και οδηγείται για δεύτερη φορά στη φυγόκεντρο.

Η δεύτερη φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στις 17000 στροφές για 20 λεπτά, στους 10°C. Στη φυγοκέντρηση αυτή κατακάθονται τα νανοσωματίδια που έχουν σχηματιστεί. Το υπερκείμενο υγρό (S2) απομακρύνεται, τα νανοσωματίδια διασπείρονται σε απιονισμένο νερό και ακολουθεί η τρίτη φυγοκέντρηση με σκοπό να ξεπλυθούν τα νανοσωματίδια από τυχόν υπολείμματα PVA.

Η φυγοκέντρηση αυτή πραγματοποιείται στις ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη (17000 rpm–20 min–10°C). Το υπερκείμενο (S2) απομακρύνεται. Τα νανοσωματίδια

επαναδιασπείρονται σε 5 mL απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε vial σε συνθήκες συντήρησης.

3.3.3.3 Εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε πολυμερικά νανοσωματίδια.

Η διαδικασία είναι παρόμοια με τη διαδικασία παρασκευής πολυμερικών σωματιδίων. Συγκεκριμένα, 23,4 mg PLA και 2,34 mL ακετόνης τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκαν για 15min σε αναδευτήρα *Vortex* μέχρι να διαλυθεί τελείως το πολυμερές. Ακόμη, διαλύθηκαν 4,68 mg της υδροξυτυροσόλης σε 2,4 mL μεθανόλης. Τα δύο παραπάνω διαλύματα αναμειγνύονται και με χρήση σύριγγας προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 30 mL υδατικού διαλύματος PVA, 1% w/v. Ακολούθως, το διάλυμα τοποθετείται στο shaker και ακολουθούν φυγοκεντρήσεις, σύμφωνα με την διαδικασία που ακολουθήθηκε παραπάνω, με τη μόνη διαφορά ότι τα υπερκείμενα S1 και S2 δεν απορρίπτονται αλλά φυλάσσονται σε κλειστά μπουκάλια.

3.3.3.4 Εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε πολυμερικά νανοσωματίδια (Scale-Up).

Τα νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη κατασκευάστηκαν με σκοπό την ενσωμάτωσή τους σε κρέμα, στα εργαστήρια της εταιρείας καλλυντικών. Για το λόγο αυτό η διαδικασία του εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης επαναλήφθηκε σε μεγάλη κλίμακα για την παρασκευή 3g υδατικού διαλύματος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων ,συγκέντρωσης 20% w/w.

Συγκεκριμένα, 2,6g PLA και 520mg υδροξυτυροσόλης προστέθηκαν σε 3,12 L 1% w/v υδατικού διαλύματος PVA. Το τελικό υδατικό διάλυμα τριών γραμμαρίων περιείχε 540-620 mg νανοσωματιδίων.

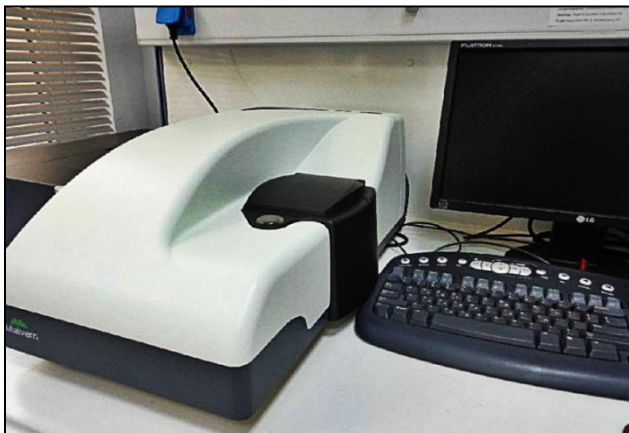
3.3.3.5 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

Μέγεθος και κατανομή μεγέθους & Z-δυναμικό

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων σχετικά με το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Από το κάθε δείγμα παρασκευάζεται διάλυμα νανοσωματιδίων σε δις-απιονισμένο νερό, συγκέντρωσης 0,05mg /mL. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα

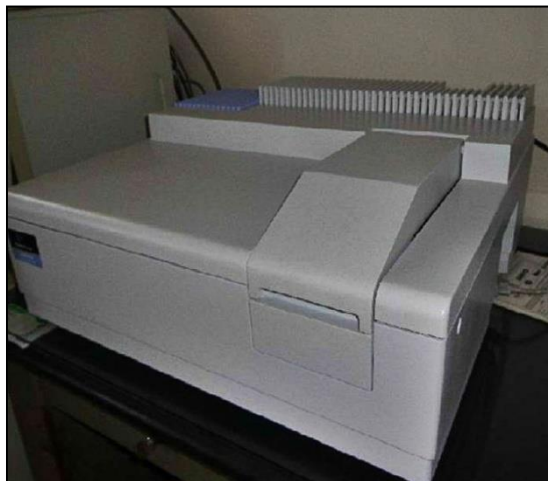
για περίπου 2 ώρες μέχρις ότου αποκτήσει καλή διασπορά. Στη συνέχεια, το εκάστοτε διάλυμα τοποθετείται σε κυψελίδα *disposable capillary cell* (DTS1070) και οδηγείται για μέτρηση. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται ο μέσος όρος. Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης, λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού $R.I.=1.330$.



Εικόνα 3.7: Συσκευή Malvern Zetasizer Nano ZSP, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

3.3.3.6 Ποσοστό εγκλεισμού-Πραγματική φόρτωση της υδροξυτυροσόλης στα νανοσωματίδια

Η ικανότητα εγκλεισμού (*encapsulation efficacy*) της υδροξυτυροσόλης στα σωματίδια προσδιορίστηκε έμμεσα, με τη χρήση φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).



Εικόνα 3.8: Όργανο φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Ειδικότερα, ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση της μη εγκλεισμένης ουσίας στα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων (διαλύματα S1 και S2). Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης, κατασκευάστηκε αρχικά καμπύλη αναφοράς, με χρήση πρότυπων διαλυμάτων υδροξυτυροσόλης, γνωστής συγκέντρωσης και απορρόφησης. Το ποσοστό εγκλεισμού υπολογίστηκε ως εξής:

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

3.3.4 Ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε κρέμα

3.3.4.1 Παρασκευή κρέμας-Ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων

Παρασκευάστηκαν 300 gr βάσης κρέμας προσώπου. Συγκεκριμένα, σχηματίστηκε απλό γαλάκτωμα, λάδι σε νερό (o/w), με τη λιπαρή φάση να καταλαμβάνει το 30.75% του γαλακτώματος. Ο βασικός γαλατωματοποιητής που χρησιμοποιήθηκε έχει ονομασία INCI C12-20 acid PEG-8-ester και δείκτη HLB=12. Ο συν-γαλακτοματοποιητής που επιλέχθηκε έχει ονομασία INCI Coco-glucoside (and) Coconut alcohol. Το σύνολο της λιπαρής φάσης που παρασκευάστηκε αποτελείται από φυσικής προέλευσης συστατικά έλαια και βούτυρα. Στην υδατική φάση, ως πηκτικό χρησιμοποιήθηκε η ξανθάνη (Xanthan Gum). Η λιπαρή και η υδατική φάση αναμίχθηκαν υπό ομογενοποίηση σε ισχυρές στροφές (2800 rpm) και για 10min με χρήση ομογενοποιητή τύπου Silverson. Κατ' αυτόν τον τρόπο σχηματίστηκε το γαλάκτωμα τύπου O/W.

Στη βιομηχανία των καλλυντικών, συνήθως οι δραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται σε ποσοστό 1-3%, ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας. Έτσι στα 300 gr κρέμας επιλέχθηκε να προστεθούν 3 gr υδατικού διαλύματος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων. Η ενσωμάτωση πραγματοποιήθηκε στους 30-35 °C, λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει η υδροξυτυροσόλη στη θερμοκρασία, και υπό ήπια ανάδευση για χρονικό διάστημα 10min.

3.3.4.2 Έλεγχος Σταθερότητας (Stability Test)

Ο έλεγχος σταθερότητας πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας καλλυντικών. Ο έλεγχος σταθερότητας διήρκησε τρεις μήνες. Συγκεκριμένα, η κρέμα

χωρίστηκε σε επιμέρους δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους σε θερμοκρασίες 5, 25, και 40 °C. Στο τέλος του πρώτου μήνα, στα δείγματα που είχαν τοποθετηθεί στους 25 και στους 40, πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που επιβάλει το πρωτόκολλο του ελέγχου σταθερότητας του προϊόντος. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του δείγματος, δηλαδή η εμφάνιση της κρέμας, το χρώμα, το άρωμα και η υφή. Ακολούθησε η μέτρηση του ιξώδους της κρέμας σε ιξωδόμετρο Brookfield. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε για 10 λεπτά στις 5000 στροφές (rpm) ενώ η δεύτερη για 10 λεπτά στις 7400 στροφές. Τέλος, παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο η δομή του γαλακτώματος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε στο τέλος του δεύτερου και του τρίτου μήνα παραμονής των δειγμάτων στους κλιβάνους. Στον τρίτο μήνα μετρήθηκε επιπλέον το δείγμα που είχε τοποθετηθεί στους 5 °C.

Για τον έλεγχο σταθερότητας, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας, πραγματοποιήθηκε επιπλέον ένας κύκλος ψύξης-απόψυξης. Συγκεκριμένα, δείγμα της κρέμας τοποθετήθηκε σε κλίβανο για ένα μήνα, όπου η θερμοκρασία του εναλλασσόταν από τους 5 στους 45 °C κάθε τρεις μέρες. Στο τέλος κάθε εβδομάδας πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που αναφέρονται παραπάνω (οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ιξώδες, φυγοκεντρήσεις, μικροσκόπιο).



Εικόνα 3.9: Φυγόκεντρος Digicen 20, Ιξωδόμετρο Brookfield, Μικροσκόπιο

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σταθερότητας σε δείγματα κρέμας χωρίς την προσθήκη των νανοσωματιδίων.

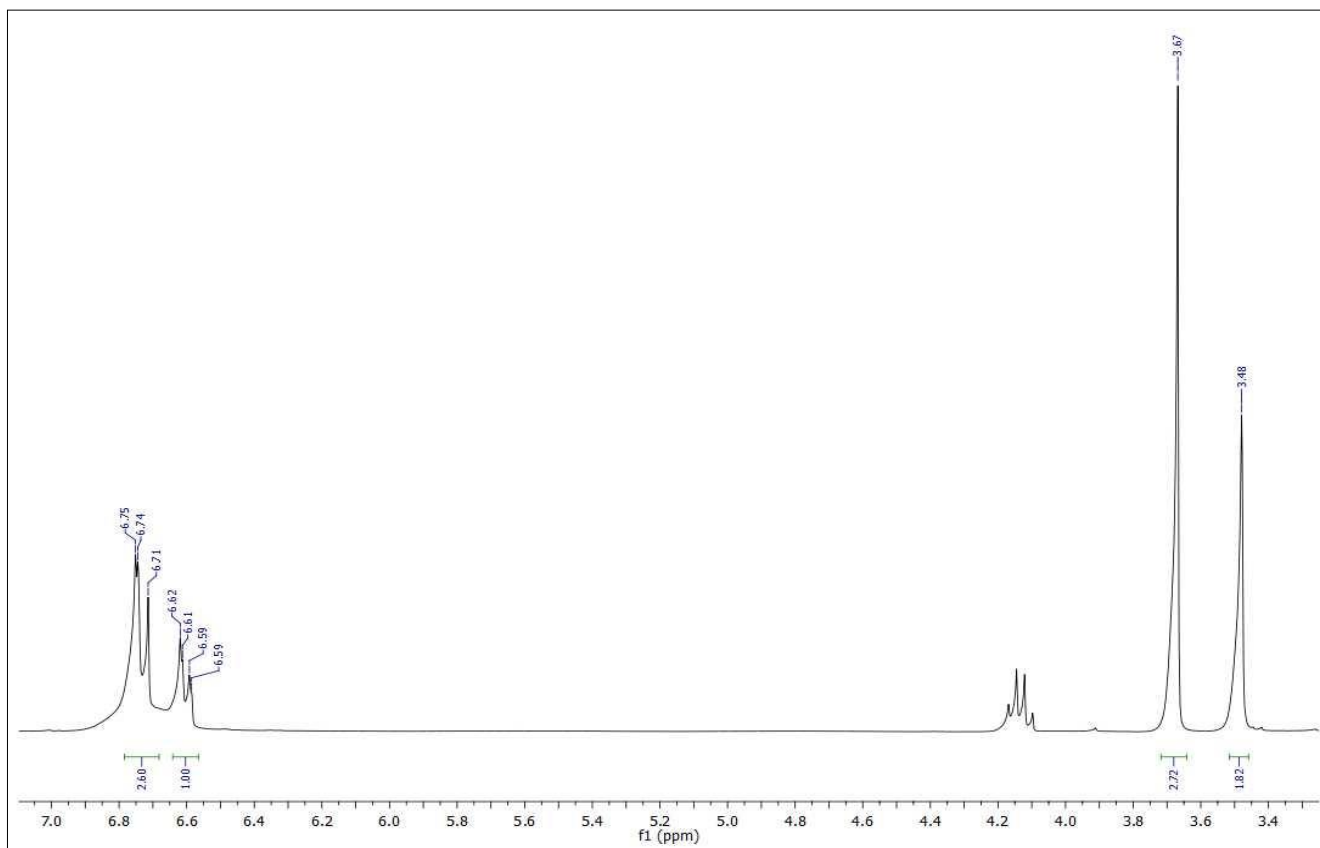
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Χαρακτηρισμός δομής νέων παραγώγων

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής των νέων παραγώγων που συντέθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H NMR και ^{13}C NMR), τα οποία ελήφθησαν στο Φασματογράφο NMR Varian Gemini 300 του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ.

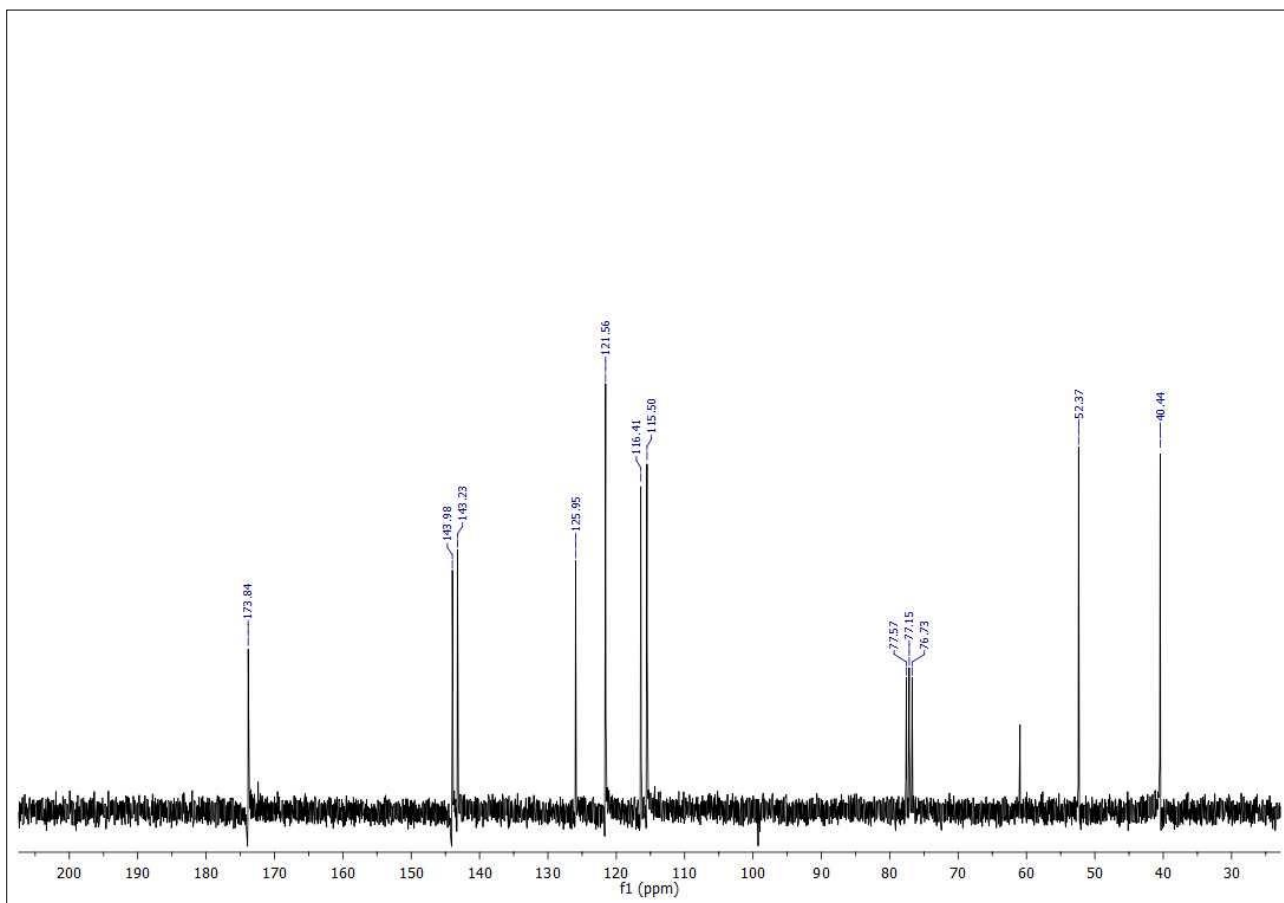
Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων αποδίδονται σε ppm ως προς το εσωτερικό πρότυπο TMS και οι σταθερές συζεύξεως δίνονται σε Hz.

4.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη και ταυτοποίηση της δομής του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος.



Διάγραμμα 4.1: Φάσμα ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (2)

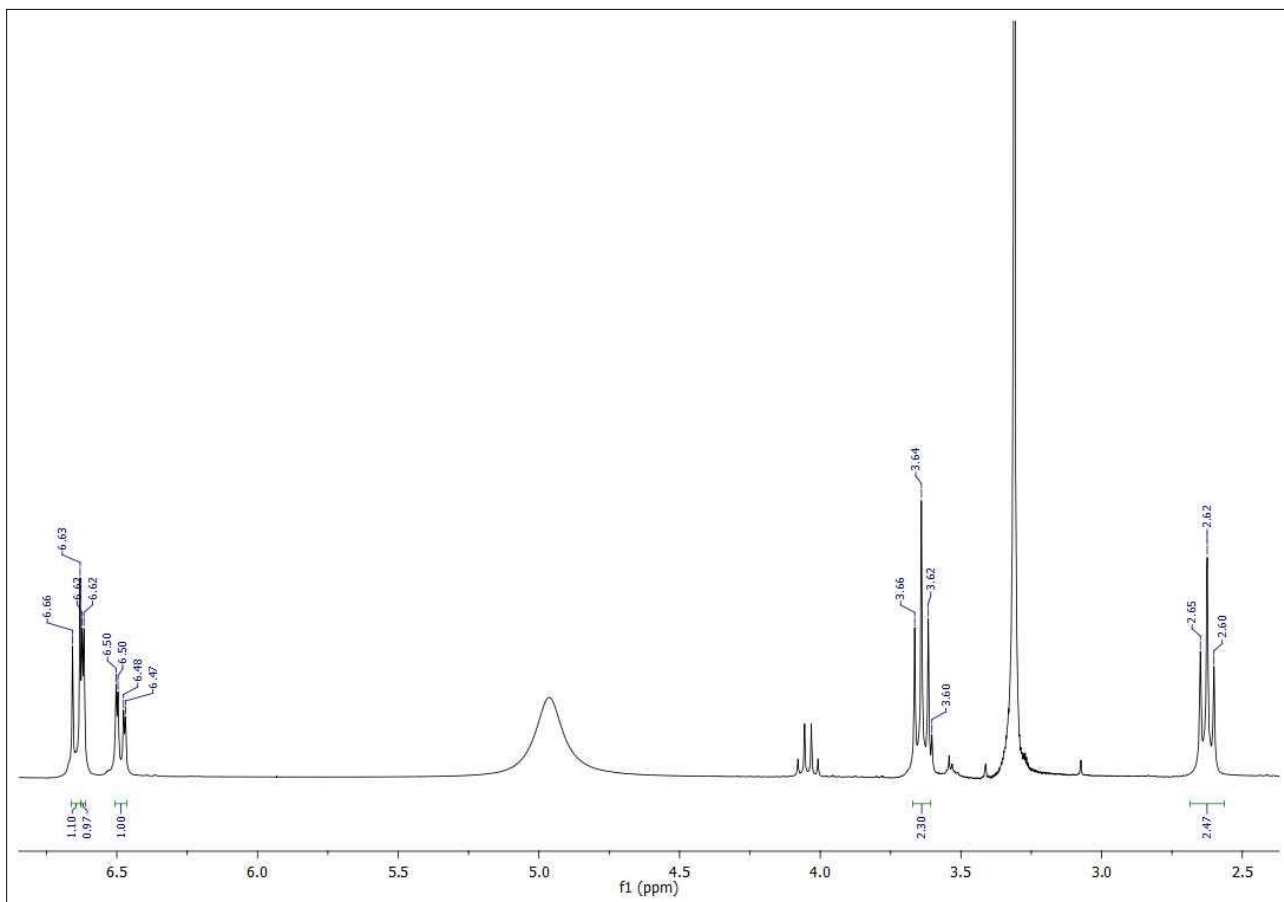
Το φάσμα πρωτονίου της ένωσης χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 3.66 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια της μεθοξυ ομάδας και ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, και από την παρουσία μιας επιπλέον απλής κορυφής στα 3.48 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια του μεθυλενίου του αρωματικού δακτυλίου και ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια. Οι απορροφήσεις των ενολικών υδρογόνων των θέσεων 4- και 5- του αρωματικού δακτυλίου, δεν δίνουν σήματα εξαιτίας της υψηλής κινητικότητάς τους.



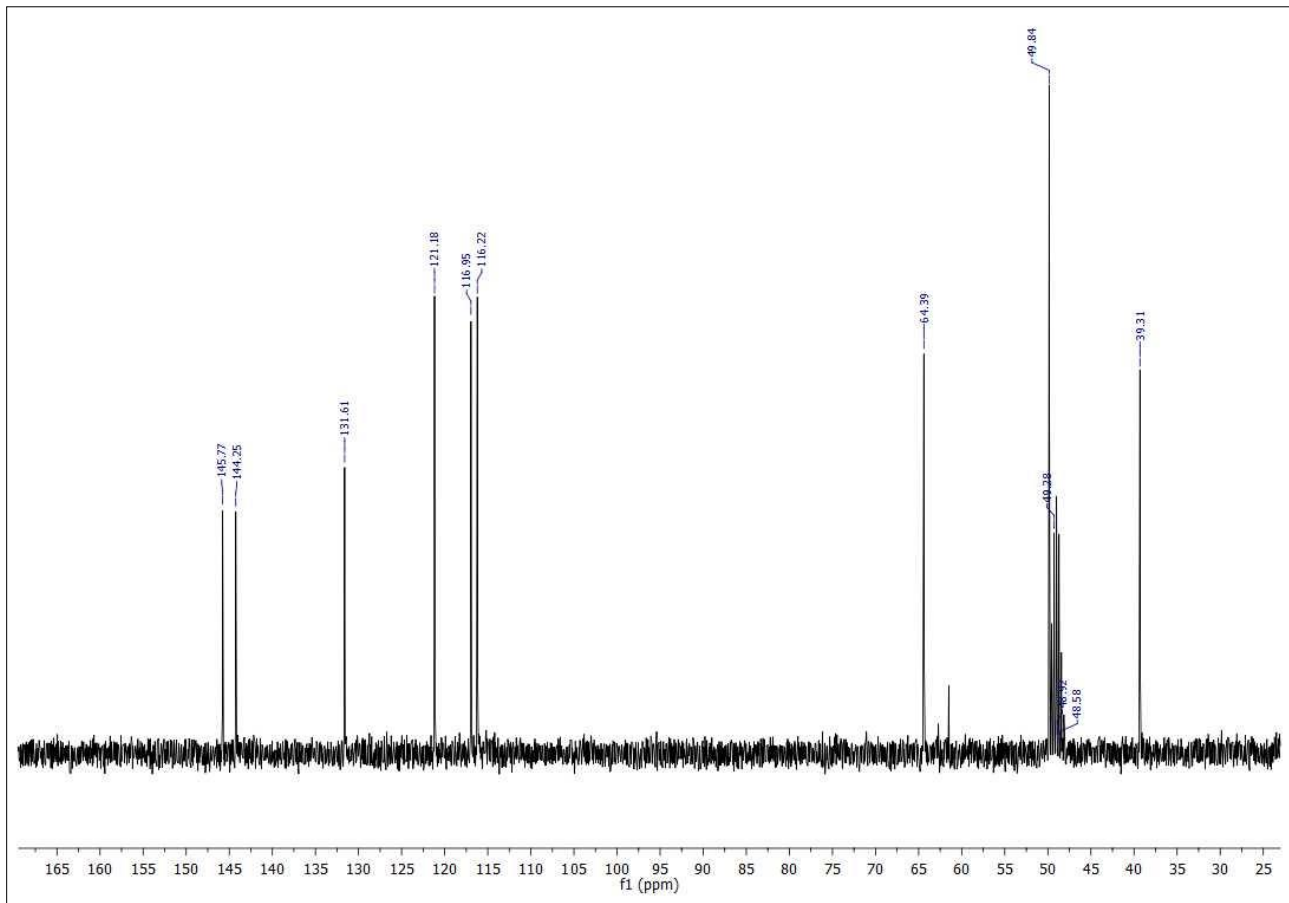
Διάγραμμα 4.2: Φάσμα ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) του μεθυλεστέρα του 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (2)

4.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη και ταυτοποίηση της δομής της Υδροξυτυροσόλης

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα της υδροξυτυροσόλης ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Το φάσμα πρωτονίου της ένωσης χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο τριπλών κορυφών στα 3.64 και 2.62 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθυλενομάδων και ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια η κάθε μια. Ομοίως, οι απορροφήσεις των ενολικών υδρογόνων των θέσεων 4- και 5- του αρωματικού δακτυλίου, δεν δίνουν σήματα, εξαιτίας της υψηλής κινητικότητάς τους.



Διάγραμμα 4.3: : Φάσμα 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) της υδροξυτυροσόλης (3)



Διάγραμμα 4.4: Φάσμα ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) της υδροξυτυροσόλης (3)

4.2 Χαρακτηρισμός του Πολυγαλακτικού Οξέος

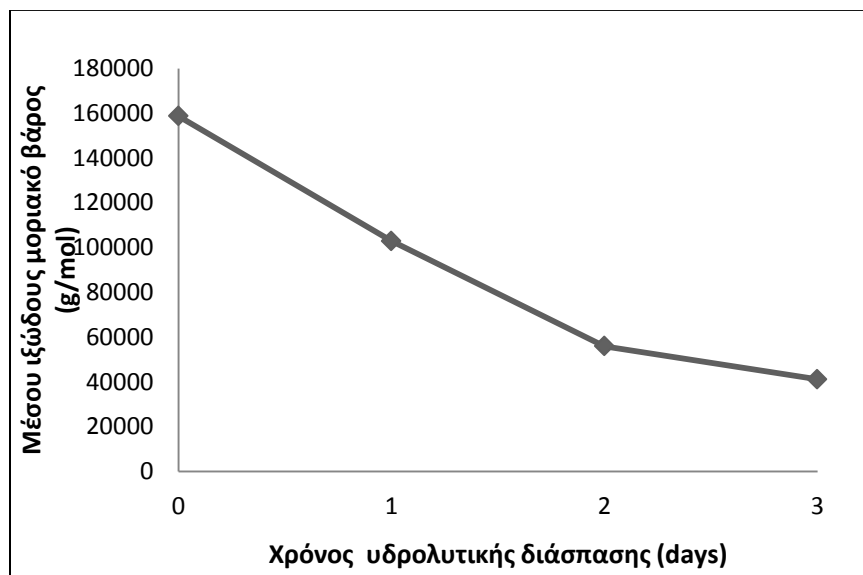
Αποτελέσματα ιξωδομετρίας

Το πολυγαλακτικό οξύ, υποβλήθηκε σε υδρολυτική διάσπαση με σκοπό την παραλαβή πολυμερούς τριών διαφορετικών μοριακών βαρών, ώστε να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα νανοεγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης.

Για τον υπολογισμό του μέσου ιξώδους μοριακού βάρους, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ιξωδομετρίας στα δείγματα PLA_1, PLA_2, PLA_3 καθώς και στο PLI005. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα ιξωδομετρίας των δειγμάτων PLA

Δείγμα	$M_n(\text{g/mol})$	% ΔM_n
PLI005	158720 \pm 5568	-
PLA_1	102855 \pm 8135	-35
PLA_2	55922 \pm 3175	-65
PLA_3	41062 \pm 4310	-74



Διάγραμμα 4.5: Μέσο ιξώδους μοριακό βάρος κατά την υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον στους 60 °C

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι η υδρόλυση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μέσου-ιξώδους μοριακού βάρους, κατά 35 έως 74%, σε σύγκριση με την τιμή του μέσου-ιξώδους μοριακού βάρους του εμπορικού υλικού (PLI005). Συγκεκριμένα, η αρχική τιμή 158720 g/mol, του εμπορικού υλικού, μειώνεται μετά από μια ημέρα υδρόλυσης σε 102855 g/mol, μετά από δύο ημέρες υδρόλυσης σε 55922 g/mol και μετά από τρεις ημέρες υδρόλυσης σε 41062 g/mol. Ο στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας, η μείωση δηλαδή του μοριακού βάρους για την παραλαβή πολύ-γαλακτικού οξέος τριών διαφορετικών μοριακών βαρών, κρίνεται επιτυχής, ειδικά για τα δείγματα PLA_2 και PLA_3.

Ο ρυθμός της υδρόλυσης φαίνεται να σχετίζεται με το χρόνο της υδρόλυσης, καθώς αρχικά είναι αρκετά υψηλός ενώ με την πάροδο του χρόνου μειώνεται Διάγραμμα 4.5.

Αποτελέσματα Ανάλυσης Ακραίων Ομάδων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ακραίων καρβοξυλομάδων, που πραγματοποιήθηκε στα τρία υδρολυμένα δείγματα πολυγαλακτικού οξέος PLA_1, PLA_2 και PLA_3 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ακραίων Ομάδων

Δείγμα	[COOH] (mEq/kg)
PLA_1	55.685 ± 15.937
PLA_2	122.744 ± 4.859
PLA_3	185.098 ± 16.140

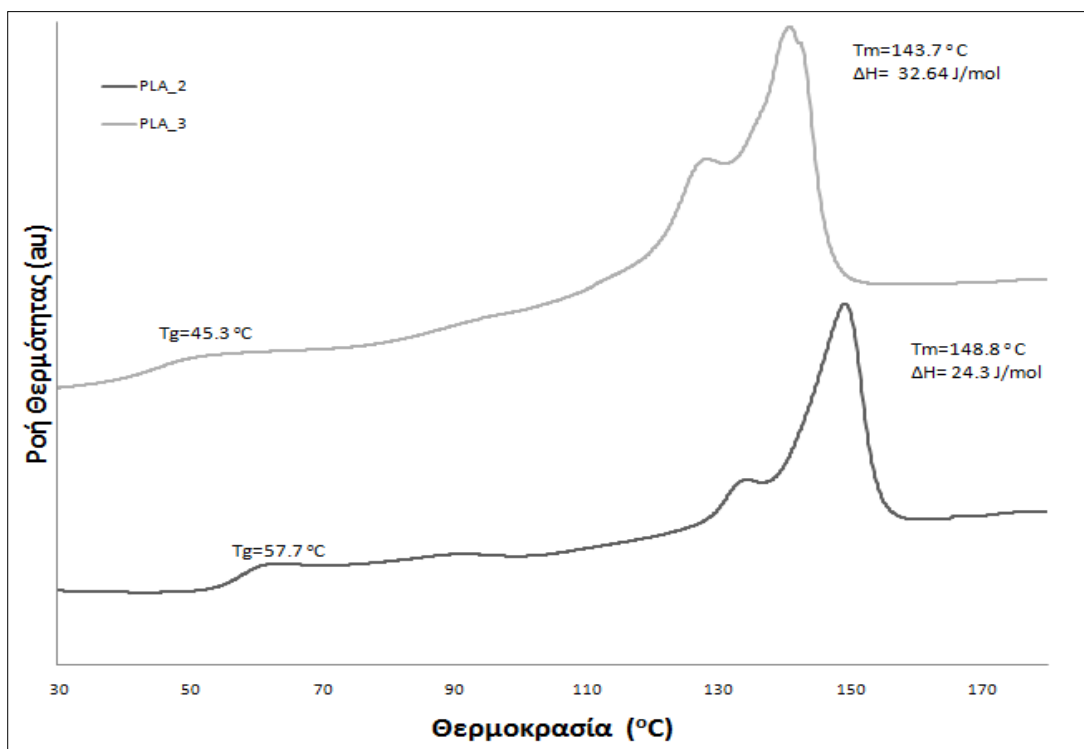
Όπως ήταν αναμενόμενο η συγκέντρωση των ακραίων καρβοξυλομάδων αυξάνεται καθώς προχωρά η υδρολυτική διάσπαση του πολυγαλακτικού οξέος, λόγω της σχάσης της πολυμερικής αλυσίδας. Ακόμα, οι καρβοξυλομάδες την υδρόλυση του πολυμερούς, γεγονός που αυξάνει παράλληλα τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα.

Αποτελέσματα ανάλυσης DSC

Η ανάλυση DSC, πραγματοποιήθηκε μόνο για τα δείγματα PLA_2 και PLA_3. Μέσω της ανάλυσης DSC προσδιορίστηκαν η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), η θερμοκρασία τήξης (T_m), η ενθαλπία τήξης (ΔH_m) και η κρυσταλλικότητα (x_c). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Στο Διάγραμμα 4.6 παρουσιάζονται οι καμπύλες τήξεως των δύο δειγμάτων.

Πίνακας 4.3: Πειραματικά αποτελέσματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης

Δείγμα	T_g (°C)	T_{m1} (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	X_c %
PLA_2	57.7 ± 0.1	148.8 ± 2	24.3 ± 0.7	17.96 ± 0.6
PLA_3	45.3 ± 0.2	143.7 ± 4.8	32.64 ± 4.2	24.18 ± 3.1



Διάγραμμα 4.6: Σύγκριση καμπυλών τήξης των πολυμερών PLA_2 και PLA_3

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θερμοκρασία τήξης είναι ανάλογες του μοριακού βάρους του πολυμερούς. Όπως παρατηρείται στα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση DSC, η T_g του δείγματος PLA_2 με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι μεγαλύτερη της T_g του PLA_3, με τιμές 57.7 °C και 45.3 °C αντίστοιχα. Αντίθετα, η ΔH του δείγματος PLA_2, που ισούται με 24.3 J/ mol, είναι μικρότερη της αντίστοιχης τιμής του δείγματος PLA_3 ($\Delta H= 32.64$ J/mol), όπως ήταν αναμενόμενο.

Αποτελέσματα ανάλυσης TGA

Πίνακας 4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης TGA

Δείγμα	% Υπόλειμμα μάζας	T _d (°C)
PLA_2	1.56 ± 0.3	349.71 ± 18.8
PLA_3	2.30 ± 0.5	362.57 ± 1

Από την ανάλυση TGA, προέκυψε το % υπόλειμμα μάζας του δείγματος PLA και η θερμοκρασία αποικοδόμησης(T_d). Σημειώνεται ότι δεν εξάγεται κάποιο συμπέρασμα από την τιμή της Td καθώς είναι ανεξάρτητη του μοριακού βάρους του πολυμερούς.

4.3 Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων

Ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης, πραγματοποιήθηκε με στόχο την ενσωμάτωση των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων σε καλλυντική κρέμα. Η ποσότητα που χρειάστηκε να παρασκευαστεί ώστε να προστεθεί στην κρέμα και να ακολουθήσει ο έλεγχος σταθερότητας, ήταν πολύ μεγάλη σε σύγκριση με την ποσότητα που μπορούσε να παρασκευαστεί σε εργαστηριακή κλίμακα. Για το λόγο αυτό, δεν ήταν δυνατό να διεξαχθούν περισσότερα από ένα πειράματα ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση διαφόρων παραμέτρων στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και στην απόδοση του εγκλεισμού. Αντίθετα, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα σε μεγάλη κλίμακα(NP_1), από το οποίο προέκυψε η ποσότητα των νανοσωματιδίων που επαρκούσαν για την ενσωμάτωση στην κρέμα, και ένα επιπλέον πείραμα εγκλεισμού σε μικρές ποσότητες, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα επηρεάζει την απόδοση του εγκλεισμού και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.

4.3.1 Χαρακτηρισμός κενών πολυμερικών νανοσωματιδίων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός κενών νανοσωματιδίων πολυγαλακτικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκε πολυγαλακτικό οξύ σε τρία διαφορετικά μοριακά βάρη, όπως είχαν προκύψει από την υδρολυτική διάσπαση του πολυμερούς. Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων.

Πίνακας 4.5: Πειράματα σχηματισμού κενών νανοσωματιδίων

Πολυμερές	M _w PLA (g mol ⁻¹)	Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός Ανάδευσης(rpm)	Αναλογία όγκου οργανικής /υδατικής φάσης	% PVA
PLA_1	102855	25	250	0.07	1
PLA_2	55922	25	250	0.07	1
PLA_3	41062	25	250	0.07	1

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα τρία πειράματα φαίνονται στον Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το μέγεθος των κενών νανοσωματιδίων.

Πείραμα	Διάμετρος (nm)	Pdl
Blank_1	571.65 ± 5.02	0.447 ± 0.044
Blank_2	260.30 ± 3.47	0.082 ± 0.014
Blank_3	220.60 ± 3.99	0.084 ± 0.020

Παρατηρείται ότι για το μεγαλύτερο μέσο μοριακό βάρος του PLA (102855 g/mol), βρέθηκε το μεγαλύτερο μέγεθος νανοσωματιδίων, 571.65 nm. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων των πειραμάτων Blank_2 και Blank_3, είναι αρκετά μικρότερα, 260.30 και 220.60 nm αντίστοιχα. Από δύο τελευταία πειράματα, με κοντινό σχετικά μοριακό βάρος PLA, προκύπτει κοντινό μέγεθος νανοσωματιδίων. Επιπλέον, σχετικά με την κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων, το μεγαλύτερο μοριακό βάρος του PLA έδειξε την μικρότερη ομοιογένεια δείγματος. Η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς, των δειγμάτων Blank_2 και Blank_3, φανερώνει άκρως ικανοποιητική ομοιογένεια δείγματος. Η επιλογή του πολυμερούς με βάση το μοριακό του βάρος έγινε θεωρώντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων Blank_2 και Blank_3 όμοια. Το πολυμερές του πειράματος Blank_1 απορρίφθηκε, εξαιτίας των μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων.

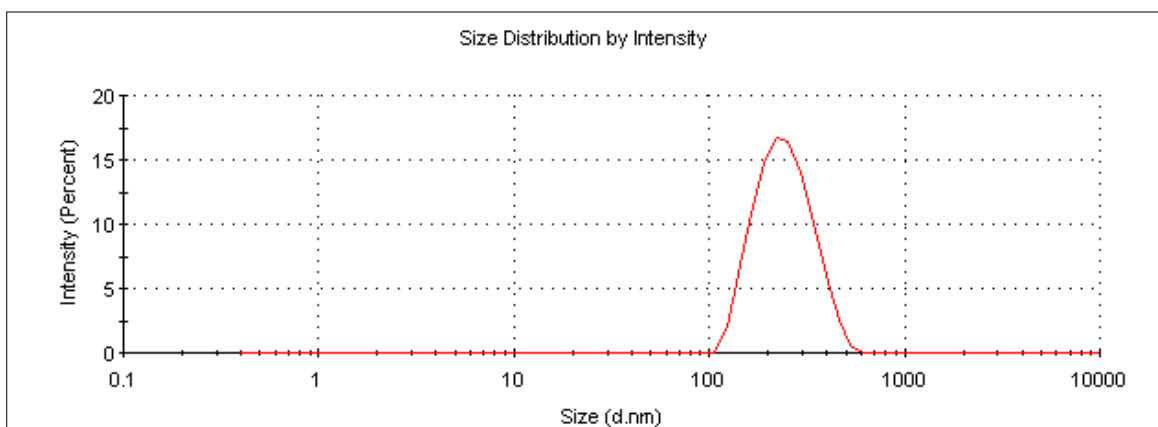
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το ζήτα δυναμικό παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα DLS για το Z-δυναμικό των κενών νανοσωματιδίων

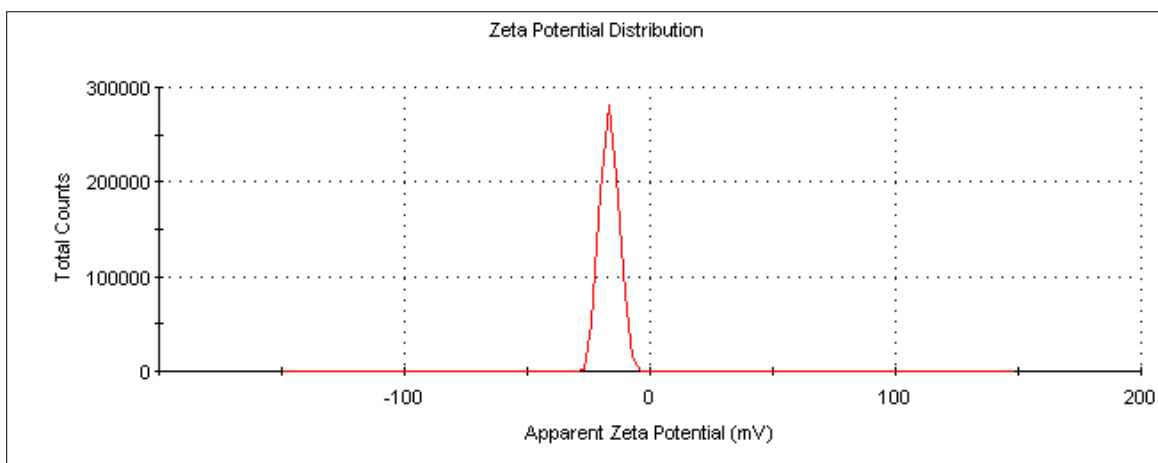
Πείραμα	Z-δυναμικό (mV)
Blank_2	-18.63 ± 3.15
Blank_3	-19.27 ± 5.02

Το ζ-δυναμικό των δύο μοριακών βαρών PLA, δεν διαφέρει σημαντικά. Σημειώνεται ότι, μεγάλες απόλυτες τιμές του ζ-δυναμικού, υποδηλώνουν σταθερές νανοσωματιδιακές δομές.

Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα για δείγμα Blank_2, όπως προέκυψαν από την μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS:



Διάγραμμα 4.7: Κατανομή μεγέθους του δείγματος Blank_2



Διάγραμμα 4.8: Κατανομή του δυναμικού επιφάνειας του δείγματος Blank_2

4.3.2 Χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη

Για τα πειράματα εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης επιλέχθηκε το PLA του πειράματος Blank_2 με μέσο μοριακό βάρος 55922 g/mol.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε μεγάλη κλίμακα (Πείραμα NP_1).

Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται οι συνθήκες του εγκλεισμού, ενώ στον Πίνακα 4.9 τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS, που πραγματοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν.

Πίνακας 4.8: Συνθήκες εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης σε μεγάλη κλίμακα

M _w PLA (g mol ⁻¹)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό Φόρτωσης %	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Αναλογία όγκου οργανικής /υδατικής φάσης	% PVA
55922	25	20	250	0.07	1

Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα DLS για το πείραμα NP_1

Διάμετρος (nm)	Pdl	Z-δυναμικό (mV)
563.6 ± 33.72	0.574 ± 0.058	-16.63 ± 3.250

Το μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων είναι διπλάσιο από το μέγεθος των αντίστοιχων κενών νανοσωματιδίων, ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς βρέθηκε 0.608. Η απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού (16.63 mV), είναι αρκετά μεγάλη ώστε να χαρακτηριστούν τα νανοσωματίδια σταθερά.

Αν και η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, μπορούν να ενσωματωθούν στην κρέμα, μιας και το μεγαλύτερο αυτό μέγεθος των νανοσωματιδίων στα καλλυντικά δεν αποτελεί περιορισμό. Ωστόσο, σε άλλες εφαρμογές, όπως στη φαρμακευτική υπάρχουν περιπτώσεις όπου το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σωματίδια που σχηματίστηκαν συνεχίζουν να βρίσκονται στην κλίμακα του νανόμετρου, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχία του πειράματος, με βάση τον αρχικό σχεδιασμό του.

Στη συνέχεια, όπως έχει αναφερθεί πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης σε μικρή κλίμακα (Πείραμα NP_2). Η συνθήκες του εγκλεισμού συνοψίζονται στον Πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10: Συνθήκες εγκλεισμού της HT (NP_2)

M _w PLA (g mol ⁻¹)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό Φόρτωσης %	Ρυθμός Ανάδευσης (rpm)	Αναλογία όγκου οργανικής /υδατικής φάσης	% PVA
55922	25	20	250	0.07	1

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS για το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.11: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για το πείραμα NP_2

Πείραμα	Διάμετρος (nm)	Pdi	Z-δυναμικό (mV)
NP_2	527.33 ± 58.10	0.56 ± 3.035	-22.87 ± 2.76

Παρατηρείται διπλασιασμός της διαμέτρου, σε σύγκριση με τα κενά νανοσωματίδια, παράλληλα με μείωση της ομοιογένειας του δείγματος. Η απόλυτη τιμή του ζ-δυναμικού παραμένει ικανοποιητικά μεγάλη, ενισχύοντας τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων.

Όπως έχει αναφερθεί, στο πείραμα αυτό δεν μεταβλήθηκε καμία παράμετρος της διεργασίας. Τα δύο πειράματα εγκλεισμού διαφέρουν μόνο στις ποσότητες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες των δύο πειραμάτων.

Πίνακας 4.12: Συγκριτικός πίνακας των ποσοτήτων των δύο πειραμάτων εγκλεισμού

Πείραμα	PLA (mg)	HT (mg)	PVA (mL)
NP_1	23,40	4,68	30
NP_2	2600	520	3120

Παρατηρώντας συγκριτικά τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στα δύο πειράματα, γίνεται κατανοητή η αύξηση του βαθμού δυσκολίας των πειραμάτων. Η μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα αυξάνει την πιθανότητα σφαλμάτων κατά την πειραματική διαδικασία και το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι πιο δύσκολο να επιτευχθεί. Στην προκειμένη περίπτωση, φάνηκε να μην επηρεάζει το αποτέλεσμα η μετάβαση αυτή.

Στον Πίνακα 4.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων εγκλεισμού που πραγματοποιήθηκαν, ώστε να διευκολύνει τη σύγκριση μεταξύ τους.

Πίνακας 4.13: Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS για τα δύο πειράματα εγκλεισμού

Πείραμα	Διάμετρος (nm)	PdI	Z-δυναμικό (mV)
NP_1	563.60 ± 33.72	0.574 ± 0.058	-16.63 ± 3.250
NP_2	527.33 ± 58.10	0.560 ± 3.035	-22.87 ± 2.760

Οι τιμές των διαμέτρων των νανοσωματιδίων δεν διαφέρουν σημαντικά (564.4 και 527.33 nm). Το ίδιο παρατηρείται και στην τιμή του δείκτη πολυδιασποράς, δηλαδή δεν διαφοροποιείται η ομοιογένεια των δειγμάτων στις δύο αυτές περιπτώσεις. Το ζ-δυναμικό παρουσιάζει μεγάλες αρνητικές τιμές στα δείγματα των δύο πειραμάτων που μετρήθηκαν. Στο πείραμα NP_2 η τιμή -22.86 mV είναι λίγο μεγαλύτερη από την τιμή που μετρήθηκε στο δείγμα του πειράματος NP_1 (-16.633 mV), γεγονός που υποδηλώνει ελαφρώς σταθερότερες νανοσωματιδικές δομές.

Επομένως, η μεταφορά σε μεγάλη κλίμακα, δεν άλλαξε ουσιαστικά τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων. Συγκρίνοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα με τα αποτελέσματα του σχηματισμού των κενών νανοσωματιδίων, φαίνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων να αυξάνεται με την προσθήκη της υδροξυτυροσόλης όπως ήταν αναμενόμενο.

4.4 Μελέτη σταθερότητας των νανοσωματιδίων

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη, φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης, στους 4 °C, σε γυάλινο φιαλίδιο και βρισκόνταν σε διασπορά σε 5 mL απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων των πειραμάτων NP_1 και Blank_2 για να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους κατά την αποθήκευση σε συνθήκες συντήρησης, μετά την πάροδο ενός μήνα. Τα αποτελέσματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.14.

Πίνακας 4.14: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS για τη σταθερότητα του μεγέθους των νανοσωματιδίων

Δείγμα	Μέγεθος			Pdi		
	Μήνας 1	Μήνας 2	% Μεταβολή	Μήνας 1	Μήνας 2	% Μεταβολή
Blank_2	260.30 ± 3.47	237.23 ± 5.25	-9	0.082 ± 0.014	0.208 ± 0.032	154
NP_1	563.60 ± 33.72	505.05 ± 0.94	-6	0.574 ± 0.058	0.608 ± 0.068	6

Στα δύο δείγματα που εξετάστηκαν, παρατηρείται τάση μείωσης του μεγέθους των νανοσωματιδίων, η οποία εξηγείται εάν ληφθεί υπόψη η αποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος. Παράλληλα, η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς αυξάνεται και φαίνεται ότι τα δείγματα χάνουν την ομοιομορφία τους με την πάροδο του χρόνου.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων μετά από ένα μήνα δεν αλλάζει σημαντικά, εφόσον μεταβλήθηκε κατά 9% και 6%, για τα δείγματα Blank_2 και NP_1 αντίστοιχα. Παρόμοιο είναι το αποτέλεσμα σχετικά με την ομοιομορφία του δείγματος NP_1, καθώς η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς αυξήθηκε κατά 6%. Όμως, στην περίπτωση των κενών νανοσωματιδίων η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς υπερδιπλασιάστηκε, δείχνοντας ότι το δείγμα Blank_2 περιέχει πιθανόν διαφόρων μεγεθών νανοσωματίδια.

4.5 Απόδοση εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης

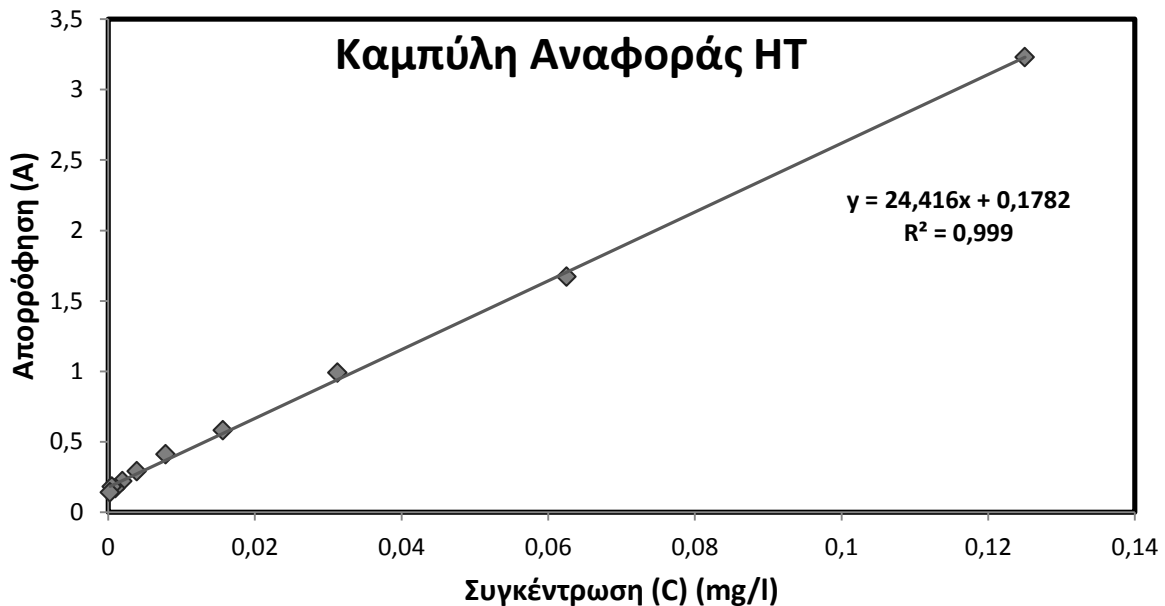
Για τον προσδιορισμό της ικανότητας εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης (*Encapsulation Efficiency, EE%*), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης, στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσε της συγκέντρωσης. Αρχικά, ελήφθη ένα φάσμα της ένωσης και βρέθηκε ότι τα 277 nm είναι το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων, γνωστής συγκέντρωσης, στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.15: Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στα 277nm

Δείγμα	C (mg/mL)	A
1	0.125	3.23
2	0.0625	1.67
3	0.03125	0.99
4	0.015625	0.58
5	0.007813	0.41
6	0.0039	0.29
7	0.00195	0.22
8	0.000975	0.17
9	0.0004875	0.18
10	0.00024375	0.14

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Πίνακα 4.15 , κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης συναρτήσει της απορρόφησης στα 277 nm (Διάγραμμα 4.9).



Διάγραμμα 4.9: Καμπύλη αναφοράς της υδροξυτυροσόλης (ΗΤ)

Με βάση την καμπύλη αναφοράς, ποσοτικοποιήθηκε η μάζα της μη εγκλεισμένης ουσίας στα υπερκείμενα S1 και S2, των φυγοκεντρήσεων. Συγκεκριμένα, για το κάθε υπερκείμενο προσδιορίστηκε η μέγιστη απορρόφηση, στα 277 ± 1 nm.

Για το υπερκείμενο S1, του πειράματος NP_2 το οποίο ήταν αρκετά πυκνό, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από κατάλληλη αραιώση, τέτοια ώστε να παραμένει μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς.

Με βάση τις μετρήσεις αυτές, προκύπτει η απόδοση του εγκλεισμού κάθε πειράματος, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.16: Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis

Υπερκείμενο S1					Υπερκείμενο S2			
Δείγμα	Abs	C (mg/mL)	V(mL)	m (mg)	Abs	C (mg/mL)	V(mL)	m (mg)
NP_1	1.31	0.046350000	660	30.590	0.51	0.0135894	118.2	1.606273
NP_2	0.48	0.012360747	17	0.2101327	1.4148	0.05064712	2.7	0.136747

Η απόδοση του εγκλεισμού της υδροξυτυροσόλης στα δύο πειράματα φαίνεται στον Πίνακα 4.17.

Πίνακας 4.17: Απόδοση εγκλεισμού

Δείγμα	Μάζα HT (mg)			EE%
	Συνολική	Μη εγκλεισμένη	Εγκλεισμένη	
NP_1	116	32.20	83.80	72.24
NP_2	4.68	0.35	4.33	92.59

Τα ποσοστά εγκλεισμού είναι ικανοποιητικά και για τα δύο πειράματα. Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση του εγκλεισμού, στο πείραμα NP_2 το ποσοστό είναι 92,59%, κάτι που σημαίνει ότι ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης στα πολυμερικά νανοσωματίδια πραγματοποιήθηκε με μεγάλη επιτυχία. Η απόδοση της διεργασίας μειώθηκε σημαντικά στο πείραμα NP_1, παραμένοντας όμως ικανοποιητική. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων, παρατηρούμε ότι με τη μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα, διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες αμετάβλητες, το αποτέλεσμα δεν είναι το ίδιο ικανοποιητικό.

4.6 Έλεγχος Σταθερότητας της κρέμας

Ο έλεγχος σταθερότητας πραγματοποιήθηκε στην κρέμα μετά την προσθήκη των νανοσωματιδίων, αλλά και στην ίδια κρέμα χωρίς την προσθήκη των νανοσωματιδίων. Η βάση κρέμας που παρασκευάστηκε είναι ένα αποδεδειγμένα σταθερό προϊόν. Σκοπός του ελέγχου σταθερότητας που πραγματοποιήθηκε είναι η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο παραπάνω δειγμάτων, ώστε να διερευνηθεί κατά πόσο επηρεάζει η προσθήκη των νανοσωματιδίων ένα σταθερό γαλάκτωμα. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η παρατήρηση αντίστοιχης συμπεριφοράς των δύο εξεταζόμενων δειγμάτων με την πάροδο του χρόνου, στις διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.

Αρχικά χαρακτηριστικά της κρέμας

Αμέσως μετά την παρασκευή της κρέμας, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες μετρήσεις με σκοπό να προσδιοριστούν τα αρχικά χαρακτηριστικά της κρέμας, τόσο στο δείγμα με τη δραστική ουσία, όσο και σε δείγμα χωρίς αυτή. Τα αποτελέσματα των αρχικών μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.18.

Πίνακας 4.18: Αρχικά χαρακτηριστικά της κρέμας

Αρχικές Μετρήσεις	Χωρίς Νανοσωματίδια (BC)	Με νανοσωματίδια (BCA)
Οργανοληπτικές Μετρήσεις	Λευκή κρέμα, χαρακτηριστικό άρωμα	Λευκή κρέμα, χαρακτηριστικό άρωμα
pH	5.95	5.97
Ιξώδες (cP)	37250	35168

Επιπλέον, μετά τις φυγοκεντρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, κανένα δείγμα δεν παρουσίασε διαχωρισμό φάσεων. Παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο η δομή του πλέγματος του γαλακτώματος, και φάνηκε παρόμοια και στα δύο δείγματα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο γαλακτωμάτων παρατηρείται ότι η προσθήκη των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη τη δραστική ουσία, δεν άλλαξε τα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά του δείγματος. Η μεταβολή της τιμής του pH και του ιξώδους θεωρείται αμελητέα, 0.003% και 0.06% αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια μεταβολή της τάξης του 10% (max) θεωρείται αποδεκτή. Οπότε βάση αυτού μπορεί να θεωρηθεί ότι το pH και το ιξώδες δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά την ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων.

Κύκλοι Ψύξης-Απόψυξης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο έλεγχος σταθερότητας του προϊόντος, περιλαμβάνει τον κύκλο ψύξης-απόψυξης. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.19,4.20.

Πίνακας 4.19: Αποτελέσματα Κύκλου ψύξης-απόψυξης 5-45°C για την κρέμα χωρίς την προσθήκη NP's (FTC_BC)

Είδος Μέτρησης	Μέρα 7	Μέρα 15	Μέρα 21	Μέρα 29
Οπτική Αξιολόγηση	OK	OK, μισό τόνο πιο σκούρα	OK, μισό τόνο πιο σκούρα	OK, μισό τόνο πιο σκούρα
pH	5.97	5.98	5.97	5.81
Ιξώδες (cP)	55702	49621	48340	37830
Φυγοκέντρηση	OK	OK	OK	OK
Μικροσκόπιο	OK	OK	OK	OK

Πίνακας 4.20: Αποτελέσματα Κύκλου ψύξης-απόψυξης 5-45°C για την κρέμα μετά την προσθήκη NP's (FTC_BCA)

Είδος Μέτρησης	Μέρα 7	Μέρα 15	Μέρα 21	Μέρα 29
Οπτική Αξιολόγηση	OK	OK, μισό τόνο πιο σκούρα, παρουσία αέρα στη μάζα	OK, μισό τόνο πιο σκούρα, παρουσία αέρα στη μάζα	OK, παρουσία αέρα στη μάζα
pH	6.01	6.01	6.00	5.79
Ιξώδες (cP)	52617	48417	47924	36714
Φυγοκέντρηση	OK	OK	OK	OK
Μικροσκόπιο	OK	OK	OK	OK

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που φαίνονται στους παραπάνω πίνακες, παρατηρείται ότι με την προσθήκη των νανοσωματιδίων στην κρέμα, μεταβλήθηκαν ελαφρώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, μέσα σε αποδεκτά πλαίσια για ένα καλλυντικό προϊόν. Συγκεκριμένα, στη μάζα της κρέμας παρατηρήθηκαν κάποιες φυσαλίδες αέρα, οι οποίες δεν υπήρχαν όταν παρασκευάστηκε. Επιπλέον, το χρώμα σκουραίνει κατά μισό τόνο μετά από δύο και τρεις εβδομάδες αλλά δεν μεταβάλλεται επιπλέον την τελευταία εβδομάδα του κύκλου ψύξης-απόψυξης.

Το pH και το ιξώδες των δύο δειγμάτων μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο, με την πάροδο του χρόνου. Επομένως, θεωρείται ότι το pH και το ιξώδες δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη των νανοσωματιδίων.

Τα αποτελέσματα των φυγοκεντρήσεων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για να εντοπιστεί τυχόν διαχωρισμός των δύο φάσεων του γαλακτώματος, ήταν άκρως ικανοποιητικά. Κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στο πλέγμα του γαλακτώματος.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για 13 εβδομάδες σε κλιβάνους διαφορετικών θερμοκρασιών.

Πίνακας 4.21: Συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων σε κλιβάνους στο σκοτάδι

Δείγμα	T (°C)	Διάρκεια
BC_5, BCA_5	5	13 εβδομάδες
BC_25, BCA_25	25	13 εβδομάδες
BC_40, BCA_40	40	13 εβδομάδες

Τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας για τα δείγματα BC_5 και BCA_5 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.22.

Πίνακας 4.22: Αποτελέσματα ελέγχου σταθερότητας των δειγμάτων BC_25 και BCA_25 στους 25 °C

Είδος μέτρησης	BC_25			BCA_25		
	Μήνας 1	Μήνας 2	Μήνας 3	Μήνας 1	Μήνας 2	Μήνας 3
Οπτική αξιολόγηση	OK	OK	OK, παρουσία αέρα στη μάζα	OK	OK	OK, παρουσία αέρα στη μάζα
pH	-	-	5.86	-	-	5.86
Ιξώδες (cP)	-	-	35062	-	-	35062
Φυγοκέντρηση	-	-	OK	-	-	OK

Στα δείγματα BC_25 και BCA_25 για τους δύο πρώτους μήνες πραγματοποιήθηκε μόνο οπτική αξιολόγηση, κατά την οποία δεν διαπιστώθηκε κάποια μεταβολή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα του τρίτου μήνα είναι άκρως ικανοποιητικά καθώς δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων, τόσο στην τιμή του pH και του ιξώδους όσο και στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Τα αποτελέσματα για τα δείγματα κρέμας που αποθηκεύθηκαν στους 40 °C (BC_40, BCA_40), για τρεις μήνες βρίσκονται στον Πίνακα 4.23.

Πίνακας 4.23: Αποτελέσματα ελέγχου σταθερότητας των δειγμάτων BC_40 και BCA_40 στους 40 °C

Είδος μέτρησης	BC_40			BCA_40		
	Μήνας 1	Μήνας 2	Μήνας 3	Μήνας 1	Μήνας 2	Μήνας 3
Οπτική αξιολόγηση	OK, 1/2 τόνο πιο σκούρα	OK, 1/2 τόνο πιο σκούρα	OK, 1 τόνο πιο σκούρα	OK, 1 τόνο πιο σκούρα	OK, 1 τόνο πιο σκούρα	OK, 1 τόνο πιο σκούρα
pH	5.88	5.85	5.79	5.83	5.79	5.77
Ιξώδες (cP)	47650	37230	36099	45813	35024	34062
Φυγοκέντρηση	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο δειγμάτων, παρατηρείται ότι η μεταβολή της τιμής του pH δεν ξεπερνά το 0.01% και η αντίστοιχη μεταβολή του ιξώδους το 0.6%. Σε ό,τι αφορά την οπτική αξιολόγηση, το χρώμα του δείγματος BC_40 τους δύο πρώτους μήνες ήταν μισό τόνο πιο σκούρο από τον τόνο της προηγούμενης μέτρησης, ενώ του δείγματος BCA_40 ένα τόνο πιο σκούρο. Το χρώμα όμως και των δύο δειγμάτων κρίθηκε ικανοποιητικό. Επίσης, σε αυτές τις συνθήκες αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των φάσεων του γαλακτώματος μετά τις φυγοκεντρήσεις.

Για τα δείγματα, που αποθηκεύθηκαν για 13 εβδομάδες στους 5 °C, παρελήφθησαν μετρήσεις μόνο μετά τον τρίτο μήνα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το δείγμα με τη δραστική ουσία (BCA_5) και το δείγμα χωρίς την προσθήκη της δραστικής ουσίας(BC_5), παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.24.

Πίνακας 4.24: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων για τα δείγματα BC_5 και BCA_5, μετά τον τρίτο μήνα στους 5 °C

Είδος Μέτρησης	BC_5	BCA_5
Οπτική Αξιολόγηση	OK, φυσαλίδες αέρα	OK, φυσαλίδες αέρα
pH	5.86	5.88
Ιξώδες (cP)	37763	35062
Φυγοκέντρηση	OK	OK
Μικροσκόπιο	OK	OK

Όπως και στις υπόλοιπες συνθήκες αποθήκευσης, έτσι και στους 5 °C, φαίνεται η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων δεν επηρέασε καθόλου τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Τόσο η δομή του πλέγματος του γαλακτώματος όσο και η ομοιογένεια του γαλακτώματος δεν επηρεάστηκαν. Οι διαφορές στη μεταβολή της τιμής του pH και του ιζώδους θεωρούνται αμελητέες.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας του τελικού προϊόντος προκύπτουν τα εξής:

- Μετά από παρατήρηση του πλέγματος του γαλακτώματος στο μικροσκόπιο, προκύπτει ότι σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν σημειώθηκε διαφορά στη διασπορά της λιπαρής φάσης στην υδατική.
- Οι φάσεις του γαλακτώματος παραμένουν αναμεμιγμένες, σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης, αφού μετά τις φυγοκεντρήσεις δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των φάσεων σε κανένα δείγμα.
- Το pH όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν, θεωρείται σταθερό καθώς οι μεταβολές στην τιμή του ήταν αμελητέες.
- Το ιζώδες της κρέμας που περιέχει ενσωματωμένα τα νανοσωματίδια μεταβάλλεται ανάλογα με το ιζώδες της κρέμας που δεν περιέχει τα νανοσωματίδια.
- Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν οργανοληπτικά είχαν το χαρακτηριστικό άρωμα που είχε η κρέμα αμέσως μετά την παρασκευή της. Το χρώμα της κρέμας μετά από οποιοσδήποτε συνθήκες αποθήκευσης παρέμεινε λευκό, παρόλο που με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης όλα τα δείγματα απέκτησαν μισό έως ένα τόνο πιο σκούρο χρώμα.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και η μέθοδος του εγκλεισμού είναι γνωστή αρκετές δεκαετίες, τα τελευταία χρόνια διεξάγονται όλο και περισσότερες έρευνες πάνω στο αντικείμενο της μεθόδου αυτής. Αυτό συμβαίνει διότι ο εγκλεισμός ουσιών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική τόσο στον τομέα της φαρμακευτικής και της ιατρικής, όσο και στη βιομηχανία των καλλυντικών αλλά και των τροφίμων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της υδροξυτυροσόλης, ενός φυσικού αντιοξειδωτικού, με ιδιαίτερα έντονη δράση, σε νανοσωματίδια πολυγαλακτικού οξέος. Το αντιοξειδωτικό εγκλωβίστηκε με στόχο την βελτίωση της σταθερότητάς του κατά την ενσωμάτωσή του στην καλλυντική κρέμα που παρασκευάστηκε.

Αρχικά, το PLA υποβλήθηκε σε υδρολυτική διάσπαση και προέκυψαν τρία διαφορετικού μοριακού βάρους πολυμερή, εκ των οποίων επιλέχθηκε ένα ώστε να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα του εγκλεισμού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης και ακολούθησε ο εγκλεισμός της με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, η οποία είχε εφαρμοστεί σε προηγούμενη μελέτη εγκλεισμού στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ. Επιπλέον, στις εγκαταστάσεις εταιρείας καλλυντικών παρασκευάστηκε η βάση κρέμας, ενσωματώθηκαν τα νανοσωματίδια που περιείχαν τη δραστική ουσία και πραγματοποιήθηκε έλεγχος σταθερότητας στο προϊόν που παρασκευάστηκε.

Οι αντιδράσεις που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία για τη σύνθεση της υδροξυτυροσόλης, οδήγησαν στο σχηματισμό της ένωσης με επιτυχία.

Τα νανοσωματίδια που παρήχθησαν είχαν διάμετρο της τάξης των 500 nm, ενώ οι υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού που μετρήθηκαν, υποδηλώνουν σταθερές νανοσωματιδικές δομές. Η επανάληψη της μέτρησης για τον προσδιορισμό του μεγέθους έδειξε ότι τα νανοσωματίδια παραμένουν σταθερά μετά την πάροδο ενός μήνα σε συνθήκες συντήρησης, καθώς κανένα από τα μετρούμενα μεγέθη δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

Η μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα, φαίνεται να μην επηρέασε τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πριν γίνει αυτή η μετάβαση είναι απαραίτητο να εξασφαλιστεί ο κατάλληλος εξοπλισμός, ώστε να είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν τα πειράματα. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η ανάγκη για μεγάλες ποσότητες πρώτων υλών.

Η απόδοση του εγκλεισμού υπολογίστηκε 92.54% μειώθηκε όμως σε 72% κατά τη μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην αυξημένη πιθανότητα σφαλμάτων κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας εξοπλισμό κατάλληλο για εργαστηριακή κλίμακα.

Το τελικό προϊόν, δηλαδή η βάση κρέμας που περιέχει την αντιοξειδωτική υδροξυτυροσολή εγκλεισμένη στα πολυμερικά νανοσωματίδια, πέρασε με επιτυχία τον έλεγχο σταθερότητας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της βάσης της κρέμας και την κρέμα που περιέχει τα νανοσωματίδια, αποδεικνύεται η παρόμοια συμπεριφορά των δύο γαλακτωμάτων.

Η προσθήκη νανοσωματιδίων στα καλλυντικά προϊόντα μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την απόδοσή τους αλλά και να τα κάνει να ανταποκρίνονται ακόμα περισσότερο στις ανάγκες των καταναλωτών. Ο έλεγχος σταθερότητας απέδειξε ότι η κρέμα που περιέχει την εγκλεισμένη υδροξυτυροσολή, μπορεί να σταθεί ως προϊόν, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ενδιαφέρον για βιομηχανία των καλλυντικών.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η ανάπτυξη των νανοσωματιδιακών δομών χορήγησης βιοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη βιομηχανία των καλλυντικών αλλά και σε άλλους τομείς όπως αυτός των τροφίμων και της φαρμακευτικής. Είναι συνεπώς χρήσιμο να διευρυνθεί το φάσμα που ερευνήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Με άξονα τόσο τα πειράματα που διεξήχθησαν όσο τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρουσιάζονται οι εξής προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

1. Μελέτη των παραμέτρων της διεργασίας

Καθώς κατά την εκπόνηση των πειραμάτων δεν μεταβλήθηκαν οι παράμετροι του εγκλεισμού, ώστε να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, μια μελέτη των παραμέτρων αυτών θα παρουσίαζε μεγάλο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να μεταβληθεί το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το ποσοστό φόρτωσης (drug loading), η αναλογία υδατικής προς την οργανική φάση του γαλακτώματος, αλλά και η θερμοκρασία και ο ρυθμός ανάδευσης κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος.

2. Αποδέσμευση της εγκλεισμένης ένωσης

Η γνώση του μηχανισμού με τον οποίο η εγκλεισμένη ουσία αποδεσμεύεται από τα πολυμερικά νανοσωματίδια χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η μελέτη του εγκλεισμού. Απαραίτητη είναι η μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης της εγκλεισμένης υδροξυτυροσόλης.

3. Δυνατότητα μορφοποίησης των νανωσωματιδίων

Θα ήταν σκόπιμη η διερεύνηση της δυνατότητας μορφοποίησης των νανοσωματιδίων σε μορφή υμενίου (φιλμ) και ο έλεγχος σταθερότητας της δομής τους, για χρήση τους σε συσκευασίες καλλυντικών.

4. Χρήση άλλου πολυμερούς ή γαλακτωματοποιητή

Ενδεχομένως η χρήση άλλων υλικών στη διεργασία του εγκλεισμού να επηρέαζε τα χαρακτηριστικά. Θα μπορούσαν να επιλεχθούν διαφορετικές πρώτες ύλες, των οποίων η χρήση επιτρέπεται στα καλλυντικά προϊόντα.

5. Μελέτη των συνθηκών αποθήκευσης των νανοσωματιδίων

Τα αποτελέσματα της επαναληπτικής μέτρησης του μεγέθους που πραγματοποιήθηκε δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια παραμένουν σταθερά, για το διάστημα και τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Προτείνεται να πραγματοποιηθούν μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για μεγαλύτερο χρόνο αποθήκευσης και σε περισσότερες συνθήκες αποθήκευσης, ώστε να είναι πιο ολοκληρωμένη η μελέτη της σταθερότητας του μεγέθους των νανοσωματιδίων και να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα. Μεγάλη σημασία έχει η διερεύνηση των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα με την πάροδο του χρόνου.

Επιπλέον, με στόχο τη σταθερότερη συμπεριφορά τους κατά την αποθήκευση, θα ήταν σκόπιμο να λυοφιλοποιηθούν δείγματα νανοσωματιδίων και να μελετηθεί κατά πόσο η λυοφιλοποίηση επηρεάζει τα χαρακτηριστικά τους.

6. Προσθήκη άλλων μορφών υδροξυτυροσόλης σε βάση κρέμας

Θα ήταν ενδιαφέρουσα η προσθήκη μη εγκλεισμένης υδροξυτυροσόλης στην κρέμα, ώστε να εξεταστεί κατά πόσο η μέθοδος του εγκλεισμού βελτιώνει το τελικό προϊόν.

7. Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των νανοσωματιδίων που περιέχουν εγκλεισμένη την υδροξυτυροσόλη, της μη εγκλεισμένης συνθετικής υδροξυτυροσόλης και σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.

8. Άλλοι τρόποι παραλαβής της υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη προέρχεται είτε φυσικά από τα φύλλα και τον καρπό της ελιάς, είτε συνθετικά στο εργαστήριο. Παράλληλα όμως, η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται στα απόβλητα ελαιολιτριβείων. Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον, η ανάκτηση της υδροξυτυροσόλης τα απόβλητα ελαιολιτριβείου και η μελέτη του εγκλεισμού της σε πολυμερικά νανοσωματίδια.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelwahed W., Degobert G., Fessi H. (2006) Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 87–94.
- Abdelwahed W., Degobert G., Fessi H. (2006) A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization, *Int. J. Pharm.*, 17, 178–188.
- 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
- Attya M., Benabdelkamel H., Perri E., Russo A., Sindona G. (2010) Effects of Conventional Heating on the Stability of Major Olive Oil Phenolic Compounds by Tandem Mass Spectrometry and Isotope Dilution Assay, *Molecules*, 15, 8734-8746
- Auras R., Lim L.T., Selke S.E.M., Tsuji H. (2010). *Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processes and application*, Eds. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Auras R., Harte B., Selke S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials, *Macromol Biosci*, 4, 835-64.
- Auvoillain M., Cavé G., Fessi H., Devissaguet J.P., (1989) Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques, *STP Pharma*, 5, 738–744.
- Barry, B.W. (2002). Transdermal drug delivery, In: Aulton, M.E., Ed., *Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design*, Churchill Livingstone, London, Chap. 33.
- Becher P. (1965) In: *Emulsions: Theory and Practice*, 2nd ed., Reinhold, New York, 2
- Billany, M. (2002). Suspensions and emulsions, In: Aulton, M.E., Ed., *Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design*, 2nd ed., Churchill Livingstone, London, Chap. 23.
- Bodmeier R., Oh K.H., Chen H. (1989). Effect of the addition of low molecular weight poly(DL-lactide) on drug release from biodegradable poly(DL-lactide) drug delivery systems, *Int. J. Pharm.*, 51, 1–8
- Bodmeier R., McGinity J.W. (1988). Solvent selection in the preparation of poly(DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.*, 43, 179–186
- Bouaziz M., Feki I., Ayadi M., Jemai H., Sayadi S. (2010) Research Article: Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 894–905

- 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.
- Chien Y.W (1985) The use of biocompatible polymers in rate-controlled drug delivery systems. *Pharm. Tech.*, 50–66
- D'Angelo S., Manna C., Migliardi V., et al. 2001 Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, *Drug Metab Dispos*, 29,1492–1498.
- Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J. (1996) Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharm. Res.* 13 1838–1845.
- Desai M.P., Labhasetwar V., Walter E., Levy R.J., Amidon G.L. (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharm. Res.* 14.
- Drumright R., Gruber P., Henton D. (2000) Polylactic acid technology, *Adv Mater*, 12,1841-6.
- Fang Z., Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols-A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510–523.
- Finch A. C., Microencapsulation, in Elvers B., Hawkins S., Schulz G., "Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol. A16, 1990, VCH, Weinheim, pp.575-588
- Franks F. (1998) Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 45, 221–229.
- Gariboldi P., Jommi G., Verotta L. (1986). Secoiridoids from *Olea Europaea*, 25, 865–896.
- Garti, N., Aserin, A. (1996). Pharmaceutical emulsions double emulsions and microemulsions, In: Benita, S. Ed., *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York
- Greenwood R., Kendall K., (1999). *Journal of the European Ceramic Society* 19 (4), 479-488.
- Gilding D.K., Reed A.M. (1979) Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers:1, *Business Press, Polymer*, 20, 1459-1464.
- Granados-Principal S, Quiles J.L., Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M.C.(2010) Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials, *International Life Sciences Institute, Nutrition Reviews* Vol. 68(4), 191–206.
- Gurny R., Peppas N.A., Harrington D.D. ,Banker, G.S. (1981) *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 7, 1
- Hanaor D.A.H., Michelazzi M., Leonelli C., Sorrell C.C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*, 32 (1), 235-244.

- Hunter R.J. (1981) In: Zeta Potential in Colloid Science: principles and applications Academic Press, London.
- Izumikawa S, Yoshioka, Aso Y., Takeda Y. (1991). Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate J. Control. Release, 15, 133–140
- Jalil R, Nixon J.R. (1990) Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules : problems associated with preparative techniques and release properties, Journal of microencapsulation, 7(3), 297-325
- Jenkins. Polymer science: A materials science handbook Vol.1. Eds. Elsevier, New York. 1972
- Kalb B., Pennings A.J., (1980) General crystallization of poly(L-lactic acid), Business Press, Polymer, 21, 607-612.
- Kissel T., Maretschek S., Packhauser C., Schnieders J., Seidel N. (2005) Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry, in "Microencapsulation Methods and Industrial Applications, Second Edition", ed. Simon Benita, p. 99-118, CRC Press, Boca Raton, New York, USA
- Kulawik P., Özogul F., Glew R., Özogul Y. (2013) Significance of antioxidants for seafood safety and human health Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(3), 475-491
- Kumari A., Kumar Yadav S., Yadav SC. (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 75, 1–18.
- Lueder M. (2011) The Active Ingredients Mixture of Olives Provides Skin Whitening and Age Spot Reduction, Cosmetic Science Technology
- Lim L.-T., Auras R., Rubino M. (2008) Processing technologies for poly(lactic acid), Progress in Polymer Science, 33, 820-852.
- Maharana T., Maohanty B., Negi Y.S. (2009). Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability, Progress in Polymer Science, 34, pp99-124.
- Manna C., Migliardi V., Golino P., Scognamiglio A., Galletti P., Chiariello M., Zappia, V. (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. J. Nutr. Bioche, 15, 461–466.
- Metrohm manual. Ion analysis with Metrohm 716 DMS Titrino (2000) Metrohm Ltd. Switzerland.
- Mohanty K., Misra M, Drzal L.T. (2005) Natural fibers, biopolymers and biocomposites. Eds. Taylor & Francis Group, USA.
- Muller R.H., Jacobs C., Kayser O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. Adv. Drug Deliv. Rev. 47, 3–19.
- Musumeci T., Ventura C.A., Giannone I., Ruozi B., Montenegro L., Pignatello R. Puglisi G. (2006) Pharmaceutical Nanotechnology: PLA/PLGA nanoparticles for

sustained release of docetaxel, *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 172–179

- Narayanan J., Hayakawa Y., Fan J., Kirk K.L. (2003) Convenient synthesis of biogenic aldehydes, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde, *Bioorganic Chemistry*, 31, 191-197.
- Ney P. (1973) In: *Zetapotentiale und Flotierbarkeit*, Springer Wien-New York
- O'Donnell P., McGinity J. (1997) Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *USA Advanced Drug Delivery Reviews*, 28, 25–42
- Paiva-Martins F., Gordon M. (2002) Effects of pH and Ferric Ions on the Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Oil-in-Water Emulsions, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 6, 571-576
- Paiva-Martins F., Silva A., Almeida V., Carvalheira M., Serra C., Rodrigues-Borges J.E., Fernandes J., Belo L., Santos-Silva A. (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6636–6642
- Piersanti G., Retini M., Espartero J.L., Madrona A., Zappia G. (2011) An efficient, economical synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer–Villiger oxidation, *Tetrahedron Letters*, 52, 4938-4940.
- Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine*, 2 (1), 8-21
- Rasal R. M., Janorkar A.V., Hirt D.E. (2010) Poly(lactic acid) modifications, *Progr. Pol. Sci* 35(3), 338-356.
- Ren Zhong Xiao, Zhao Wu Zeng, Guang Lin Zhou, Jun Jie Wang, Fan Zhu Li, An Ming Wang (2010) Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles, *Dove Medical Press Ltd, International Journal of Nanomedicine*, 5, 1057–1065.
- Rietjens S.J., Bast A., & Haenen GRMM. (2007) New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7609–7614.
- Saeidlou S., Huneau M., Hongbo L., Park C. (2012) Poly(lactic acid) crystallization, *Progress in Polymer Science*, 37, 1657-1677
- Sansdrap P., Moes A.J. (1993) Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres *Int. J. Pharm.*, 98, 157–164.
- Sato T., Kanke M., Schroeder H.G., DeLuca P.P (1988) Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. Part 1. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques *Pharm. Res.*, 5, 21–30
- Sanders L.M., Kent J.S., McRae G.I., Vickery B.H., Tice T.R., Lewis D.H. (1984) Controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue from poly(DL)lactide-co-glycolide microspheres, *J. Pharm. Sci.*, 73, 1294–1297.
- Sawyer D.J., (2003) Bioprocessing – no longer a field of dreams, *Macromol Symp*, 201, 271-81.

- Sheraz M.A. (2009) Formulation and stability of ascorbic acid in liquid and semisolid preparations, Thesis, Baqai Medical University, Pakistan
- Soler-Rivas C., Espín J. C., Wichers H. J. (2000) Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1013–1023.
- Uchida T., Yoshida T., Ninomiya A., Goto S. (1995) Optimization of preparative conditions for polylactide (PLA) microspheres containing ovalbumin, *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 1569–1573.
- Vink T., Rabago K., Glassner D., Gruber P. (2003). Application of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production, *Polym Degrad Stab*, 80, 403-19
- Yang S., Paik S., Jong K., Lee K., Song C., Ko S. (2014) Dynamic light scattering-based method to determine primary particle size of iron oxide nanoparticles in simulated gastrointestinal fluid, *Food Chemistry*, 161, 185-191.
- Zafra-Gómez A., Luzon-Toro B., Capel-Cuevas S., Morales J.C. (2011) Stability of Hydroxytyrosol in Aqueous Solutions at Different Concentration, Temperature and with Different Ionic Content: A Study Using UPLC-MS, *Food and Nutrition Sciences*, 2, 1114-1120.
- Zeller B. L., Saleeb F. Z., Ludescher R. D. (1999) Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use on flavor encapsulation. *Trends Food Sci. Technol*, 9, 389–394.
- Zhizhen Z., Binghua X., Qi C., Lian X.Y. (2010) Synthesis and Biological Evaluation of Caffeic Acid 3,4-Dihydroxyphenyl Ester, *Journal of Natural Products*, 73, 2, 252-254.
- Βουγιούκα Σ. (2004) Αριστοποίηση Ιδιοτήτων Πολυαμιδικών Ρητινών με Τεχνολογία Πολυμερισμού Στερεάς Κατάστασης. Διδακτορική Διατριβή, Ε.Μ.Π., Αθήνα.
- Εργαστηριακός Οδηγός του μαθήματος «Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών Ι». Εκδ. ΕΜΠ, Αθήνα 2009
- Παππά Α, Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης, Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρία μάζας, Εκδ. ΕΜΠ, Αθήνα. 2004.
- Τσιρίβας Ε., Βαρβαρέσου Α., Παπαγεωργίου Σ. (2013) Βασικές Αρχές Κοσμητολογίας, Εκδ. Παρισιάνου, 38-54
- Φωτοπούλου Σ. (2007) Πολυμερικές γέλες ή γαλακτώματα για την επιβραδυνόμενη απελευθέρωση φαρμάκων: Μελέτη της επίδρασης της ενσωμάτωσης λιποσωμικών μορφών φαρμάκων στο ρυθμό απελευθέρωσης μορίων και στις ρεολογικές τους ιδιότητες.
- www.purac.com