ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Τομέας (Ι) Χημικών Επιστημών Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



# «Εγκλεισμός της φυσικής κουμαρίνης δαφνετίνης και συνθετικού αναλόγου της σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων»

Διπλωματική εργασία

Κυριακή Σαφαρή

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2020

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π κα. Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, αλλά κυρίως για την καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι πολύτιμες συμβουλές και η εμπιστοσύνη που υπέδειξε προς το πρόσωπό μου με έκαναν να αγαπήσω πολύ το αντικείμενο της μελέτης μου και να προσπαθήσω για το καλύτερο αποτέλεσμα.

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

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. Αννίτα Κατωπόδη, για την απεριόριστη στήριξή της καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Η επιστημονική της κατάρτιση, η βοήθεια της στην διαχείριση οποιαδήποτε προβλήματος κι αν αντιμετώπισα και κυρίως η προθυμία της συντέλεσαν καθοριστικά στην ομαλή διεξαγωγή της εργασίας και το άψογο και αρμονικό κλίμα συνεργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την διδάκτορα Ελένη Καβέτσου και την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την σημαντική βοήθεια τους.

Ακόμη, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την αρμονική συνεργασία, το πάντα ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθώς και το εξαιρετικό ομαδικό πνεύμα.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου καθώς το κοντινό μου φιλικό περιβάλλον, για την αγάπη, την στήριξη και την συμπαράσταση τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Εικόνα 1: Γραφική περίληψη

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια σημαντική οικογένεια φυσικών ή/και συνθετικών ετεροκυκλικών ενώσεων που ανήκει στις βενζοπυρόνες, ενώ απαντώνται σε πολλά είδη φυτών. Παρουσιάζουν ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως είναι η αντιμικροβιακή, η αντιμυκητιακή, η αντιφλεγμονώδης, η αντικαρκινική και η αντιοξειδωτική δράση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού φυσικών και συνθετικών κουμαρινικών παραγώγων, με αξιόλογη βιολογική δράση, σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων. Επιπλέον, στόχο αποτελεί ο καθορισμός του προφίλ απελευθέρωσης των βιοδραστικών μορίων από τα νανοσωματίδια καθώς και η ενσωμάτωση αυτών σε φαρμακευτικό σκεύασμα.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του φυσικού προϊόντος, 7,8διυδροξυ-κουμαρίνη (δαφνετίνη), και στη συνέχεια μέσω αντίδρασης τριών σταδίων συντέθηκε η 7,8- διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη. Η επιλογή των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχτηκε σε μόρια οδηγούς που έχουν παρασκευαστεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και έχουν παρουσιάσει αξιόλογη βιολογική δράση.



**Εικόνα 2**: Χημική δομή της **a**: δαφνετίνης και **b**: 7,8–διυδροξυ–3-(4-υδροξυφαινυλο)- 4μεθυλο-κουμαρίνης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός της δαφνετίνης (a) και της 7,8διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης (b) σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων. Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν εξετάζοντας διαφορετικές μεθόδους και αναλογίες, προκειμένου να επιτευχθούν τα βέλτιστα χαρακτηριστικά.

Ακολούθησε χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Ο εγκλεισμός της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης (b) σχηματίζει νανοσωματίδια με μέγεθος 230.7 nm και εξαιρετικά σταθερή διασπορά (-30.3 mV) με μέτρια προς καλή ομοιομορφία (PDI 0.385). Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων της δαφνετίνης (a) έχουν μέγεθος 256.2 nm, και επίσης εξαιρετικά σταθερή διασπορά (-41.3 mV) με μέτρια προς καλή ομοιομορφία (PDI 0.367). Ακόμη, αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος υπολογισμού της απόδοσης εγκλεισμού, η οποία βρέθηκε στο 43.4% για την 7,8-διυδροξυ-3-(4υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (b) και στο 80.5% για την δαφνετίνη(a).

Τα νανοσωματίδια αξιολογήθηκαν in vitro για την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία μάλιστα είναι ισχυρότερη των καθαρών ενώσεων. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκαν ως προς τη μορφολογία τους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), και ως προς την δομή τους μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR).

Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-3-(4υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης από τα νανοσωματίδια, τόσο υπό μορφή διασποράς όσο και υπό λυοφιλοποιημένη μορφή, σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές του δέρματος (37°C και pH 5.5). Στην περίπτωση των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων αρχικά εμφανίζεται "burst effect" στα πρώτα 30 λεπτά (περίπου 30% απελευθέρωση) ενώ στην περίπτωση της διασποράς παρατηρήθηκε βραδύτερη απελευθέρωση (εμφάνιση περίπου 28% απελευθέρωσης στην 1 h). Και στις δυο περιπτώσεις, η απελευθέρωση ολοκληρώθηκε στις 24 h, ενώ προέκυψε ότι το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει καλύτερα το προφίλ της απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Higuchi. Η τιμή του εκθέτη διάχυσης n όπως προέκυψε από την εξίσωση του ημι-εμπειρικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης και στις δύο περιπτώσεις τη διάχυση κατά Fick.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων σε κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή και συγκεκριμένα σε καλλυντικές κρέμες, οι οποίες αξιολογήθηκαν ως προς την σταθερότητά τους έπειτα από διατήρηση σε θερμοκρασίες 15°C και 40°C για 2 μήνες, καθώς και υποβολή σε κύκλους απότομης εναλλαγής θερμοκρασιών, εμφανίζοντας αυξημένη σταθερότητα.

**Επιστημονική περιοχή:** Φαρμακευτική Χημεία, Νανοεγκλεισμός, Παρασκευή Φαρμακευτικών Κρεμών

**Λέξεις κλειδιά:** κουμαρίνες, νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, αντιοξειδωτική δράση, απελευθέρωση

## ABSTRACT



Image 1: Graphical abstract

Coumarins represent an important family of natural and/or synthetic heterocyclic compounds, which belong to the benzopyrones. They possess a vast range of biological activities, including, but not limited to, antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activity.

The aim of the present diploma thesis is the encapsulation of natural and synthetic coumarin analogues, with potent biological activity, in solid lipid nanoparticles (SLNs), as well as the determination of the release profile of these compounds from the nanoparticles and their incorporation into a pharmaceutical cream.

For this purpose, two coumarin analogues were synthesized in satisfactory yields · 7,8-dihydroxy-coumarin or daphnetin, a natural analogue and 7,8-dihydroxy-3- (4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin, a synthetic analogue. The selection of the synthesized coumarin analogues was based on molecules previously prepared in the Laboratory of Organic Chemistry at the School of Chemical Engineering of the

National Technical University of Athens that have exhibited remarkable biological activity.



**Image 2**: Chemical structure of **a**: daphnetin and **b**: 7,8 – dihydroxy – 3-(4hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin

Furthermore, the encapsulation of daphnetin (a) and 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin (b) in solid lipid nanoparticles was accomplished. Preparation of the nanoparticles was achieved using various methods and weight ratios of the materials, in order to produce nanoparticles with the optimal characteristics.

The nanoparticles were evaluated for their size, polydispersity index and  $\zeta$ -potential by using the Dynamic Light Scattering method (DLS). SLNs of 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin (b) had a mean size of 230.7 nm and moderately good size distribution (PDI 0.385), while they also exhibited high stability (-30.3 Mv). SLNs of daphnetin (a) had a mean size of 256.2 nm and also exhibited moderately good size distribution (PDI 0.367), along with high stability (-41.3 mV). Furthermore, a suitable method for the determination of the encapsulation efficiency was developed, which was calculated as 43.4% for 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin and 80.5% for daphnetin.

The nanoparticles were evaluated *in vitro* for their DPPH free radical scavenging ability. As a result, it was found that they possess important antioxidant activity, higher than the pure compounds. Additionally, the nanoparticles were morphologically and structurally characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), respectively.

The release studies of 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin from the nanoparticles were performed, using both aqueous dispersed and lyophilized SLNs, in conditions simulating those of the human skin (37°C and pH 5.5), indicating a "burst effect" in the first 30 minutes (about 30% release) for the lyophilized nanoparticles, and a slower release (about 28% release in the first 2 h) for the dispersed nanoparticles. The kinetic modeling studies of the release revealed that the kinetic model best describing the release profile in both cases is

the Higuchi model, while the release exponent from the equation of the Korsmeyer – Peppas model indicates that the release mechanism is, in both cases, Fickian diffusion.

Finally, solid lipid nanoparticles were incorporated into a suitable pharmaceutical form, specifically in cosmetic creams, which were evaluated for their stability while in storage at 15°C and 40°C in the span of 2 months, and were also subjected to freeze-thaw cycle testing, showing considerable stability in both cases.

**Scientific area:** Medicinal Chemistry, Nanoencapsulation, Production of Pharmaceutical Creams

Keywords: coumarins, solid lipid nanoparticles, antioxidant activity, release

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ПЕРІЛНΨН	3
ABSTRACT	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1. Κουμαρίνες	13
1.1.1. Προέλευση κουμαρινών	13
1.1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών	14
1.1.3. Φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινών	17
1.2. Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων	23
1.2.1. Εισαγωγή	23
1.2.2. Δομικά στοιχεία	25
1.2.3. Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων	31
1.2.4. Μοντέλα ενσωμάτωσης βιοδραστικών ουσιών	36
1.2.5. Απελευθέρωση βιοδραστικών ουσιών	38
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	44
3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ	
ΑΝΑΛΟΓΩΝ	45
3.1. Σχεδιασμός κουμαρινικών αναλόγων	45
3.1.1. Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης	45
3.1.2. Σύνθεση της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-	
κουμαρίνης	45
3.1.3. Σύνθεση της 7,8–-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-	
κουμαρίνης	45
3.1.4. Σύνθεση της δαφνετίνης	46
3.2. Μηχανισμοί αντιδράσεων	46

3.2.1. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης	46
3.2.2. Μηχανισμός σύνθεσης της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλο	ιξυ-
4-μεθυλο-κουμαρίνης	48
3.2.3. Μηχανισμός σύνθεσης της δαφνετίνης	49
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
4.1.1. Όργανα και συσκευές	50
4.1.2. Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων	50
4.2. Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων	54
4.2.1. Υλικά	54
4.2.2. Συσκευές	54
4.2.3. Απομόνωση Τριμυριστίνης	55
4.2.4. Μέθοδοι Σχηματισμού Νανοσωματιδίων	56
4.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων	60
4.3.1. Απόδοση Διεργασίας Εγκλεισμού	60
4.3.2. Απόδοση Εγκλεισμού	60
4.3.3. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	61
4.3.4. Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασπορών	61
4.3.5. Μελέτη μορφολογίας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM	).62
4.3.6. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)	62
4.3.7. Μελέτη υγροσκοπικότητας	62
4.4. Μελέτη απελευθέρωσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα	
νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων	63
4.4.1. Μέθοδος Α	63
4.4.2. Μέθοδος Β	63
4.5. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων στερεών	
λιπιδίων	64
4.5.1. Υλικά και συσκευές	64

4.5.2. Πειραματική διαδικασία	64
4.6. Ενσωμάτωση νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων σε φαρμακοτεχνική	
μορφή	65
4.6.1. Υλικά	65
4.6.2 Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής (κρέμα)	65
4.6.3. Μελέτες σταθερότητας φαρμακοτεχνικής μορφής	67
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
5.1. Φασματοσκοπική μελέτη	69
5.2. Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού, Μέγεθος, δείκτης	
πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	76
5.2.1. Μέθοδος λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης (Thin Film Hydration	
technique)	76
5.2.2. Γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση του διαλύτη (emulsification and	L
solvent evaporation technique)	76
5.3. Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασπορών	83
5.3.1. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	83
5.3.2. Απόδοση εγκλεισμού	84
5.4. Μελέτη μορφολογίας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	85
5.4.1. Blank-SLNs	85
5.4.2. DHC-SLNs	86
5.5. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)	87
5.6. Μελέτη υγροσκοπικότητας	89
5.7. Μελέτη απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών από τα νανοσωματίδια	x 89
5.7.1. Μέθοδος Α	89
5.7.2. Μέθοδος Β	92
5.8. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων στερεών	
λιπιδίων	94
5.9. Μελέτες σταθερότητας φαρμακοτεχνικής μορφής	95

5.9.1. Μελέτη φυγοκέντρησης	
5.9.2. Μελέτη θερμοκρασίας	
5.9.3. Μελέτη κύκλου freeze-thaw	96
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	97
7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	110
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	114
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	114
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	116

# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### 1.1. Κουμαρίνες

#### 1.1.1. Προέλευση κουμαρινών

Τα φυτοχημικά είναι χημικές ενώσεις που απαντώνται φυσικά στο φυτικό βασίλειο. Ο όρος αυτός αναφέρεται γενικά σε αυτά τα χημικά που έχουν κάποια βιολογική σημασία, χωρίς απαραίτητα να αποτελούν θρεπτικά συστατικά. Έχουν βρεθεί περισσότερα από 4000 φυτοχημικά με ενδεχόμενη δράση κατά διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος αλλά και μεταβολικών ή εκφυλιστικών παθήσεων, τα σημαντικότερα των οποίων είναι τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και οι κουμαρίνες. Οι τελευταίες αντιπροσωπεύουν μια σημαντική οικογένεια φυσικών ή/και συνθετικών ετεροκυκλικών ενώσεων, με τυπική δομή βενζοπυρόνης. <sup>1</sup>

Οι κουμαρίνες ανακαλύφθηκαν αρχικά σε φυτά και οφείλουν την ονομασία τους στο φυτικό είδος **Coumarouna odorata**. Η πρώτη ένωση κουμαρίνης απομονώθηκε το 1820 από τους καρπούς (tonka bean) του φυτού **Dipteryx** odorata από τον Γερμανό A. Vogel ο οποίος αρχικά πίστευε πως είχε απομονώσει βενζοϊκό οξύ. Την ίδια χρονιά, ο Γάλλος N. J. B. G. Guibourt απομονώνοντας την ίδια ένωση συνειδητοποίησε πως αυτή δεν πρόκειται για βενζοϊκό οξύ, οπότε και έδωσε στην νέα ένωση το όνομα κουμαρίνη. Η πρώτη συνθετική κουμαρίνη συντέθηκε το 1868 από τον W. H. Perkin.<sup>2</sup>



Εικόνες 3, 4: Dipteryx odorata (tonka beans)

Περισσότερες από 1300 κουμαρίνες έχουν ταυτοποιηθεί ως δευτερογενείς μεταβολίτες σε περίπου 150 διαφορετικά είδη φυτών 30 διαφορετικών οικογενειών, όπως οι οικογένειες Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae και Apiaceae,<sup>3</sup> όπως επίσης σε μερικούς μικροοργανισμούς (βακτήρια και μύκητες) καθώς και σε σπόγγους.<sup>1</sup> Στα φυτά βρίσκονται κυρίως σε ελεύθερη μορφή ωστόσο μπορούν να βρεθούν και με την μορφή γλυκοζιτών. Απαντώνται στο μεγαλύτερο ποσοστό στους καρπούς και στα άνθη, ωστόσο διανέμονται σε όλα τα μέρη του φυτού επομένως μπορούν να βρεθούν και στο μεγαλύτερο.

Έχουν βρεθεί επίσης σε υψηλά επίπεδα και σε ορισμένα αιθέρια έλαια που προέρχονται από αυτά τα φυτά, όπως το λάδι κασίας, το λάδι από τον φλοιό της κανέλας και το λάδι λεβάντας. Η περιεχόμενη ποσότητα εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αυτό αναπτύσσεται. Ο ρόλος και η λειτουργικότητα των κουμαρινών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Έχει προταθεί ότι δρουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών, ως βακτηριοστατικά και μυκητοστατικά (δηλαδή προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων και των μυκήτων χωρίς τη θανάτωσή τους)<sup>3</sup>, ενώ η δράση τους ακόμα έχει συνδεθεί και με τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών κατά των φυτοφάγων ζώων, καθώς παρά το γλυκό τους άρωμα έχουν πικρή γεύση επομένως τείνουν να τα αποφύγουν ως τροφή. <sup>1</sup>

Χάρη στο ευχάριστο και έντονο άρωμα τους, οι κουμαρίνες βρήκαν πληθώρα χρήσεων στην βιομηχανία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνταν σαν πρόσθετες αρωματικές ενώσεις στα αρώματα, σαν βελτιωτικά στα αιθέρια έλαια, σαν πρόσθετα τροφίμων μαζί με την βανιλίνη και σαν βελτιωτικά γεύσης στον καπνό. Ωστόσο, η ανακάλυψη της ηπατοτοξικής τους δράσης και η κατάταξη τους, το 1954, ως Κατηγορίας 1 καρκινογόνα και ηπατοτοξικά από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ οδήγησε στην απαγόρευση της χρήσης τους ως πρόσθετα τροφίμων στις περισσότερες χώρες.<sup>2</sup> Έκτοτε και παρά το γεγονός αυτό, η ανακάλυψη ορισμένων ευεργετικών ιδιοτήτων τόσο των κουμαρινών όσο και των παράγωγων ενώσεων τους οδήγησε σε αυξημένο ενδιαφέρον για τις ιδιότητες τους και τις πιθανές τους χρήσεις. Πλέον επιτρέπεται η χρήση τους, υπό προϋποθέσεις και εντός επιτρεπτών ορίων, σε αρώματα και καλλυντικά, ενώ ορισμένα παράγωγα τους χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικά αρώματος σε καπνούς και αλκοολούχα ποτά. Ωστόσο, λόγω της απλότητας και της μοναδικότητας της κουμαρινικής δομής, δηλαδή της ετεροκυκλικής δομής παρουσία ετεροατόμων οξυγόνου, η πιο υποσχόμενη χρήση τους είναι στους τομείς της Οργανικής Χημείας και της Φαρμακευτικής Χημείας. Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η χρήση πολλών κουμαρινικών ενώσεων ως υποψήφιοι αντικαταστάτες φαρμάκων με ισχυρή φαρμακολογική δράση, χαμηλή τοξικότητα και παρενέργειες, μικρότερη αντίσταση στα φάρμακα και μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, προς αντιμετώπιση πολλών ασθενειών και παθήσεων, με την μεγαλύτερη έμφαση να έχει δοθεί στην ανάπτυξη κουμαρινικών αντιμικροβιακών, αντιθρομβωτικών, αντιοξειδωτικών, αντικαρκινικών, αναλγητικών, αντιεκφυλιστικών και αντιφλεγμονώδων παραγόντων. 1

Η κουμαρίνη έχει κατακτήσει κεντρικό ρόλο ως προνομιούχα δομή στο σχεδιασμό και στην ανακάλυψη νέων μορίων φαρμάκων, διαθέτοντας υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα ως προς πολλούς διαφορετικούς μοριακούς στόχους.<sup>4</sup>

#### 1.1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες συνιστούν μια μεγάλη τάξη φαινολικών παραγώγων με ανθρακικό σκελετό C3C6, και συγκεκριμένα μια τάξη γενικώς ακόρεστων λακτονών. Ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών, οι οποίες αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια ομάδα πυρόνης. Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται στις βενζο-α-πυρόνες, όπου ανήκουν και οι κουμαρίνες, και στις βενζο-γ-πυρόνες, όπου ανήκουν άλλες ομάδες όπως τα φλαβονοειδή. Οι κουμαρίνες, κατά IUPAC, ονομάζονται και 2*H*-Chromen-2-one ή 1,2-benzopyrone και η τυπική δομή τους είναι αυτή μίας βενζο-α- πυρόνης, δηλαδή μιας βενζοπυρόνης με α-πυρονικό δακτύλιο.<sup>1</sup>



Εικόνα 5: Χημική δομή α: βενζο-α-πυρονών και b: βενζο-γ-πυρονών

Πλην ελαχίστων εξαιρέσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν και την κουμαρίνη αυτή καθαυτή η οποία δεν είναι υποκατεστημένη, σχεδόν όλες οι φυσικές κουμαρίνες περιέχουν υδρόξυ ή μεθόξυ ομάδες υποκατεστημένες στη θέση 7. Οι υποκατεστημένες κουμαρίνες, όπως η σκοπολετίνη και η ουμπελιφερόνη, είναι συνήθεις στα ανεπτυγμένα φυτά και συχνά προκύπτουν ως γλυκοζίτες. Υποκατάσταση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε από τις 6 διαθέσιμες θέσεις. <sup>[3]</sup> Υπάρχουν πολλοί δυνατοί συνδυασμοί που μπορούν να προκύψουν από την υποκατάσταση και αυτό μπορεί να εξηγήσει τον μεγάλο αριθμό κουμαρινικών παραγώγων που προκύπτουν φυσικά. Ανάλογα με τις διαφορετικές πιθανές υποκαταστάσεις στον κουμαρινικό πυρήνα, οι κουμαρίνες κατατάσσονται σε τέσσερις υποκατηγορίες: <sup>5, 6</sup>

i. <u>Απλές κουμαρίνες</u>: η κατηγορία αυτή αποτελείται από την απλή κουμαρίνη, τα υδροξυ-, αλκυλο και αλκοξυ- υποκατεστημένα στον βενζολικό δακτύλιο παράγωγα της, όπως και τους γλυκοζίτες αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής είναι η 7-υδρόξυ- κουμαρίνη, ή αλλιώς ουμπελιφερόνη (umbelliferone).



Εικόνα 6: Χημική δομή ουμπελιφερόνης

 ii. <u>Φουρανοκουμαρίνες</u>: οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούνται από έναν πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με τον πυρήνα μιας κουμαρίνης. Ο φουρανικός δακτύλιος μπορεί να είναι συνδεδεμένος είτε γραμμικά (linear furanocoumarins) είτε υπό γωνία (angular furanocoumarins) με τον κουμαρινικό πυρήνα, στον οποίο μένουν δύο θέσεις ελεύθερες για υποκατάσταση. Τα δύο πιο γνωστά παράγωγα της κατηγορίας αυτής είναι τα μόρια του ψωραλενίου (linear) και της αγγελικίνης (angular).



Εικόνα 7: Χημική δομή α: ψωραλενίου και b: αγγελικίνης

iii. <u>Πυρανοκουμαρίνες</u>: οι πυρανοκουμαρίνες είναι δομικά παρόμοιες με τις φουρανοκουμαρίνες, με την διαφορά ότι αντί του πενταμελούς φουρανικού δακτυλίου διαθέτουν έναν εξαμελή πυρονικό δακτύλιο συνδεδεμένο με τον πυρήνα μιας κουμαρίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής είναι η σεσελίνη (seselin) και η ξανθυλετίνη (xanthyletine).



**Εικόνα 8**: Χημική δομή **a**: ξανθυλετίνης και **b**: σεσελίνης

iv. <u>Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο</u>: στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες στην 3- ή στην 4- ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου κουμαρίνες, όπως και οι 3,4- συμπυκνωμένες κουμαρίνες. Μια από τις πιο σημαντικές κουμαρίνες της κατηγορίας αυτής είναι η βαρφαρίνη (warfarin).



Εικόνα 9: Χημική δομή βαρφαρίνης

#### 1.1.3. Φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινών

Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους είναι βιολογικά και φαρμακευτικά ενεργές ενώσεις με ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων όπως αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές.<sup>7</sup>

#### 1.1.3.1. Αντιμικροβιακή δράση

Οι κουμαρίνες γενικά διαθέτουν ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση, η οποία επηρεάζεται από την φύση και την θέση των υποκαταστατών στον κουμαρινικό πυρήνα. Πράγματι, η δράση τόσο κατά των Gram-θετικών όσο και κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων ευνοείται παρουσία εστέρων και καρβοξυλικών οξέων, ενώ απαραίτητη κρίνεται η παρουσία ελεύθερου -ΟΗ στην θέση 7.8

Αντιβιοτικά με βάση τις κουμαρίνες, όπως τα novobiocin, clorobiocin και coumermycin, είναι ήδη γνωστά εδώ και περισσότερα από 40 χρόνια. Η χρήση τους όμως δεν κρίνεται επιτυχής, λόγω της μικρής διαλυτότητας τους στο νερό, της ανεπαρκούς βιοδιαθεσιμότητας τους, της μικρής δράσης τους κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων, της τοξικότητας και των παρενεργειών τους και της εμφάνισης στελεχών βακτηριών ανθεκτικών στις κουμαρίνες. Βρέθηκε, ωστόσο, ότι τα αντιβιοτικά αυτά είναι ισχυροί αναστολείς της βακτηριακής DNA γυράσης 2 και της τοποισομεράσης 4. Η DNA γυράση ανήκει σε μια τάξη ενζύμων γνωστών ως τοποισομεράσες και αποτελείται από δύο υπομονάδες Α και Β. Τα ένζυμα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση. Οι κουμαρίνες δρουν ως αναστολείς της υπομονάδας B, που συμμετέχει στην αρνητική υπερελίκωση (supercoiling) του DNA. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ικανοποιητική δράση τους κατά των Gram-θετικών βακτηρίων και κυρίως κατά στελεχών ανθεκτικών στην μεθικιλλίνη, έχει οδηγήσει στην προσπάθεια σχεδιασμού νέων αντιβιοτικών που να μιμούνται την δράση της νοβοβιοκίνης ως προς την αναστολή της βακτηριακής DNA γυράσης, διαθέτοντας όμως καλύτερο φαρμακευτικό προφίλ και ιδιότητες.<sup>9</sup>



Εικόνα 10: Χημική δομή Novobiocin και Clorobiocin

Σε έρευνά τους, ο Patrick Laurin και οι συνεργάτες του  $^9$  αντικατέστησαν την ακυλαμίνο-ομάδα της  $3^{\eta\varsigma}$  θέσης του κουμαρινικού δακτυλίου με ισοστερή. Οι

ακυλαμινο-πλευρικές αλυσίδες δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της γυράσης B, ενώ η υψηλή λιποφιλία τους πιθανώς ευθύνεται για την χαμηλή διαλυτότητα στο νερό αλλά και τις μη ενθαρρυντικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες των αντιβιοτικών αυτών. Πράγματι, η ισοστερής αντικατάσταση με ομάδες C(=O)R, C(=N-OR)R', COOR, CONHR και CONHOR οδήγησε σε εξαιρετικά ισχυρούς αναστολείς της γυράσης B με βελτιωμένη in vitro αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την νοβοβιοκίνη, ενώ εμφάνισαν ικανοποιητική δράση ακόμα και σε στελέχη ανθεκτικά στην νοβοβιοκίνη

Επίσης, σύμφωνα με την έρευνα του Laurent Schio και των συνεργατών του <sup>10</sup>, εξαιρετική ανασταλτική δράση επιδεικνύουν και τα ανάλογα νοβοβιοκίνης με υποκατεστήμενες αμινομάδες, ενώ η εισαγωγή τόσο διαλκυλο- όσο και αλκυλαμινό και αρυλο- υποκαταστατών στην 5,5' θέση της νοβοβιόζης, οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένη δράση τόσο in vitro όσο και in vivo.

#### 1.1.3.2. Αντιμυκητιακή δράση

Μεγάλος αριθμός κουμαρινών έχουν βρεθεί ότι διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση, με τις τρεις πιο δραστικές να είναι το ψωραλένιο, η ιμπερατορίνη και η οσθόλη. Η οσθόλη είναι μια βιοενεργή κουμαρίνη που απαντάται σε φαρμακευτικά φυτά, όπως το Cnidium monnieri (L.) Cusson της οικογένειας Umbelliferae που εντοπίζεται στην Κίνα, και χρησιμοποιείται ευρέως ως παραδοσιακό Κινέζικο φάρμακο για αρκετές ασθένειες. Εξάλλου, εμφανίζει δράση κατά σημαντικών παθογενών παραγόντων όπως τα Rhizoctonia solani, Phytophtora capsici, Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum, και Fusarium graminearum.<sup>11</sup>



Εικόνα 11: Χημική δομή a: Imperatorin και b: Osthole

Σε έρευνα τους <sup>11</sup> όπου μελέτησαν την αντιμυκητιακή δράση διαφόρων υποκατεστημένων αναλόγων της ουμπελιφερόνης και της εσκουλίνης, ο S. Sardari και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η ύπαρξη αρωματικής υδροξυλομάδας ή/και εστέρα ή αιθέρα στις θέσεις 6 και 7 είναι απαραίτητη για την αντιμυκητιακή δράση, ενώ και ότι τα αλκυλο-παράγωγα της 7- υδροξυκουμαρίνης επιδεικνύουν και αυτά αντιμυκητιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα, στα 6-7 δι-υποκατεστημένα παράγωγα βρέθηκε βελτίωση της δράσης στην περίπτωση της υποκατάστασης με αιθυλεστέρα, ενώ επιβεβαιώθηκε ότι απαιτείται η ύπαρξη ελευθέρου 6-OH για την εμφάνιση δράσης. Στα 6,7,8- τρι-υποκατεστημένα παράγωγα, βρέθηκε ραγδαία αύξηση της δράσης με υποκατάσταση της εσκουλετίνης στην θέση 8, με

μη πολικές ομάδες. Στην περίπτωση υποκατάστασης με πολικές ομάδες, η δράση μειώθηκε. Στις φουρανοκουμαρίνες όπου υποκαταστάτες ήταν μεγάλες πλευρικές αλυσίδες (20 άνθρακες), η δράση τους εμφανίστηκε βελτιωμένη σε σχέση με τις απλές φουρανοκουμαρίνες. Επίσης, στις αλκυλαμίνες, η εξαδεκυλαμίνη επιδεικνύει πολύ ισχυρή δράση, ιδιαίτερα κατά των Cryptococcus Saccharomyces. Τέλος, στις υποκατεστημένες και στη θέση 6 φουρανοκουμαρίνες, η υποκατάσταση αλκυλο- και αρυλο – ομάδων στην θέση 6 επέφερε, όπως ήταν αναμενόμενο, μείωση της αντιμυκητιακής δράσης και μάλιστα στο ίδιο επίπεδο. Παρόμοιο αποτέλεσμα επέφερε και η ακετυλίωση του 6-ΟΗ, όπως και η προσθήκη μεθόξυ- ομάδας στη θέση 5.

#### 1.1.3.3. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι μια φυσική και απαραίτητη αντίδραση σε οποιοδήποτε επιβλαβές ερέθισμα, και μπορεί να εμφανιστεί είτε τοπικά είτε πιο γενικά. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για συσσώρευση πρωτεϊνών που πραγματοποιείται καθώς λευκοκύτες και λοιπά περιεχόμενα του ορού του αίματος κατευθύνονται προς το σημείο του τραύματος. Στο δέρμα, η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από τοπικό κοκκίνισμα και πρήξιμο. Ο φλεγμονώδης μηχανισμός είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να παρέχει έναν γρήγορο μηχανισμό με τον οποίο ο ξενιστής αντιδρά στο ερέθισμα και επιστρέφει στην ομοιστατική ισορροπία. Υπέρογκη ή ανεπαρκής ενεργοποίηση του μηχανισμού μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις, όπως εξάλλου και η αποτυχία των μηχανισμών απενεργοποίησης του. Διάφορες χημικές δομές έχουν βρεθεί να επεμβαίνουν σε διάφορα 'μονοπάτια' του μηχανισμού αυτού. Την δεκαετία του 1970 βρέθηκε ότι η ασπιρίνη και άλλα μηστεροειδή αντι-φλεγμονώδη φάρμακα (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) λειτουργούν ως αναστολείς του ενζύμου της κυκλοξυγενάσης (COX) και έτσι εμποδίζουν την βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (PGs), οι οποίες συνεισφέρουν στη δημιουργία της φλεγμονής. 12

Οι κουμαρίνες επιδεικνύουν αντι-φλεγμονώδη δράση. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι βοηθούν στη μείωση οιδήματος που έχει προκληθεί λόγω θερμικού τραυματισμού σε τρωκτικά, ενώ είναι αποτελεσματικές και κατά άλλων λεμφοοιδημάτων. Η χορήγηση τους μαζί με άλλα αγγειοδραστικά φάρμακα φαίνεται να ενισχύει την δράση τους. Η δράση τους φαίνεται να σχετίζεται με την πρόσδεση τους στις πρωτείνες του πλάσματος η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τους μακροφάγους οργανισμούς και την πρωτεόλυση.<sup>13</sup> Πιο συγκεκριμένα, μεταφέρονται, προσδεμένα πάνω σε πρωτεΐνες, στην περιοχή του τραύματος μέσω αγγείων, όπου φαγοκυτώνονται από τους μακροφάγους οργανισμούς. Έτσι υπάρχει απομάκρυνση πρωτεϊνών και υγρού από τον τραυματισμένο ιστό. Μια άλλη πιθανή εξήγηση έγκειται στο ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων και η πρωτεόλυση προκύπτουν από την απελευθέρωση λυσοσομικών ενζύμων. Κατά την δημιουργία της φλεγμονής, οι φαγοκύτες παράγουν υπεροξειδικές ρίζες στο σημείο της φλεγμονής, και αυτό συνδέεται με άλλους οξειδωτικούς παράγοντες, όπως οι •ΟΗ. Απλές κουμαρίνες δοκιμάστηκαν σε τέτοια συστήματα προκειμένου να χαρακτηριστεί η αντιοξειδωτική τους δράση. Βρέθηκε ότι πολλές φαινολικές κουμαρίνες, όπως και πολλά υποκατεστημένα με υδροξύλιο παράγωγα (στις θέσεις 5,6 και 7) εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Επομένως, οι κουμαρίνες φαίνεται να επιδρούν στα μονοπάτια κυκλοοξυγενάσης και λιποοξυγενάσης.<sup>14</sup>

Πιο συγκεκριμένα, η εσκουλετίνη, η δαφνετίνη και η φραξετίνη έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί αναστολείς του μονοπατιού της λιποοξυγενάσης. Οι τρεις αυτές κουμαρίνες δοκιμάστηκαν σε ενεργοποιημένους με ιονοφόρα λευκοκύτες αρουραίων και βρέθηκε ότι καταστέλλουν επιλεκτικά το ένζυμο της λιποοξυγενάσης. Αντιθέτως, η 5,7- διυδρόξυ-4-μεθυλκουμαρίνη επέδειξε μεγάλη αναστολή σε σχέση με το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης. <sup>14</sup>



**Εικόνα 12:** Χημική δομή **a:** Esculetin, **b**: Daphnetin και **c**: Fraxetin

Επιπρόσθετα, σε μελέτη QSAR για την βελτιστοποίηση σχεδιασμού κουμαρινών ως ικανά μη-στεροειδή αντι-φλεγμονώδη φάρμακα, βρέθηκε ότι υποκαταστάσεις στις θέσεις 4 και 7 οδηγούν σε βελτίωση της δράσης, ενώ συντέθηκαν και νέες διαμινοαιθερικές κουμαρίνες με αυξημένη δράση. <sup>15</sup>

#### 1.1.3.4. Αντικαρκινική δράση

Ο μηχανισμός δράσης αντι-καρκινικών φαρμάκων έγκειται στην στόχευση των διαιρούμενων κυττάρων που διαταράσσουν την ομαλή κυτταρική διαίρεση. Παρότι θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία οδηγούν στα βέλτιστα αποτελέσματα, προκαλούν σημαντικές παρενέργειες. Οι κουμαρίνες έχουν βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικές όχι μόνο στην αντιμετώπιση του καρκίνου, αλλά και στην αντιμετώπιση των παρενεργειών της ραδιοθεραπείας. Η αντικαρκινική δράση τους οφείλεται κυρίως στις αντιπηκτικές και κυτταροτοξικές τους ικανότητες Χρησιμοποιούνται κυρίως στην θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και της λευχαιμίας, ενώ έχουν εμφανίσει ικανοποιητική δράση και κατά του μελανωμάτων και της εξάπλωσης των όγκων.<sup>13</sup>

Σύμφωνα με έρευνα<sup>16</sup> όπου εξετάστηκε μια σειρά νέων αλκοξυκουμαρινικών αναλόγων ως προς την κυτταροτοξικότητα τους έναντι των MCF7 και MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, παρατηρήθηκε ότι τόσο η παρουσία δύο πρενυλόξυ- ομάδων όσο και η παρουσία ενός οκτυλοξυ- υποκαταστάτη συνεισφέρουν στην αύξηση της κυτταροτοξικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων έναντι των καρκικινών κυττάρων, όχι όμως και έναντι υγιών ινοβλαστών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ανάλογα αυτά μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων.

Επίσης, σε έρευνα τους<sup>17</sup> όπου μελέτησαν την κυτταροτοξική δράση μιας σειράς νέων 3-αρυλο-5-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου νευροβλαστώματος, SK-N-SH, και αδενοκαρκινώματος, HeLa, η Ε. Kavetsou και οι συνεργάτες της βρήκαν ότι από τους διαφορετικούς υποκαταστάτες στην θέση 5 του κουμαρινικού δακτυλίου, η ακετυλοξυ- ομάδα οδήγησε στους πιο ικανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, με ικανότερους αυτούς που παρουσίαζαν επίσης βρωμουποκαταστάτη στον φαινολικό δακτύλιο. Συνεπώς η παρουσία των υποκαταστατών αυτών μπορεί να θεωρηθεί ως βασικό χαρακτηριστικό στον μελλοντικό σχεδιασμό και ανάπτυξη θεραπευτικών αντικαρκινικών παραγόντων.



Εικόνα 13: Χημική δομή 5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμο-φαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης

Έρευνες<sup>18</sup> που έχουν γίνει σχετικά με την κυτταροτοξικότητα των κουμαρινών έναντι καρκινικών κυττάρων έδειξαν ότι, όσον αφορά τον καρκίνο των πνευμόνων GLC4 και τον καρκίνο του εντέρου COLO 320, η κυτταροτοξικότητα οφείλεται στην παρουσία τουλάχιστον δύο φαινολικών ομάδων στις θέσεις 6,7- ή 6,8- του δακτυλίου. Επιπρόσθετα, η ταχεία εξάπλωση των 786-0 και A-498 (καρκίνος του εντέρου) και των DU145 και LNCaP (καρκίνος του προστάτη) φαίνεται να αναστέλλεται από την κουμαρίνη και την ουμπελιφερόνη.<sup>19</sup> Από την αξιολόγηση περαιτέρω υδροξυ-υποκατεστημένων κουμαρινών προέκυψε ότι η κυτταροτοξικότητα των 6,7- δι-υδροξυ-κουμαρινών βελτιώνεται με υποκατάσταση των ομάδων -OH στις θέσεις 3- ή/και 4-.<sup>20</sup> Σε παρόμοιο συμπέρασμα έφτασε και η ερευνητική ομάδα του Budzisz<sup>21</sup>, με βάση τους οποίους η κυτταροτοξικότητα αυξάνεται με την προσθήκη υδροφοβικών υποκαταστατών στις θέσεις 2-,3- και 4-.

#### 1.1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση

Η γήρανση του δέρματος αποδίδεται σε τόσο σε εγγενείς (χρονική γήρανση) όσο και σε εξωγενείς (φωτογήρανση) παράγοντες. Οι εγγενείς παράγοντες αντιστοιχούν σε αναντίστρεπτες φυσιολογικές διαδικασίες, ενώ οι εξωγενείς παρουσιάζονται ως επιπτώσεις του περιβάλλοντος. Ο κύριος

περιβαλλοντικός παράγων είναι η αθροιστική έκθεση στην ακτινοβολία UV του ήλιου, η οποία οδηγεί στην δημιουργία ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Οι ελεύθερες ρίζες και οι ROS είναι εξαιρετικά δραστικοί μεταβολίτες του οξυγόνου ( $0\sim$ , OH-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), και παράγονται φυσικά από της οξείδωση των λιπαρών οξέων, τον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ενώσεων, την διέγερση της φαγοκυττάρωσης από παθογόνους μικροοργανισμούς ή λιποπολυσακχαρίτες και από ένζυμα των ιστών. Προκαλούν οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, μεταλλάξεις στο DNA καθώς και βλάβες στις πρωτεΐνες. Υπό κανονικές συνθήκες, οι ελεύθερες ρίζες και οι ROS απομακρύνονται από τα κύτταρα μέσω της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της γλουταθειονικής περοξειδάσης, που αποτελούν ενζυματικό μηγανισμό αντίδρασης, αλλά και μέσω της δράσης μη-ενζυματικών αντιοξειδωτικών όπως οι βιταμίνες και τα φλαβονοειδή. Ωστόσο, η ισορροπία μεταξύ των ριζών και των αμυντικών μηχανισμών μπορεί να διαταραχθεί από ασυνήθιστες συνθήκες, όπως η υπέρμετρη έκθεση σε UV ακτινοβολία, το κάπνισμα και το στρες.

Οι κουμαρίνες αποτελούν φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην παρουσία συζυγών διπλών δεσμών και ενός εστερικού δεσμού, που δρούν ως ισχυροί και σταθεροί δότες πρωτονίων. Επιπρόσθετα, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και ο αριθμός των ομάδων -ΟΗ. Η πλειονότητα των κουμαρινών διαθέτει μια ομάδα -ΟΗ στη θέση C-7. Σύμφωνα με την έρευνα του Bum-Chun Lee και των συνεργατών του, οι οποίοι μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση διαφόρων κουμαρινών προερχόμενων από το *Fraxius chinensis*, βρέθηκε ότι οι κουμαρίνες που διαθέτουν λιγότερες από δύο ομάδες -ΟΗ, όπως η κουμαρίνη αυτή καθαυτή και η ουμπελιφερόνη, δεν επέδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, καθώς και ότι η αντικατάσταση της ομάδας -ΟΗ με μεθοξυ- ομάδα πρακτικά εξάλειψε την δράση αυτή. Αντίθετα η εσκουλετίνη, που διαθέτει δύο ομάδες -ΟΗ, διαθέτει εξαιρετικά καλή αντιοξειδωτική δράση.<sup>22</sup>

Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και με βάση έρευνα<sup>23</sup> της Μ. Roussaki, στην οποία κουμαρινικά ανάλογα που περιείχαν κατεχολικό σύστημα εμφάνισαν ικανότερη αντιοξειδωτική δράση (>76%) σε σχέση με τα μεθοξυανάλογα τους.

Παρόμοιο συμπέρασμα προέκυψε και από έρευνα του Η. Lin και των συνεργατών του<sup>24</sup>, οι οποίοι μελέτησαν τόσο την αντιοξειδωτική δράση 8 διαφορετικών κουμαρινών όσο και την ικανότητα πρόσδεσης τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ξανθινοξειδάση (XO). Η ξανθινοξειδάση είναι ένα ένζυμο που παίζει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό των πουρινών καταλύοντας την οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ στους νεφρούς και στο ήπαρ, παράγοντας ελεύθερες ρίζες και αυξάνοντας τα οξειδωτικά επίπεδα των οργανισμών. Αυξημένα επίπεδα της σχετίζονται με την ουρική αρθρίτιδα καθώς και με λοιπές οξειδωτικές βλάβες στους ιστούς. Βρέθηκε ότι τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση όσο και δέσμευση του ενεργού κέντρου του ενζύμου διαθέτουν η εσκουλετίνη και η 4-μεθυλεσκουλετίνη, που ήταν οι μόνες κουμαρίνες από όσες δοκιμάστηκαν που διέθεταν δύο ομάδες -ΟΗ στη δομή τους, με τις υπόλοιπες να διαθέτουν είναι μια είτε καμία. Χαρακτηριστικό δε είναι ότι η σκοπολετίνη, με δομή παρόμοια της εσκουλετίνης με μόνη διαφορά την παρουσία μεθοξυ-ομάδας αντί ομάδας -OH στην θέση 6, δεν εμφάνισε πρακτικά καθόλου δράση.



Εικόνα 14: Χημική δομή σκοπολετίνης

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται περαιτέρω και με βάση έρευνα<sup>25</sup> κατά την οποία βρέθηκε ότι κουμαρινικά ανάλογα που δεν περιείχαν φαινολικές ομάδες -ΟΗ αλλά περιείχαν ογκώδεις υποκαταστάτες όπως γερανυλο- και φαρσενυλοομάδες, δεν παρουσίασαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση.

#### 1.2. Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

#### 1.2.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο εμφανές ότι η ανάπτυξη νέων βιοδραστικών μορίων και μόνο δεν επαρκεί για την εξασφάλιση προόδου στον τομέα των φαρμακευτικών αγωγών. Περισσότερο από το 75% των νέων υποψήφιων φαρμάκων παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, γεγονός που παρεμποδίζει την ανάπτυξη τους σε εμπορικά φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς λόγω της υδροφοβικότητας τους αυτής παρουσιάζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και είναι επιρρεπή σε καταβύθιση. Πιθανές στρατηγικές για την υπερπήδηση αυτών των εμποδίων είναι η δομική τροποποίηση των φαρμάκων ή η ενσωμάτωσή τους σε κατάλληλα συστήματα φορέων. <sup>26</sup> Έτσι, η in *vivo* μοίρα του φαρμάκου δεν καθορίζεται πλέον από τις ιδιότητες του φαρμάκου αυτού καθαυτού, αλλά από αυτές του φορέα, οι οποίες πρέπει να διασφαλίζουν την ελεγχόμενη και τοπική απελευθέρωση του φαρμάκου, ανάλογα με τις συγκεκριμένες ανάγκες της αγωγής.<sup>27</sup> Τέτοια συστήματα φορέων αποτελούν τα λιπιδικά συστήματα. <sup>26</sup> Τα συστήματα αυτά αναπτύχθηκαν, λόγω της ευκολίας στην επεξεργασία τους αλλά και λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών, ως εναλλακτικοί φορείς έναντι φορέων όπως τα γαλακτώματα και τα πολυμερικά κολλοειδή συστήματα, τα οποία εμφανίζουν σοβαρά μειονεκτήματα όπως μικρό ποσοστό φόρτωσης, αστάθεια αλλά και χρήση τοξικών συστατικών. 28

Ένα πολλά υποσχόμενο λιπιδικό σύστημα φορέα, το οποίο συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των γαλακτωμάτων και των πολυμερικών νανοσωματιδίων χωρίς όμως να υιοθετεί και τα μειονεκτήματα τους, είναι τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (solid lipid nanoparticles, SLNs).<sup>27</sup> Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (solid lipid nanoparticles, SLNs).<sup>27</sup> Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων αποτελούν μια τάξη κολλοειδών σωματιδίων αποτελούμενων από λιπίδια που παραμένουν στερεά τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και στη θερμοκρασία του σώματος.<sup>29</sup> Αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές του 1990 από τις ερευνητικές ομάδες των Muller<sup>30,31</sup>, Gasco<sup>32</sup> και Westesen<sup>33</sup>, οι οποίοι αξιοποίησαν το γεγονός ότι η χρήση στερεών λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει

σε ελεγχόμενη αποδέσμευση των βιοδραστικών ουσιών που εγκλείονται σε αυτά, καθώς η κινητικότητα τους σε αυτά είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα υγρά λιπίδια.

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων εμφανίζουν πληθώρα χαρακτηριστικών που τα καθιστούν ιδανικούς φορείς βιοδραστικών ενώσεων, με κυριότερα το μεγάλο ποσοστό φόρτωσης αλλά και την ικανότητα εγκλεισμού τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων μορίων. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματική μεταφορά ουσιών με πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό και μάλιστα σε διάφορες οδούς χορήγησης. Πράγματι, έχει μελετηθεί επιτυχώς τόσο η χρήση τους για την παρεντερική μεταφορά διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων<sup>34</sup>, όσο και η χορήγηση τους διαμέσου της ρινικής<sup>35</sup> και της οφθαλμικής<sup>36</sup> κοιλότητας. Η αξιοποίηση τους για την στοματική χορήγηση φαρμάκων οδηγεί στην αποφυγή του φαινομένου 'first-pass' κατά την απορρόφηση τους<sup>37</sup>, ενώ λόγω της μικρής τους τοξικότητας τους είναι κατάλληλα και για πνευμονικές εφαρμογές.<sup>38</sup> Τέλος, η χρήση τους σε προϊόντα δερματικής χορήγησης βελτιώνει την διείσδυση της βιοδραστικής ουσίας στο δέρμα.<sup>39</sup>

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα πλεονεκτήματα της χρήσης νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων ως φορείς σε συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών, καθώς και οι προοπτικές που προκύπτουν από αυτά:

	Πλεονεκτήματα	Προοπτικές
	Προστασία βιοδραστικής ουσίας από χημική και ενζυματική αποδόμηση	Διευρυμένο φάσμα πιθανών οδών χορήγησης
	Φυσική σταθερότητα	Αυξημένη σταθερότητα φαρμάκου στην φαρμακοτεχνική μορφή
	Ικανότητα εγκλεισμού υδρόφιλων και λιπόφιλων ουσιών	Ευελιξία εφαρμογής ως φορείς φαρμάκων
	Δυνατότητα scale-up παραγωγής	Δυνατότητα βιομηχανικής παραγωγής
Τεχνολογικά	Ευκολία παρασκευής	Δυνατότητα low-cost παραγωγής σε εργαστήρια
	Ικανότητα εγκλεισμού	Δυνατότητα
	δύο ουσιών ταυτόχρονα	συνδυασμένης αγωγής
Υψηλή απόδοση εγκλεισμού Ευκολία αποστείρωσης	Υψηλή απόδοση εγκλεισμού	Ελαχιστοποίηση χορηγούμενης δόσης φαρμακοτεχνικής μορφής
		Καταλληλόλητα για παρεντερική χορήγηση
	Μικρά μεγέθη και μικρές κατανομές μεγέθους	Βελτιωμένη ικανότητα μεταφοράς

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα και προοπτικές νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

	Βιοαποδόμηση λιπιδίων	Ικανότητα ελεγχόμενης και σταδιακής αποδέσμευσης
	Ικανότητα site-specific	Στοχευμένη δράση
	στόχευσης	φαρμάκου και αγωγής
Βιολογικά	Αύξηση	Ελαχιστοποίηση
	βιοδιαθεσιμότητας	χορηγούμενης δόσης
	βιοδραστικής ουσίας	φαρμακοτεχνικής μορφής
	Μειωμένη τοξικότητα	Ασφάλεια ασθενών
	Επιτυχής διαπέραση	Διευρυμένο φάσμα
	βιολογικών φραγμών	πιθανών οδών χορήγησης

### 1.2.2. Δομικά στοιχεία

Τα συστατικά των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, πέραν της βιοδραστικής ουσίας που εγκλείεται, περιλαμβάνουν στερεά λιπίδια, επιφανειοδραστικούς παράγοντες, και νερό.

### 1.2.2.1. Λιπίδια

Τα λιπίδια, με τον όρο να χρησιμοποιείται σε ευρύτερη έννοια και να περιλαμβάνει τριγλυκερίδια, γλυκερίδια, λιπαρά οξέα, στεροειδή, κεριά αλλά και φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια,<sup>27</sup> αποτελούν το κυριότερο δομικό συστατικό των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, συνιστώντας την μήτρα τους. Κύριο χαρακτηριστικό των λιπιδίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των νανοσωματιδίων είναι η ιδιότητα τους να παραμένουν στερεά τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και σε θερμοκρασία σώματος, ενώ τα περισσότερα από αυτά είναι εγκεκριμένα ως generally-recognised-as-safe (GRAS) αλλά και αποδεκτά από την ανθρώπινη φυσιολογία.<sup>40</sup>

Ως βασικό συστατικό τους, τα λιπίδια επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων, και συγκεκριμένα την σταθερότητα τους, την ικανότητα φόρτωσης των βιοδραστικών ουσιών σε αυτά αλλά και την ικανότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης των βιοδραστικών ουσιών από αυτά, επομένως η επιλογή του κατάλληλου λιπιδίου είναι ζωτικής σημασίας για την παρασκευή των νανοσωματιδίων. Οι κυριότεροι παράγοντες στους οποίους βασίζεται η επιλογή του κατάλληλου λιπιδίου είναι: <sup>40</sup>

i. Η διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας στο λιπίδιο. Η ιδιότητα αυτή είναι κρίσιμης σημασίας καθώς επηρεάζει ευθέως την ικανότητα φόρτωσης και την απόδοση εγκλεισμού της βιοδραστικής ουσίας στο λιπίδιο, και κατ' επέκταση την δυνατότητα αξιοποίησης των νανοσωματιδίων. Νανοσωματίδια με υψηλό ποσοστό φόρτωσης παρασκευάζονται, όταν η διαλυτότητα της ουσίας στο λιπίδιο είναι υψηλή. Η διαλυτότητα μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως UV-Vis και χρωματογραφικές τεχνικές.

- ii. Ο μερισμός της βιοδραστικής ουσίας μεταξύ της λιπιδικής και της υδατικής φάσης. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ουσίας με το λιπίδιο και με την υδατική φάση και, όπως και στην περίπτωση της διαλυτότητας, επηρεάζει την ικανότητα φόρτωσης και την απόδοση εγκλεισμού της βιοδραστικής ουσίας στο λιπίδιο. Νανοσωματίδια με υψηλό ποσοστό φόρτωσης παρασκευάζονται, όταν ο συντελεστής μερισμού της ουσίας στο λιπίδιο είναι υψηλός.
- iii. Ο πολυμορφισμός των λιπιδίων. Ο πολυμορφισμός αποτελεί χαρακτηριστική φυσική ιδιότητα των λιπιδίων και αφορά την ύπαρξη σε αυτά πολλαπλών κρυσταλλικών δομών (φάσεις). Η παρουσία πολλαπλών κρυσταλλικών φάσεων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δομικών ατελειών στην δομή του λιπιδίου, όπου μπορούν να φιλοξενηθούν τα μόρια της βιοδραστικής ουσίας. Επομένως, λιπίδια με μεγαλύτερη τάση για πολυμορφισμό παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα φόρτωσης της ουσίας.

Οι πολυμορφικές δομές, ωστόσο, είναι θερμοδυναμικά ασταθείς και τείνουν να μετατραπούν σε πιο σταθερές δομές, χωρίς την ύπαρξη ατελειών. Το γεγονός αυτό θέτει σημαντικό πρόβλημα όσον αφορά την ικανότητα φόρτωσης της βιοδραστικής ουσίας, καθώς η σταδιακή εξαφάνιση των ατελειών οδηγεί τελικά σε αποβολή της. Η επιλογή του λιπιδίου, επομένως, επηρεάζεται και από τον ρυθμό μετατροπής των ασταθών δομών σε πιο σταθερές.

Γενικά, λιπίδια με μεγαλύτερες αλυσίδες λιπαρών οξέων εμφανίζουν μεγαλύτερη αταξία στο κρυσταλλικό τους πλέγμα, αλλά και χαμηλότερους ρυθμούς μετατροπής σε πιο σταθερές δομές.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα λιπίδια στην παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων:

Λιπίδια	Παραδείγματα
Λιπαρά Οξέα	Δωδεκανοικό οξύ
	Μυριστικό οξύ
	Παλμιτικό οξύ
Μονογλυκερίδια	Μονοστεατικός εστέρας της
	γλυκερίνης
	Υδροξυστεατικός εστέρας της
	γλυκερίνης
Τριγλυκερίδια	Τριμυριστίνη
	Τριστεαρίνη
	Τριπαλμιτίνη
Κεριά	Καρναουβικό κερί
	Μελισσοκέρι

**Πίνακας 2**: Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα λιπίδια στην παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

### Τριμυριστίνη

Η τριμυριστίνη είναι ένας τριεστέρας, που αποτελεί το τριγλυκερίδιο του μυριστικού οξέος. Αποτελείται, δηλαδή, από τρία μόρια μυριστικού οξέος, ενωμένα με ένα μόριο γλυκερόλης μέσω εστερικών δεσμών. Η τριμυριστίνη είναι ένα άσπρο στερεό, αδιάλυτο στο νερό αλλά διαλυτό στην αιθανόλη, το χλωροφόρμιο και το διχλωρομεθάνιο. Είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα λιπίδια στην παραγωγή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, κυρίως λόγω της ευκολίας απομόνωσης του, η οποία πραγματοποιείται από το μοσχοκάρυδο. Η τριμυριστίνη χρησιμοποιείται ως λιπαντικό ή και συντηρητικό σε φαρμακευτικά και βρώσιμα σκευάσματα (π.χ. φαρμακευτικά δισκία, ζαχαρωτά κ.ά.), ως φορέας δραστικών φαρμακευτικών ενώσεων (λιπιδικά νανοσωματίδια) και ως ενυδατικός παράγοντας σε καλλυντικά σκευάσματα.



Εικόνα 15: Χημική δομή τριμυριστίνης



Εικόνα 16: Τριμυριστίνη

#### 1.2.2.2. Επιφανειοδραστικοί παράγοντες

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες αποτελούν το δεύτερο δομικό συστατικό των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων. Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι αμφίφιλα μόρια, αποτελούνται δηλαδή από μια υδρόφιλη (πολική) και μια λιπόφιλη (μη πολική) ομάδα, και είναι υπεύθυνοι για την διασπορά της λιπιδικής φάσης εντός της υδατικής. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκεντρώνονται στην διεπιφάνεια μεταξύ των δύο αυτών φάσεων και δρουν μειώνοντας την μεταξύ τους επιφανειακή τάση, σχηματίζοντας ουσιαστικά ένα στρώμα γύρω από τα νανοσωματίδια, εξασφαλίζοντας έτσι τόσο την δημιουργία όσο και την σταθερότητα της υδατικής διασποράς.

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το φορτίο τους: στους ιονικούς, τους μη-ιονικούς και τους αμφοτερικούς παράγοντες. Οι ιονικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην ηλεκτροστατική σταθερότητα, ενώ οι μη ιονικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην στερική σταθερότητα. Οι αμφοτερικοί παράγοντες διαθέτουν μια θετικά και μια αρνητικά φορτισμένη ομάδα και έτσι μπορούν να επιδείξουν συμπεριφορά τόσο κατιονικού, σε χαμηλό pH, όσο και ανιονικού, σε υψηλό pH, παράγοντα. Η επιλογή του κατάλληλου επιφανειοδραστικού παράγοντα εξαρτάται από:<sup>40</sup>

- i. Την επιθυμητή οδό χορήγησης. Για παράδειγμα, οι μη ιονικοί παράγοντες προτιμώνται για στοματική, οφθαλμική και παρεντερική χορήγηση, καθώς είναι λιγότερο τοξικοί και προκαλούν λιγότερο ερεθισμό, σε σχέση με τους ιονικούς παράγοντες. Γενικά, μεταξύ των ιονικών παραγόντων, οι κατιονικοί είναι επιδεικνύουν μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με τους ανιονικούς ή τους αμφοτερικούς.
- ii. Την τιμή HLB (hydrophilic-lipophilic balance) του παράγοντα. Η τιμή αυτή εκφράζει την ισορροπία μεταξύ των λιπόφιλων και υδρόφιλων ομάδων του επιφανειοδραστικού παράγοντα, είναι δηλαδή ενδεικτική του υδρόφιλου ή λιπόφιλου χαρακτήρα του. Όταν η τιμή HLB του επιφανειοδραστικού είναι μεγαλύτερη του 10, τότε σημαίνει ότι υπερτερεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας ενώ όταν η τιμή HLB είναι μικρότερη του 10, τότε σημαίνει ότι υπερτερεί ο λιπόφιλος χαρακτήρας.
- iii. Την επίδραση τους στην βιοαποδόμηση του λιπιδίου. Έχει βρεθεί ότι οι μη ιονικοί παράγοντες περιορίζουν την in vivo αποδόμηση της λιπιδικής μήτρας, ενώ αντιθέτως οι ιονικοί παράγοντες εμφανίζουν μικρή επίδραση σε αυτήν.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί στην παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων:

Είδος επιφανειοδραστικού παράγοντα	Παραδείγματα
Μη ιονικοί	Polysorbate 20/Tween® 20
	Polysorbate 60/Tween® 60
	Polysorbate 80/Tween® 80
	Poloxamer® 188
	Poloxamer® 40
Ιονικοί	Sodium cholate
	Sodium glycocholate
	Sodium taurocholate

**Πίνακας 3**: Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες στην παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

Αμφοτερικοί	Λεκιθίνη σόγιας
	Λεκιθίνη αυγού
	Φωσφατιδυλοχολίνη σόγιας
	Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού

#### Tween 80

To Polysorbate 80 (Tween 80) είναι ένας συνθετικός, υδρόφιλος, μη ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας με τιμή HLB 15. Χρησιμοποιείται συχνά ως σταθεροποιητής και γαλακτωματοποιητής, για την σταθεροποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων, ενώ η χρήση του προτιμάται λόγω της αυξημένης βιοσυμβατότητας που παρουσιάζει έναντι άλλων επιφανειοδραστικών παραγόντων του είδους του.

To Tween 80 είναι ένα ιξώδες, διαλυτό στο νερό, κίτρινο υγρό, που προέρχεται από το ολεϊκό οξύ. Οι υδρόφιλες ομάδες του είναι πολυαιθέρες, γνωστές ως πολυοξυαιθυλενο-ομάδες, που αποτελούν πολυμερή του οξειδίου του αιθυλενίου.



Εικόνα 17: Χημική δομή Tween 80



**Εικόνα 18**: Tween 80

### Φωσφατιδυλοχολίνη

Οι φωσφατιδυλοχολίνες αποτελούν μια τάξη φωσφολιπιδίων, κύρια ομάδα των οποίων είναι η χολίνη. Αποτελούν κύριο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών, και μπορούν εύκολα να απομονωθούν από φυσικές πηγές, όπως ο κρόκος των αυγών και η σόγια, είτε μηχανικά είτε χημικά. Η δομή τους χαρακτηρίζεται από μια ομάδα χολίνης, ένα γλυκεροφωσφορικό οξύ και από έναν συνδυασμό λιπαρών οξέων, που συνήθως αφορά ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ και ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ.

Η L-α-φωσφατιδυλοχολίνη χρησιμοποιείται ως αμφοτερικός σταθεροποιητής και γαλακτωματοποιητής στην παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, ενώ η δράση της έγκειται στον σχηματισμό πολλαπλών διπλών στρωμάτων (bilayers) γύρω από την επιφάνεια τους. Η χρήση της ως συνεπιφανειοδραστικού παράγοντα, δηλαδή σε συνδυασμό με έναν ακόμα παράγοντα, οδηγεί σε πιο ομοιογενείς διασπορές, με μικρότερη τάση συσσωμάτωσης των σωματιδίων.



Εικόνα 19: Χημική δομή L-α-φωσφατιδυλοχολίνης



Εικόνα 20: L-α-φωσφατιδυλοχολίνη

### 1.2.3. Μέθοδοι παρασκευής νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

### 1.2.3.1. Ομογενοποίηση υψηλών στροφών

Η ομογενοποίηση υψηλών στροφών αποτελεί μια απλή και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παρασκευή υδατικών διασπορών. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει θέρμανση του λιπιδίου σε θερμοκρασία 5-10 °C υψηλότερη από το σημείο τήξης του και προσθήκη της βιοδραατικής ένωσης στο λιπιδικό τήγμα που σχηματίζεται. Στη συνέχεια το μίγμα αυτό διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, το οποίο έχει προηγουμένως θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία, και ακολουθεί ομογενοποίηση σε υψηλές στροφές (περίπου 5.000-25.000 rpm) προς σχηματισμό γαλακτώματος. Το γαλάκτωμα έπειτα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων του γαλακτώματος, και κατ' επέκταση των νανοσωματιδίων που πρόκειται να σχηματιστούν. Σταδιακή ψύξη του γαλακτώματος οδηγεί στον σχηματισμό των στερεών νανοσωματιδίων.

Παρά την απλότητα της μεθόδου αυτής, οι ιδιότητες των τελικών προϊόντων είναι συνήθως μη επαρκείς ενώ εντοπίζονται και σωματίδια της τάξης των μικρομέτρων. Η χρήση υψηλότερων στροφών μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερα μεγέθη μόνο μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή, λόγω εμφάνισης φαινομένων συνένωσης των σωματιδίων, ενώ λόγω των ανεπαρκών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων, η μέθοδος αυτή προτιμάται να χρησιμοποιείται όχι ως τελική μέθοδος παρασκευής αλλά ως στάδιο προ-ομογενοποίησης, για την μέθοδο ομογενοποίησης υψηλής πίεσης.<sup>27</sup>



Εικόνα 21: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο ομογενοποίησης υψηλών στροφών

### 1.2.3.2. Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μια από τις πρώτες τεχνικές που αξιοποιήθηκαν για την παραγωγή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, ενώ λόγω του χαμηλού κόστους της αλλά και της ευκολίας της για scale-up παραγωγή, είναι και η τεχνική που προτιμάται στην βιομηχανία. Κατά την μέθοδο αυτή, το υγρό μίγμα των νανοσωματιδίων περνά, υπό μεγάλη πίεση, διαμέσου ενός στενού περάσματος. Τόσο η μεγάλη πίεση (100-2000 bar) όσο και το μικρό μέγεθος του περάσματος (εύρος μερικών μικρομέτρων) έχουν ως αποτέλεσμα αφενός την επιτάχυνση του υγρού, το οποίο διασχίζει πολύ μικρή απόσταση με πολύ μεγάλη ταχύτητα (άνω των 1000 km/h) και αφετέρου την πτώση πίεσης αυτού. Έτσι αναπτύσσονται υψηλές διατμητικές τάσεις και δυνάμεις σπηλαίωσης, οι οποίες διαταράσσουν τις σταγόνες στο υγρό και άρα επηρεάζουν τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων. <sup>27</sup> Υπάρχουν δύο είδη ομογενοποίησης υψηλής πίεσης:

### Θερμή ομογενοποίηση

Η θερμή ομογενοποίηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες άνω του σημείου τήξεως του λιπιδίου, και επομένως μπορεί να θεωρηθεί ως ομογενοποίηση του γαλακτώματος. Στη μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται τήξη του λιπιδίου και προσθήκη σε αυτού της βιοδραστικής ουσίας. Το λιπιδικό τήγμα διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχει προηγουμένως θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία, υπό την εφαρμογή έντονης ανάδευσης. Στη συνέχεια το παραγόμενο προ-γαλάκτωμα οδηγείται σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης, για 3-5 κύκλους και σε πίεση 500-1500 bar, προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των σταγονιδίων του και κατ' επέκταση των νανοσωματιδίων που πρόκειται να σχηματιστούν. Το τελικό νανο-γαλάκτωμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου (ή και χαμηλότερη), ώστε οι υγρές νανο-σταγόνες να στερεοποιηθούν και να σχηματιστούν τα νανοσωματίδια.

Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων είναι η αναλογία επιφανειοδραστικού-λιπιδίου, η εφαρμοζόμενη πίεση και ο χρόνος ομογενοποίησης. Το μέσο μέγεθος νανοσωματιδίων που παράγονται με αυτή την μέθοδο είναι 50-400 nm. Επειδή η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες, ενώ δεν είναι κατάλληλη ούτε για υδρόφιλες ουσίες.<sup>26</sup>



Εικόνα 22: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο θερμής ομογενοποίησης

### Κρύα ομογενοποίηση

Η κρύα ομογενοποίηση περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των λιπιδίων σε στερεή μορφή, έναντι υγρής μορφής στην θερμή ομογενοποίηση. Στη μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται τήξη του λιπιδίου ύστερα από θέρμανση του σε θερμοκρασία

ανώτερη της θερμοκρασίας τήξης του, και προσθήκη σε αυτού της βιοδραστικής ουσίας. Το μίγμα αυτό στη συνέχεια ψύχεται ταχέως προς στερεοποίηση, με την βοήθεια υγρού αζώτου ή ξηρού πάγου. Η ταχεία ψύξη είναι απαραίτητη για την ομοιογενή κατανομή της βιοδραστικής ουσίας στην λιπιδική μήτρα. Το στερεό, πλέον, μίγμα κατεργάζεται σε μύλο προς σχηματισμό σωματιδίων μεγέθους 50-100 nm, και η παραγόμενη λιπιδική σκόνη διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, σχηματίζοντας έτσι ένα προ-γαλάκτωμα. Το προ-γαλάκτωμα οδηγείται σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης και στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου (ή και χαμηλότερη).

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων που παράγονται με την μέθοδο αυτή εμφανίζουν ελαφρώς αυξημένο μέγεθος σε σχέση με αυτά που παράγονται από την θερμή ομογενοποίηση, χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες πίεσης και κύκλων, καθώς τα σωματίδια του προ-γαλακτώματος είναι πιο συμπαγή και άρα πιο δύσκολο να διασπαστούν σε μικρότερα. Λόγω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα, η τεχνική αυτή είναι επιθυμητή για βιοδραστικές ουσίες που παρουσιάζουν θερμοευαισθησία ή που, σε υψηλές θερμοκρασίες, τείνουν να διανέμονται στην υγρή φάση. Επομένως, είναι κατάλληλη τόσο για λιπόφιλες όσο και για υδρόφιλες ουσίες.<sup>26</sup>



Εικόνα 23: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο θερμής ομογενοποίησης

#### 1.2.3.3. Μέθοδος μικρογαλακτώματος

Τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά, ισοτροπικά μίγματα αποτελούμενα από μια υδατική και μια ελαιώδη φάση, σταθεροποιούμενα από έναν επιφανειοδραστικό παράγοντα. Κατά την μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται τήξη του λιπιδίου και προσθήκη σε αυτού της βιοδραστικής ουσίας. Το λιπιδικό τήγμα διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχει προηγουμένως θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία, υπό την εφαρμογή έντονης ανάδευσης, σχηματίζοντας έτσι ένα μικρογαλάκτωμα. Το μικρογαλάκτωμα στη συνέχεια διασπείρεται, υπό ανάδευση, σε κρύο νερό (2-4 °C), προς ψύξη του γαλακτώματος και σχηματισμό των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων.

Συνήθως, η αναλογία γαλακτώματος-υδατικής φάσης είναι 1:25 ή 1:50, ενώ τα νανοσωματίδια που παράγονται με αυτή την μέθοδο έχουν σφαιρικό σχήμα και μικρή κατανομή μεγέθους. Η μέθοδος αυτή, ωστόσο, παρουσιάζει δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Η προσθήκη της ψυχρής υδατικής φάσης σε αναλογίες 1:25 ή 1:50 οδηγεί σε μεγάλη αραίωση του τελικής διασποράς, επομένως είναι απαραίτητη η απομάκρυνση μεγάλων ποσοτήτων νερού, προκειμένου αυτή να συμπυκνωθεί, ενώ η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων των επιφανειοδραστικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα τοξικότητας.<sup>26</sup>



Εικόνα 24: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο μικρογαλακτώματος

#### Μέθοδος μικρογαλακτώματος με μικροκύματα

Η μέθοδος μικρογαλακτώματος μπορεί να τροποποιηθεί με την χρήση μικροκυμάτων. Στη μέθοδο αυτή, όλα τα συστατικά (λιπίδιο, βιοδραστική ουσία, επιφανειοδραστικός παράγοντας) θερμαίνονται με την χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, υπό ανάδευση. Σε αντίθεση με την συμβατική μέθοδο μικρογαλακτώματος, όλα τα συστατικά θερμαίνονται στο ίδιο σκεύος. Στη συνέχεια το παραγόμενο μικρογαλάκτωμα διασπείρεται, υπό ανάδευση, σε κρύο νερό (2-4 °C), προς ψύξη του γαλακτώματος και σχηματισμό των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων.<sup>40</sup>



Εικόνα 25: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο μικρογαλακτώματος με μικροκύματα

### 1.2.3.4. Μέθοδος διπλού γαλακτώματος

Η μέθοδος διπλού γαλακτώματος αναπτύχθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η ενσωμάτωση υδρόφιλων βιοδραστικών ουσιών στην εσωτερική υδατική φάση ενός water-in-oil-in-water γαλακτώματος, με την βοήθεια ενός σταθεροποιητή προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια της εξωτερικής υδατικής φάσης. Κατά την μέθοδο αυτή, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα της υδρόφιλης βιοδραστικής ουσίας και προστίθεται στο τηγμένο λιπίδιο, προς σχηματισμό ενός water-in-oil γαλακτώματος, το οποίο σταθεροποιείται με κατάλληλους σταθεροποιητές. Στη συνέχεια, το w/o γαλάκτωμα διασπείρεται σε δεύτερη υδατική φάση, που είναι το υδατικό διάλυμα ενός υδρόφιλου επιφανειοδραστικού παράγοντα, και υπό συνεχή ανάδευση προκύπτει το διπλό w/o/w γαλάκτωμα. Η μέθοδος αυτή οδηγεί στον σχηματισμό νανοσωματιδίων με σχετικά μεγάλο μέγεθος, αλλά επιτρέπει την επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωματιδίων.<sup>40</sup>



Εικόνα 26: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο διπλού γαλακτώματος

#### 1.2.3.5. Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη

Η τεχνική γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων, που βασίζεται στην παρασκευή oil-in-water γαλακτωμάτων. Κατά την μέθοδο αυτή, το λιπίδιο διαλύεται υπό θέρμανση σε έναν οργανικό, μη αναμείξιμο με το νερό, διαλύτη, οπότε και γίνεται προσθήκη της βιοδραστικής ουσίας. Στη συνέχεια η οργανική φάση διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχει προηγουμένως θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία, υπό την εφαρμογή έντονης ανάδευσης, προς σχηματισμό γαλακτώματος. Ακολουθεί ήπια εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, είτε με την εφαρμογή χαμηλής πίεσης είτε με ήπια ανάδευση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων.

Τα νανοσωματίδια που παράγονται με αυτή την μέθοδο παρουσιάζουν πολύ μικρά μεγέθη και μικρή κατανομή μεγέθους. Κύριο μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής αποτελεί η χρήση οργανικών διαλυτών. <sup>26</sup>


**Εικόνα 27**: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ανάδευσης

## 1.2.3.6. Μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης

Η μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης αποτελεί μια συνήθη μέθοδο παρασκευής νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων σε εργαστηριακή κλίμακα. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την διάλυση του λιπιδίου και της βιοδραστικής ένωσης σε έναν οργανικό διαλύτη, ή ένα μίγμα οργανικών διαλυτών. Στη συνέχεια οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται υπό ελαττωμένη πίεση, σχηματίζοντας ένα λεπτό φιλμ. Το φιλμ ξηραίνεται και ακολουθεί ενυδάτωση με χρήση θερμού υδατικού διαλύματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Κύριο μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής αποτελεί η χρήση οργανικών διαλυτών. <sup>41</sup>





## 1.2.4. Μοντέλα ενσωμάτωσης βιοδραστικών ουσιών

Η κατανομή της βιοδραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων αποτελεί μια σημαντική παράμετρο που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την δράση τους. Η γνώση της ακριβής τοποθεσίας της βιοδραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια παρέχει πληροφορίες τόσο για την ποσότητα αυτής που πράγματι έχει εγκλειστεί σε αυτά όσο και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι πληροφορίες αυτές είναι θεμελιώδους σημασίας για τον προσδιορισμό της σταθερότητας, του προφίλ απελευθέρωσης αλλά και της *in vivo* συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων.<sup>28</sup> Έχουν προταθεί τρία μοντέλα ενσωμάτωσης των βιοδραστικών ουσιών στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, τα οποία παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 29: Μοντέλα ενσωμάτωσης βιοδραστικών ουσιών. a) Μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος, b) Μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος, c) Μοντέλο ομοιογενούς μήτρας

## 1.2.4.1. Μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος (Drug-enriched shell)

Στο μοντέλο αυτό, η βιοδραστική ουσία συγκεντρώνεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, σχηματίζοντας ένα περίβλημα που 'εσωκλείει' τον λιπιδικό πυρήνα. Η μορφολογία αυτή εξηγείται βάση του μηχανισμού κρυστάλλωσης των λιπιδίων κατά το στάδιο παρασκευής και το στάδιο ψύξης. Κατά την παρασκευή των νανοσωματιδίων, όπου επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες, κάθε σταγόνα αποτελεί μείγμα τηγμένου λιπιδίου και ουσίας. Εάν το λιπίδιο παρουσιάζει υψηλή θερμοκρασία τήξης και κρυστάλλωσης, τότε κατά την ταχεία ψύξη που ακολουθεί, η θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται γρήγορα με αποτέλεσμα το λιπίδιο να αρχίζει να κρυσταλλώνεται πριν την βιοδραστική ουσία. Έτσι, στο νανοσωματίδιο σχηματίζεται σταδιακά στερεός πυρήνας λιπιδίου, ενώ ταυτόχρονα η ουσία συγκεντρώνεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίου, η οποία βρίσκεται ακόμα σε υγρή κατάσταση.<sup>40</sup>

Ένας άλλος παράγοντας που έχει βρεθεί ότι επιδρά στην διανομή της ουσίας στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι η διαλυτότητα αυτής στο υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Κατά την παρασκευή των νανοσωματιδίων, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που αναπτύσσεται, η διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας στην υδατική φάση αυξάνεται και έτσι η ουσία μεταφέρεται μερικώς από την λιπιδική φάση στην υδατική. Ωστόσο, κατά την ταχεία ψύξη που ακολουθεί, η διαλυτότητα μειώνεται, με αποτέλεσμα η ουσία να αναδιανέμεται προς την λιπιδική φάση. Έχοντας ήδη ξεκινήσει ο σχηματισμός του στερεού λιπιδικού πυρήνα, η ουσία συγκεντρώνεται τελικά στην επιφάνεια αυτού που παραμένει ακόμα σε υγρή κατάσταση. <sup>42</sup>

Το μοντέλο αυτό είναι κατάλληλο για την ενσωμάτωση φαρμάκων που χρήζουν ταχείας απελευθέρωσης (burst release). Τέτοια ταχεία απελευθέρωση είναι επιθυμητή στην περίπτωση δερματολογικών σκευασμάτων. <sup>42</sup>

## 1.2.4.2. Μοντέλο εμπλουτισμένης μήτρας (Drug-enriched core)

Το μοντέλο αυτό επιτυγχάνεται όταν ο μηχανισμός κρυστάλλωσης είναι ο ακριβώς αντίθετος από αυτόν που περιεγράφηκε στο μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος, δηλαδή όταν η βιοδραστική ουσία τείνει να κρυσταλλώνεται πριν το λιπίδιο. Κατά την παρασκευή των νανοσωματιδίων, η ουσία βρίσκεται διαλυμένη στο τήγμα του λιπίδιου κοντά στην κατάσταση κορεσμού της. Η ταχεία ψύξη που ακολουθεί οδηγεί σε υπερκορεσμό της ουσίας στο τήγμα με αποτέλεσμα την κρυστάλλωση αυτής, προς σχηματισμό του πυρήνα του νανοσωματιδίου. Περαιτέρω ψύξη οδηγεί στην κρυστάλλωση και του λιπιδίου, το οποίο σχηματίζει έτσι περίβλημα γύρω από τον σχηματισμένο πυρήνα της ουσίας.

Το μοντέλο αυτό είναι κατάλληλο για φάρμακα που χρήζουν παρατεταμένης απελευθέρωσης, που διέπεται από τον νόμο διάχυσης του Fick. 43

## 1.2.4.3. Μοντέλο ομοιογενούς μήτρας (homogenous matrix)

Στο μοντέλο αυτό, η βιοδραστική ουσία βρίσκεται ομοιογενώς διεσπαρμένη εντός της λιπιδικής μήτρας, και παρουσιάζει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με αυτήν. Το μοντέλο αυτό αναπτύσσεται κυρίως όταν ως μέθοδος παρασκευής χρησιμοποιείται η μέθοδος κρύας ομογενοποίησης, οπότε και η εφαρμογή υψηλών πιέσεων σε συνδυασμό με την χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί στον σχηματισμό της ομοιογενούς μήτρας λόγω μηχανικής ανάδευσης. Ωστόσο, αναπτύσσεται και σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται η μέθοδος θερμής ομογενοποίησης, όταν οι ουσίες που ενσωματώνονται είναι ιδιαίτερα λιπόφιλες και έχουν υψηλή θερμοκρασία κρυστάλλωσης. Σε αυτή την περίπτωση, κατά την ταχεία ψύξη των σταγόνων, που αποτελούν μείγμα τηγμένου λιπιδίου και ουσίας, δεν πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων μεταξύ της ουσίας και του λιπιδίου, επομένως η κρυστάλλωση και των δύο πραγματοποιείται πρακτικά ταυτόχρονα και σχηματίζεται ομοιογενής μήτρα, ενώ για αυτόν τον λόγο δεν απαιτείται και η προσθήκη επιφανειοδραστικού παράγοντα.<sup>40</sup>

Το μοντέλο αυτό είναι κατάλληλο για φάρμακα που χρήζουν παρατεταμένης απελευθέρωσης. 42

## 1.2.5. Απελευθέρωση βιοδραστικών ουσιών

Απώτερος σκοπός του εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων είναι η στοχευμένη και ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας από αυτά, ενώ για τη δημιουργία ελεγχόμενων συστημάτων απελευθέρωσης με προκαθορισμένα προφίλ απελευθέρωσης είναι απαραίτητη η γνώση των μηχανισμών μεταφοράς μάζας που συμμετέχουν στην απελευθέρωση καθώς και η πρόβλεψη της κινητικής της απελευθέρωσης.

## 1.2.5.1. Παράγοντες που επιδρούν στην απελευθέρωση

Η απελευθέρωση της βιοδραστικής ουσίας από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων εξαρτάται από παράγοντες όπως: <sup>28</sup>

- Η θερμοκρασία του μέσου απελευθέρωσης
- Το ποσοστό φόρτωσης της ουσίας στα νανοσωματίδια
- Το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων
- Η κρυσταλλική διάταξη της ουσίας και του λιπιδίου στα νανοσωματίδια
- Η χρήση και η φύση των επιφανειοδραστικών παραγόντων
- Η κατανομή της ουσίας στα νανοσωματίδια και
- Η μέθοδος παραγωγής

Μεταξύ αυτών, πιο σημαντικούς παράγοντες αποτελούν η μέθοδος παραγωγής, που σχετίζεται άμεσα τόσο με το μέγεθος των νανοσωματιδίων όσο και με την κατανομή της ουσίας σε αυτά, η θερμοκρασία αλλά και η παρουσία και η φύση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.<sup>26</sup>

#### Επίδραση μεθόδου παρασκευής

Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες σχετικά με την επίδραση των συνθηκών παρασκευής των νανοσωματιδίων στην απελευθέρωση των βιοδραστικών ουσιών. Ένα κρίσιμο πρόβλημα που διέπει τα προφίλ απελευθέρωσης, είναι η αρχική ταχεία απελευθέρωση της ουσίας ('burst effect'). Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται σε περιπτώσεις όπου η ενσωμάτωση της βιοδραστικής ουσίας έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με το μοντέλο drugenriched shell, ενώ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από το μέγεθος των σωματιδίων, καθώς μικρότερα μεγέθη σωματιδίων, και άρα μεγαλύτερες ειδικές επιφάνειες, οδηγούν σε ταχύτερη απελευθέρωση. <sup>26</sup> Πράγματι, μελέτη<sup>43</sup> που πραγματοποιήθηκε σε νανοσωματίδια ενσωματωμένα με τετρακαϊνη και ετομιδάτη, τα οποία εμφάνιζαν μεγάλη ειδική επιφάνεια και στα οποία η βιοδραστική ουσία βρέθηκε να έχει συσσωρευτεί στην εξωτερική τους επιφάνεια, επέδειξε την εμφάνιση έντονου φαινομένου 'burst', με 100% απελευθέρωση σε λιγότερο από 1 λεπτό.

Αντιθέτως, το φαινόμενο 'burst' φαίνεται να αναχαιτίζεται πλήρως, όταν οι βιοδραστικές ουσίες εμφανίζουν αυξημένη λιποφιλία και η ενσωμάτωση τους έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με το μοντέλο ομοιογενούς μήτρας. Στις περιπτώσεις αυτές, η απελευθέρωση είναι συνεχής και παρατεταμένη.<sup>26</sup> Πράγματι, νανοσωματίδια με ενσωματωμένη την εξαιρετικά λιπόφιλη πρεδνιζολόνη<sup>43</sup> επέδειξαν απελευθέρωση, η οποία διήρκησε από μια μέρα έως εβδομάδες.

Το συνηθέστερα αναφερόμενο προφίλ απελευθέρωσης, ωστόσο, αποτελεί έναν συνδυασμό των δύο παραπάνω και χαρακτηρίζεται από μια διφασική συμπεριφορά, όπου κατά την πρώτη φάση πραγματοποιείται ταχεία απελευθέρωση, η οποία όμως σταδιακά επιβραδύνεται και τελικά σταθεροποιείται. Το προφίλ αυτό αποδίδεται στην περίπτωση όπου η ενσωμάτωση της βιοδραστικής ουσίας έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με το μοντέλο drug-enriched core. Στην περίπτωση αυτή, η ταχεία απελευθέρωση οφείλεται στην παρουσία μικρής ποσότητας της ουσίας στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων, ενώ η παρατεταμένη απελευθέρωση που ακολουθεί οφείλεται στην σταδιακή διάχυση της ουσίας από την λιπιδική μήτρα.<sup>26</sup> Πράγματι, μελέτη<sup>44</sup> που πραγματοποιήθηκε σε νανοσωματίδια με ενσωματωμένη την τετρακυκλίνη επέδειξε την εμφάνιση φαινομένου 'burst', με 60% απελευθέρωση τις πρώτες 3 ώρες, ακολουθούμενη από σταθερή παρατεταμένη απελευθέρωση για τις επόμενες 12 ώρες.

## Επίδραση θερμοκρασίας

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό απελευθέρωσης των βιοδραστικών ουσιών έχουν επιδείξει ότι η εμφάνιση ταχείας απελευθέρωσης ('burst') ευνοείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθώς και όταν ως μέθοδος παρασκευής χρησιμοποιείται η μέθοδος θερμής ομογενοποίησης. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα που οι ουσίες επιδεικνύουν, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών, στην υδατική φάση. Όπως έχει αναφερθεί, το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του μοντέλου drug-enriched shell και άρα την συγκέντρωση της ουσίας στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων, απ' όπου είναι πιο εύκολη η απόσπαση της.

Αντιθέτως, το φαινόμενο 'burst' ελαχιστοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ενώ είναι αμελητέο, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος κρύας ομογενοποίησης. Εξάλλου, όπως έχει αναφερθεί, τα νανοσωματίδια που παράγονται με την μέθοδο αυτή αναπτύσσονται σύμφωνα με το μοντέλο ομοιογενούς μήτρας, στην περίπτωση του οποίου η απελευθέρωση είναι συνεχής και παρατεταμένη. <sup>26,44</sup>

## Επίδραση επιφανειοδραστικών παραγόντων

Σχετικά με την επίδραση των επιφανειοδραστικών παραγόντων στο προφίλ απελευθέρωσης των βιοδραστικών ουσιών, έχει βρεθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών οδηγούν στην εμφάνιση ταχείας απελευθέρωσης, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις τους οδηγούν σε σημαντικά χαμηλότερο φαινόμενο 'burst'. Η χρήση των επιφανειοδραστικών παραγόντων διευκολύνει την διάλυση της βιοδραστικής ουσίας στην υδατική φάση, με αποτέλεσμα, όπως έχει προαναφερθεί, την ανάπτυξη του μοντέλου drugenriched shell και άρα την συγκέντρωση της ουσίας στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων, απ' όπου είναι πιο εύκολη η απόσπαση της. 44

## 1.2.5.2. Κινητική απελευθέρωσης

Η κινητική απελευθέρωσης αφορά την αξιοποίηση μαθηματικών μοντέλων προκειμένου να γίνει μελέτη της απελευθέρωσης μιας δραστικής ουσίας. Τα μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως για την ποσοτικοποίηση και την πρόβλεψη της απελευθέρωσης των εγκλεισμένων βιοδραστικών ενώσεων συναρτήσει του χρόνου, ενώ καθιστούν δυνατή τη μέτρηση κάποιων σημαντικών φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως του συντελεστή διάχυσης της δραστικής ουσίας, μέσω των οποίων γίνεται εφικτή η πρόβλεψη του προφίλ απελευθέρωσης. Τα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης με ευρεία εφαρμογή που περιγράφουν καλύτερα τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την απελευθέρωση της βιοδραστικής ένωσης είναι: <sup>45</sup>

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

## i. Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order )

Η κινητική πρώτης τάξης περιγράφει συστήματα όπου η διεργασία πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ουσίας.

Η εξίσωση (1) για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης είναι:

$$Ct = C_0 + k_0 t$$
 (1)

Όπου:

C<sub>0</sub>: Η αρχική ποσότητα του δραστικής ουσίας στο διάλυμα Ct: Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t k<sub>0</sub>: Η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης t: χρόνος σε h

## ii. Μοντέλο πρώτης τάξης (First order )

Η κινητική πρώτης τάξης χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απορρόφηση και την απέκκριση διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων, και αφορά συστήματα όπου ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας.

Η εξίσωση (2) για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης είναι:

$$LogQ_t = LogQ_0 + kt/2.303$$
 (2)

Όπου:

Q<sub>0</sub>: Η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα Q<sub>t</sub>: Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t k: Η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης t: χρόνος σε h

## iii. Μοντέλο Higuchi

Η εξίσωση Higuchi περιγράφει την απελευθέρωση του φαρμάκου με διάχυση βασιζόμενη στον 1° νόμο του Fick, μέσω γραμμικής συσχέτισης της συγκέντρωσης της ουσίας με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου.

Η εξίσωση (3) για το κινητικό μοντέλο Higuchi είναι:

$$Q = k_H t_1 / 2 \dot{\eta} M t / Mo = k t_1 / 2$$
 (3)

Όπου:

Q: Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t k<sub>H</sub>: Σταθερά Higuchi t: χρόνος σε h

Η χρήση της εξίσωσης Higuchi βασίζεται στις παρακάτω παραδοχές:

- Η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο μέσο είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με τη διαλυτότητα της ουσίας
- 2. Η διάχυση της ουσίας πραγματοποιείται κατά μία μόνο διάσταση
- Το πάχος του δισκίου είναι αρκετά μεγαλύτερο από ότι το μέγεθος των μορίων της δραστικής ουσίας
- 4. Η διόγκωση ή διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέα
- 5. Ο ρυθμός διάχυσης της δραστικής ουσίας είναι σταθερός
- 6. Στο περιβάλλον απελευθέρωσης ισχύουν τέλειες συνθήκες βύθισης

## iv. Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Το μοντέλο Korsmeyer – Peppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που περιγράφει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα με βάση την εκθετική σχέση της απελευθέρωσης και του χρόνου.

Η εξίσωση Korsmeyer-Peppas (4) είναι:

## $F=(M_t/M)=k_m t^n$ (4)

Όπου:

F: Κλάσμα της ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t Mt: Ποσότητα της ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t M: Συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή ή στην ισορροπία km: Κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος t: χρόνος σε h n: Εκθέτης διάχυσης ή απελευθέρωσης

Αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης.

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχούν για κάθε μηχανισμό απελευθέρωσης.<sup>46</sup> Πίνακας 4: Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas

Εκθέτης διάχυσης (n)	Μηχανισμός απελευθέρωσης
n ≤ 0.5	Fickian διάχυση
0.5 < n < 1	Μη Fickian διάχυση/ Ανώμαλη μεταφορά
n > 1	Μη Fickian διάχυση – Case II

Για n  $\leq$  0.5 (Fickian model) κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης και η κινητική τέτοιων συστημάτων χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό διάχυσης.

Για 0.5 < n < 1 (μη Fickian ή ανώμαλη μεταφορά) τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.

Για n > 1 (μη Fickian - Case II) ο ρυθμός απελευθέρωσης αντιστοιχεί σε κινητική μηδενικής τάξης και τα φαινόμενα που κυριαρχούν είναι η διόγκωση ή η χαλάρωση.

## ν. Διάχυση

Η διάχυση αποτελεί έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς μεταφοράς μάζας και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η μεταφορά συμβαίνει από περιοχές υψηλών συγκεντρώσεων σε περιοχές χαμηλότερων συγκεντρώσεων με απώτερο σκοπό την επίτευξη μιας ομοιόμορφης συγκέντρωσης.

Ο βασικός νόμος, που ορίζει τη μεταφορά μάζας λόγω διάχυσης, είναι ο νόμος του Fick, που συνδέει το ρυθμό διάχυσης με την αντίστοιχη βαθμίδα συγκέντρωσης. Στην περίπτωση που η ροή παραμένει σταθερή και ανεξάρτητη από το χρόνο ισχύει η παρακάτω εξίσωση (5):

#### J = -D dc/dx (5)

όπου J είναι η ροή των μορίων, D ο συντελεστής διάχυσης και dc η μεταβολή της συγκέντρωσης κατά μήκος της διαδρομής dx.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ο ρυθμός της διάχυσης μεταβάλλεται με το χρόνο επειδή η συγκέντρωση αλλάζει συνεχώς. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από το δεύτερο νόμο του Fick (6):

#### dc/dt = d/dx (D dc/dx) (6)

Όπου *dc/dx* είναι ο ρυθμός της μεταβολής της συγκέντρωσης σε ένα καθορισμένο σημείο x.

Αν θεωρηθεί ότι ο συντελεστής διάχυσης είναι σταθερός και ανεξάρτητος της συγκέντρωσης τότε ο δεύτερος νόμος του Fick γράφεται ως εξής:

$$dc/dt = D (d^2c)/[(dx)^2]$$
 (7)

#### 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη της διεργασίας εγκλεισμού φυσικών και συνθετικών κουμαρινικών αναλόγων σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, καθώς και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους και ο καθορισμός του προφίλ απελευθέρωσης των βιοδραστικών μορίων από αυτά.

Η επιλογή των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχτηκε σε μόρια που έχουν παρασκευαστεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και έχουν παρουσιάσει αξιόλογη βιολογική δράση.<sup>24,25,47</sup> Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνης (δαφνετίνη) καθώς και της 7,8-διυδροξυ-3-(4υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, η οποία έχει εμφανίσει αξιόλογη αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης (78% στα 100μΜ), καθώς και ικανοποιητική αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια, ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης (ΙC<sub>50</sub> 52 μΜ).



Εικόνα 1: Χημική δομή της a: δαφνετίνης και b: 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)- 4μεθυλο-κουμαρίνης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός των παραπάνω ενώσεων σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, και ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Ο προσδιορισμός της ένωσης που έχει εγκλειστεί πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis), έπειτα από ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου. Μελετήθηκε επίσης η μορφολογία των νανοσωματιδίων με χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), καθώς και η δομή τους μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR).

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων αξιολογήθηκαν, επίσης, ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ενώ ακολούθησε μελέτη της απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-3-(4υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης από τα νανοσωματίδια μέσω δυο διαφορετικών μεθόδων, καθώς και κινητική μοντελοποίηση αυτής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων σε κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή και συγκεκριμένα σε κρέμα.

## 3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

## 3.1. Σχεδιασμός κουμαρινικών αναλόγων

## 3.1.1. Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

Η αντίδραση έγινε μεταξύ της πυρογαλλόλης και του οξικού οξέος, σε στοιχειομετρία 1:1.11 στους 90-100°C, παρουσία του συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα.



Σχήμα 1: Συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

## 3.1.2. Σύνθεση της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4μεθυλο-κουμαρίνης

Η σύνθεση της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης επιτεύχθηκε μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Oglialoro, κατά την οποία κατάλληλη ποσότητα υποκατεστημένου-φαινυλοξικού οξέος, και συγκεκριμένα 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος, αντιδρά με κατάλληλη ποσότητα 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης και τριαιθυλαμίνης παρουσία οξικού ανυδρίτη, στους 130°C.



**Σχήμα 2:** Συνθετική πορεία 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης

## 3.1.3. Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης

Η σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης απακετυλίωσης της 3-(4- ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης, κατά την οποία αντιδρά με μονοένυδρη υδραζίνη σε διαλύτη μεθανόλη, στους 42°C.



Σχήμα 3: Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης

## 3.1.4. Σύνθεση της δαφνετίνης

Η σύνθεση της δαφνετίνης επιτεύχθηκε μέσω αντίδρασης Pechmann, κατά την οποία κατάλληλη ποσότητα πολυφαινόλης, και συγκεκριμένα της πυρογαλλόλης, αντιδρά με κατάλληλη ποσότητα καρβοξυλικού οξέος, συγκεκριμένα μηλικού οξέος, στους 130°C.



Σχήμα 4: Συνθετική πορεία δαφνετίνης

## 3.2. Μηχανισμοί αντιδράσεων

## 3.2.1. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

Ο μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης περιλαμβάνει τα ακόλουθα δύο στάδια:

- i) Εστεροποίηση κατά Fischer (Ο-Ακυλίωση)
- ii) Αναδιάταξη Fries (C-Ακυλίωση)



**Σχήμα 5**: Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

#### i. Εστεροποίηση κατά Fischer

Ο μηχανισμός της εστεροποίησης κατά Fischer είναι μία πυρηνόφιλη ακυλική υποκατάσταση, καταλυόμενη από οξύ. Ο όξινος καταλύτης πρωτονιώνει την καρβονυλική ομάδα του καρβονυλικού οξέος και την ενεργοποιεί ως προς την πυρηνόφιλη προσβολή, η οποία πραγματοποιείται από την αλκοόλη, ενώ στη συνέχεια με μεταφορά (απώλεια) πρωτονίου σχηματίζεται ο υδρίτης ενός εστέρα.

Ακολουθεί πρωτονίωση οποιασδήποτε από τις υδροξυλομάδες προς απομάκρυνση της υπό μορφή νερού και προς σχηματισμό κατιόντος, που σταθεροποιείται μέσω συντονισμού. Η απώλεια πρωτονίου και από την δεύτερη υδροξυλομάδα οδηγεί τελικά στον εστέρα.<sup>48</sup>



Σχήμα 6: Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer

#### ii. Αναδιάταξη Fries

Η αναδιάταξη Fries είναι μια, καταλυόμενη από οξύ κατά Lewis, μετατροπή ενός φαινολικού εστέρα σε κετόνη υποκατεστημένη σε *όρθο*- ή πάρα- θέση, που λαμβάνει χώρα υπό τις συνθήκες της ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts (ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση).

Το αρχικό προϊόν της ακυλίωσης (ακυλοβενζόλιο) είναι μία κετόνη. Η καρβονυλική ομάδα της κετόνης διαθέτει αδεσμικά ηλεκτρόνια που συμπλέκονται με το οξύ κατά Lewis (BF<sub>3</sub>), απαιτώντας κατά την ακυλίωση ένα ολόκληρο ισοδύναμο BF<sub>3</sub>. Το προϊόν είναι το σύμπλοκο του ακυλοβενζολίου με τριφθοριούχο βόριο, το οποίο με προσθήκη νερού υδρολύεται, ελευθερώνοντας κετόνη.<sup>49</sup>



Σχήμα 7: Αναδιάταξη Fries

## 3.2.2. Μηχανισμός σύνθεσης της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης

Ο μηχανισμός σύνθεσης της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης από την 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη, μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Oglialoro, περιλαμβάνει μία ενδομοριακή αλδολικού τύπου συμπύκνωση της Ο-ακετυλο-ακετοφαινόνης ως ενδιάμεσο στάδιο. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται μέσω αφυδάτωσης. <sup>50</sup>



**Σχήμα 8.** Τροποποιημένη αντίδραση Perkin-Oglialoro

#### 3.2.3. Μηχανισμός σύνθεσης της δαφνετίνης

Ο μηχανισμός σύνθεσης της δαφνετίνης μέσω της αντίδρασης Pechmann περιλαμβάνει αρχικά την μετατροπή του μηλικού οξέος σε μεθανικό οξύ και 3οξοπροπανοϊκό οξύ<sup>51</sup>. Κατά την αντίδραση Pechmann, πραγματοποιείται συμπύκνωση της πυρογαλλόλης με το 3-οξοπροπανοϊκό οξύ υπό την επίδραση του ισχυρού οξέος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στην πυρογαλλόλη από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του 3-οξοπροπανοϊκού οξέος, προς σχηματισμό ενδιάμεσου προϊόντος, το οποίο μέσω αφυδάτωσης μετατρέπεται στο τελικό προϊόν.<sup>52</sup>



Σχήμα 9: Μετατροπή μηλικού οξέος



Σχήμα 10: Αντίδραση Pechmann

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 4.1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

#### 4.1.1. Όργανα και συσκευές

Στην παράγραφο αυτή αναφέρονται τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, τον χαρακτηρισμό των προϊόντων αλλά και την εύρεση ορισμένων ιδιοτήτων τους.

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, αλλά κι ο αρχικός έλεγχος της καθαρότητάς του έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC, (Thin Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Ανάλογα με το τελικό προϊόν χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αναλογίες συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (PE) / οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm και με εμποτισμό σε αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) 7%w/v ακολουθούμενο από θέρμανση της πλάκας.

Για τη συμπύκνωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi Rotavapor® R-210).

Ο τελικός χαρακτηρισμός αλλά και ο έλεγχος της καθαρότητας των προϊόντων επιτεύχθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Τα φάσματα <sup>1</sup>Η (πρωτονίου) έχουν καταγραφεί με τα όργανα Varian V300 MHz και V600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε τόσο δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>) όσο και δευτεριωμένο διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO-*d6*). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα 1H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), m (multiplet, πολλαπλό), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών). Οι σταθερές συζεύξεως, J, δίνονται σε Hz.

Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar και Acros και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

#### 4.1.2. Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων

#### 4.1.2.1. Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 7.93 mmol (1 g) πυρογαλλόλης, 8.79 mmol (05 mL) οξικού οξέος και 2.92 mL BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (σύμπλοκο τριφθοριούχου βορίου με διαιθυλαιθέρα). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 4 ώρες στους 90-100 °C, παρουσία

κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται υπό ψύξη υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου (NaOAc) περιεκτικότητας 10% w/v στο μίγμα ώστε να γίνει εξουδετέρωση του οξικού οξέος, καθώς και του συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου με διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διαιθυλαιθέρα, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί ανακρυστάλλωση με διαλύτη διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη, με διήθηση. Παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>Η NMR.

**Απόδοση:** 83%

**Σημείο Τήξης:** 150-152 °C (Σ.Τ. Βιβλιογραφίας<sup>53:</sup> 171-172 °C)

<sup>1</sup>**H NMR** (600MHz, DMSO-*d6*): *δ* (ppm) 12.59 (s, 1H, 2-OH), 10.07 (s, 1H, 4-OH), 8.59 (s, 1H, 3-OH), 7.30 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 6.40 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5) 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)



Εικόνα 30: 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη

4.1.2.2. Σύνθεση της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης **(2)** 



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.72 mmol (717.9 mg) 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος (1 eq) μαζί με 4.96 mmol (833.1 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης (1) (1.05 eq) και 14.63 mmol (2 mL) τριεθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N) (3.1 eq) παρουσία 5.2 mL οξικού ανυδρίτη [(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O]. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στους 120°C για

περίπου 2 ώρες, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διχλωρομεθάνιο, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί ανακρυστάλλωση με διαλύτη μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο, με διήθηση. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>Η NMR. Παραλαμβάνεται ροζ στερεό.

#### **Απόδοση:** 60%

Σημείο Τήξης: 198 °C

<sup>1</sup>**H** NMR: (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5), 7.27 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H, H-2' & H-6'), 7.17 (dd, *J* = 8.7, *J* = 3.3 Hz, 3H, H-6 & H-3' & H-5'), 2.41 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 2.33 (s, 3H, 4'-CH<sub>3</sub>), 2.31 (d, 6H, 8-CH<sub>3</sub> & 7-CH<sub>3</sub>)



Εικόνα 31: 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη

4.1.2.3. Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης **(3)** 



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.9 mmol (785.7 mg) της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**), μαζί με 86.16 mmol (4.1 mL) μονοένυδρης υδραζίνης (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) (45 eq) και 31.1 mL διαλύτη μεθανόλη. Η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για περίπου 1.5 ώρα

στους 42°C, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της

υδατικής στιβάδας με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια, το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> κι έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί εν ψυχρώ ανακρυστάλλωση με διαλύτη μεθανόλη, με διήθηση. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>Η NMR. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

#### **Απόδοση**: 80%

**Σημείο Τήξης:** >250 °C

<sup>1</sup>**H NMR**: (600MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2' & H-6'), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5), 6.82 (m, 3H, H-6 & H-3' & H-5'), 2.20 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>)



Εικόνα 32: 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη

## 4.1.2.4. Σύνθεση της Δαφνετίνης (4)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 18.86 mmol (2 g) πυρογαλλόλης και 12.16 mmol (1.6 g) μηλικού οξέος προστίθενται, μαζί με 3.7 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για περίπου 1.5 ώρα στους 130°C,

παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διάλυμα διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια, το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> κι έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί εν ψυχρώ επεξεργασία με διαλύτη μεθανόλη, με διήθηση. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>Η NMR. Παραλαμβάνεται ροζ στερεό.

#### **Απόδοση**: 30%

**Σημείο Τήξης:** >250 °C (Σ.Τ. Βιβλιογραφίας<sup>54</sup>: 253 °C )

<sup>1</sup>**H NMR:** (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.01 (s, 1H, 8-OH), 9.34 (s, 1H, 7-OH), 7.89 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.18 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-3)



Εικόνα 33: Δαφνετίνη

#### 4.2. Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

#### 4.2.1. Υλικά

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό, αλλά και το χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων:

**Πίνακας 5**: Υλικά της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

Υλικά	Συντομογραφία	Μοριακό βάρος (g/mol)
7,8 – διυδροξυ – 3-(4- υδροξυφαινυλο)- 4-μεθυλο- κουμαρίνη	DHC	284.26
Δαφνετίνη	DAPH	178.14
Τριμυριστίνη	ТМ	723.18
L-α-φωσφατιδυλοχολίνη, ≥99%	РС	-
Polysorbate 80	Tween 80	1310
Αιθανόλη, 99.5%	EtOH	46.07
Υπερκάθαρο νερό		

#### 4.2.2. Συσκευές

Τα όργανα κι οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό, αλλά και το χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 6:** Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Συσκευή υπερήχων	Vibra Cell probe sonicator (400 W)	Sonics & Materials Inc. company
Συσκευή Shaker	Temperature Controlled Shaker	Gallenkamp
Αντλία υψηλού κενού		
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Rotavapor R-114	Buchi
Φασματοφωτόμετρο UV- Vis	V-770 UV-VIS	Jasco
Φασματόμετρο NMR	600 MHz	Varian
Συσκευή DLS	Zetasizer Nano ZS	Malvern
Ομογενοποιητής	Kinematica	Polytron PT2100
Συσκευή λυοφιλοποίησης	Frozen In Time	Lablyo Mini
Φυγόκεντρος	Thermo Scientific	SORVALL LYNX 6000

## 4.2.3. Απομόνωση Τριμυριστίνης

Για την απομόνωση της τριμυριστίνης, προστίθενται σε σφαιρική φιάλη 20 g κονιοποιημένου μοσχοκάρυδου και 50-60 mL διαιθυλαιθέρα. Το μείγμα θερμαίνεται ήπια και υπό ανάδευση σε υδρόλουτρο για χρονικό διάστημα μίας ώρας.

Η θέρμανση πρέπει να είναι ήπια λόγω του χαμηλού σημείου ζέσεως του διαιθυλαιθέρα, καθώς σε περίπτωση έντονου βρασμού δεν θα υγροποιούταν επαρκώς στον ψυκτήρα της διάταξης.

Στη συνέχεια το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης ψύχεται, διηθείται και παραλαμβάνεται το διήθημα που περιέχει την τριμυριστίνη. Το διήθημα προστίθεται σε σφαιρική φιάλη και οδηγείται προς εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση προκειμένου να απομακρυνθεί ο διαιθυλαιθέρας και να παραληφθεί η τριμυριστίνη, ακάθαρτη, ως στερεό.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί καθαρισμός της ακάθαρτης τριμυριστίνης, το στερεό περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης διαλύεται σε ακετόνη (1 mL ακετόνης για κάθε 50 mg ακάθαρτης τριμυριστίνης) υπό μαγνητική ανάδευση και στους 56 °C. Το θερμό διάλυμα που προκύπτει αφήνεται να κρυώσει ώστε να πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση της τριμυριστίνης, και στη συνέχεια διηθείται.

## 4.2.4. Μέθοδοι Σχηματισμού Νανοσωματιδίων

## 4.2.4.1. Μέθοδος λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης (Thin Film Hydration technique)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 200 mg τριμυριστίνης, 100 mg φωσφατιδυλοχολίνης καθώς και 20 mg της βιοδραστικής ένωσης (DHC) και διαλύονται σε 10 mL μίγματος οργανικών διαλυτών διχλωρομεθανίου και μεθανόλης (1:1). Στη συνέχεια οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται υπό ελαττωμένη πίεση, σχηματίζοντας ένα λεπτό φιλμ.

Το φιλμ ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού και ακολουθεί ενυδάτωση με χρήση 10mL θερμού υδατικού διαλύματος του επιφανειοδραστικού Polysorbate 80, περιεκτικότητας 10% w/v, υπό έντονη μαγνητική ανάδευση και σε θερμοκρασία 70 °C.

Η διασπορά που προκύπτει οδηγείται προς λυοφιλοποίηση απ' όπου τελικά παραλαμβάνονται σε στερεή μορφή τα νανοσωματίδια (<u>Πείραμα 1</u>).



Εικόνα 34: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης

4.2.4.2. Γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση του διαλύτη (emulsification and solvent evaporation technique)

#### Νανοσωματίδια ενσωματωμένα με DHC/DAPH (DHC/DAPH-<u>SLNs</u>)

Αρχικά παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού Polysorbate 80, περιεκτικότητας 10% w/v, που χρησιμοποιείται ως υδατική φάση στην παρασκευή του γαλακτώματος. Το διάλυμα αναδεύεται μαγνητικά και θερμαίνεται στους 70 °C πριν την ανάμειξη του με την λιπιδική φάση.

Για την παρασκευή της λιπιδικής φάσης, συγκεκριμένη ποσότητα τριμυριστίνης τήκεται υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία 70-80 °C. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα της βιοδραστικής ένωσης, καθώς και φωσφατιδυλοχολίνης όπου απαιτείται, τα οποία διαλύονται σε αιθανόλη. Μόλις διαλυθούν πλήρως, γίνεται η προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης. Η γαλακτωματοποίηση επιτυγχάνεται με δύο μεθόδους:

#### i. Μαγνητική ανάδευση

Ύστερα από την προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης, το διάλυμα αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για μια ώρα.

Η προκύπτουσα διασπορά οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου παραμένει για 5 λεπτά σε ένταση 120W και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση για 24h στα 20 rpm και σε θερμοκρασία 40 °C σε συσκευή Shaker, προκειμένου να γίνει ήπια και πλήρης εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.

Τα νανοσωματίδια παραλαμβάνονται ως το υπερκείμενο φυγοκέντρησης στα 4.000 rpm για 20 λεπτά και στους 15 °C, το οποίο οδηγείται προς λυοφιλοποίηση από όπου προκύπτει λευκό στερεό αφράτης υφής.



**Εικόνα 35**: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ανάδευσης

Με την παραπάνω μέθοδο παρασκευάστηκαν DAPH-SLNs με αναλογία DAPH:TM:Tween 80:PC = 20:200:100:50 (<u>Πείραμα 11</u>), ενώ για την παρασκευή των DHC-SLNs εξετάστηκαν οι εξής αναλογίες αντιδραστηρίων (<u>Πειράματα 2-10/</u> <u>Πίνακας 7</u>):

**Πίνακας 7**: Αναλογίες παρασκευής DHC-SLNs με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη

Αρ. Πειρ.	DHC (mg)	TM (mg)	Tween 80 (mg)	PC (mg)
2	20	200	100	-
3	20	200	125	-
4	20	200	150	-
5	20	200	100	100
6	20	200	125	100
7	20	200	150	100
8	20	400	100	100
9	20	200	150	50
10	20	200	100	50



Εικόνα 36,37: Λυοφιλοποιημένα DHC-SLNs



Εικόνα 38: Λυοφιλοποιημένα DAPH-SLNs

## ii. Ομογενοποίηση

Ύστερα από την προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης, το μίγμα οδηγείται προς ομογενοποίηση σε συγκεκριμένες στροφές και για 10 min.

Η προκύπτουσα διασπορά οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου παραμένει για σε ένταση 120W για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση για 24h στα 20 rpm και σε θερμοκρασία 40 °C σε συσκευή Shaker, προκειμένου να γίνει ήπια και πλήρης εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.

Η αναλογία αντιδραστηρίων που επιλέχθηκε ήταν η DHC : TM: Tween80: PC = 20 : 200 : 100 : 100, ενώ εξετάστηκαν οι παρακάτω συνθήκες στροφών και χρόνου υπερήχων (Πειράματα 12-17 / Πίνακας 8):

Αρ.	Στροφές	Υπέρηχοι
Πειρ.	(rpm)	(min)
12		0
13	11000	5
14		10
15		0
16	15000	5
17		10

Πίνακας 8: Συνθήκες στροφών και χρόνου υπερήχων

Τα νανοσωματίδια παραλαμβάνονται ως το υπερκείμενο φυγοκέντρησης, στα 4.000 rpm για 20 λεπτά και στους 15 °C, το οποίο οδηγείται προς λυοφιλοποίηση από όπου προκύπτει λευκό στερεό αφράτης υφής.



**Εικόνα 39**: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ομογενοποίησης



**Εικόνα 40**: Λυοφιλοποιημένα DHC-SLNs ύστερα από ομογενοποίηση: a) 15000 rpm. b)11000 rpm

#### Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων χωρίς βιοδραστική ουσία (Blank-SLNs)

Έπειτα από την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την παρασκευή των DHC/DAPH - SLNs, για την παρασκευή των Blank-SLNs (<u>Πείραμα 18</u>) ακολουθείται η ίδια διαδικασία παραλείποντας όμως την προσθήκη της βιοδραστικής ένωσης (αναλογία TM:Tween 80:PC = 200:100:50).



Εικόνα 41: Λυοφιλοποιημένα Blank-SLNs

## 4.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

## 4.3.1. Απόδοση Διεργασίας Εγκλεισμού

Η απόδοση διεργασίας εγκλεισμού υπολογίζεται από την ολική ποσότητα των νανοσωματιδίων που συλλέγονται ύστερα από την λυοφιλοποίηση ως προς τις ποσότητες του φορέα, της ένωσης και των επιφανειοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, σύμφωνα με την εξίσωση (8):

Aπόδοση διεργασίας =  $\frac{\mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, \nu \alpha \nu o \sigma \omega \mu \alpha \tau i \delta(\omega \nu \, \pi o \upsilon \, \sigma \upsilon \lambda) \dot{\epsilon} \chi \theta \eta \kappa \alpha \nu \, (mg)}{\alpha \rho \chi i \kappa \eta \, \mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, TM + DHC / DAPH + PC + Tween 80 (mg)} *100\%$  (8)

## 4.3.2. Απόδοση Εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Η υδατική διασπορά νανοσωματιδίων φυγοκεντρείται στα 4.000 rpm για 20 λεπτά και στους 15 °C, απ' όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο φυγοκέντρησης το οποίο οδηγείται προς λυοφιλοποίηση. Το ίζημα της φυγοκέντρησης, το οποίο αποτελεί την ένωση που δεν εγκλείστηκε καθώς και μικρή ποσότητα φορέα, διαλύεται σε σύστημα ίσων όγκων διαλυτών διχλωρομεθανίου (DCM) / μεθανόλης (MeOH) και από το μίγμα απομονώνονται 3 mL τα οποία φιλτράρονται με φίλτρο 200 μm, και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200-500 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία. Λόγω υψηλής συγκέντρωσης της ένωσης στο μίγμα (προκύπτει απορρόφηση μεγαλύτερη από 1), οι μετρήσεις πραγματοποιούνται ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις.

Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα της ένωσης που δεν εγκλείστηκε, και μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης, προσδιορίζεται τελικά η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια με βάση την εξίσωση (9):

 $Aπόδοση εγκλεισμού = 1 - \frac{μάζα ουσίας που δεν εγκλείστηκε (mg)}{αρχική μάζα ένωσης(mg)} *100\%$ (9)

## 4.3.3. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS.

Προκειμένου να μετρηθεί κάθε δείγμα, λαμβάνονται 10 μL από την προκύπτουσα από την φυγοκέντρηση διασπορά των νανοσωματιδίων και αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό προς τελικό όγκο 30 mL και οδηγούνται σε συσκευή υπερήχων για 3 min στα 120 W. Πριν την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο πραγματοποιείται ανάδευση για 2 λεπτά σε αναδευτήρα τύπου Vortex, προκειμένου να επιτευχθεί καλή διασπορά των νανοσωματιδίων. Οι υδατικές διασπορές εισάγονται σε τριχοειδείς κυψελίδες τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C. Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών.

## 4.3.4. Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασπορών

Η σταθερότητα των DHC-SLNs αξιολογήθηκε τόσο ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, σε βάθος 3 μηνών, όσο και ως προς την απόδοση εγκλεισμού, σε βάθος 1 μήνα.

#### Μελέτη σταθερότητας ως προς το μέγεθος, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα DHC-SLNs αξιολογήθηκαν εκ νέου μέσω της μεθόδου DLS ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους, έπειτα από αποθήκευση είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε εντός ψυγείου για χρονικό διάστημα 3 μηνών.

#### Μελέτη σταθερότητας ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Τα DHC-SLNs αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την σταθερότητα της απόδοσης εγκλεισμού. Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια των οποίων η απόδοση εγκλεισμού προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Στη συνέχεια, οι διασπορές τους αποθηκεύτηκαν είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε εντός ψυγείου για χρονικό διάστημα 1 μήνα, οπότε και επαναφυγοκεντρήθηκαν και μετρήθηκε εκ νέου η απόδοση εγκλεισμού, με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης που απελευθερώθηκε στο διάστημα αυτό.

## 4.3.5. Μελέτη μορφολογίας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) στα ξηρά νανοσωματίδια, όπως παραλήφθηκαν ύστερα από την λυοφιλοποίηση.

Τα φάσματα SEM καταγράφηκαν με το όργανο SEM (Quanta 200) / EDAX, έπειτα από επιχρύσωση 75 sec, σε συνθήκες 25.00 kV, mag (2000x).

#### 4.3.6. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, οι φορείς και οι βιοδραστικές ουσίες μελετήθηκαν δομικά και με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Για την λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε η ανάμειξη των ουσιών με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία περίπου 1:100 για την παρασκευή δείγματος με την μορφή δισκίου (παλέτας). Τα φάσματα καταγράφηκαν με το όργανο FT-IR-4200 (Jasco).

#### 4.3.7. Μελέτη υγροσκοπικότητας

Προκειμένου να μελετηθεί η υγροσκοπικότητα των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων, δείγματα αυτών αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συνθήκες, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελέγχονταν ως προς το βάρος τους για την ανίχνευση προσρόφησης υγρασίας. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν αποθήκευση εντός ξηραντήρα παρουσία αζώτου, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εντός ψυγείου.

## 4.4. Μελέτη απελευθέρωσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων

Το προφίλ απελευθέρωσης της DHC από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων μελετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> με pH 5.5, προσομοιάζοντας αυτό του δέρματος, και θερμοκρασία 37°C. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους.

## 4.4.1. Μέθοδος Α

Κατά την πρώτη μέθοδο, κατάλληλος όγκος της διασποράς των νανοσωματιδίων, ώστε να περιέχει 4 mg ένωσης, προστίθεται σε μεμβράνη διάλυσης η οποία εμβαπτίζεται σε 125 mL ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο αναδεύεται στους 37 °C και σε 300 rpm. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται δείγματα 2 mL από το διάλυμα, φιλτράρονται και αναλύονται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis), έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα της ένωσης που απελευθερώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, μετρώντας την απορρόφηση. Η ποσοτικοποίηση της ένωσης που έχει απελευθερωθεί στο μέσο την κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιείται μέσω της καμπύλης αναφοράς. Κάθε χρονική στιγμή που αφαιρούνταν 2 mL δείγματος από το σύστημα, επιστρέφονται 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος.



Εικόνα 42: Απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων με την μέθοδο Α

## 4.4.2. Μέθοδος Β

Κατά την δεύτερη μέθοδο, 100 mg των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων προστίθενται εντός σφαιρικής φιάλης σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος, και το σύστημα αναδεύεται υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση στους 37 °C και σε 150

rpm. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται δείγματα 2 mL από το διάλυμα τα οποία φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 10 min. Τα νανοσωματίδια που καθίζαναν επαναδιασπείρονται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος και επιστρέφονται στην σφαιρική, ενώ οι υπερκείμενες διασπορές φιλτράρονται και αναλύονται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα της ένωσης που απελευθερώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, μετρώντας την απορρόφηση. Η ποσοτικοποίηση της ένωσης που έχει απελευθερωθεί στο μέσο την κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιείται μέσω της καμπύλης αναφοράς.

## 4.5. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων

## στερεών λιπιδίων

#### 4.5.1. Υλικά και συσκευές

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης τόσο των βιοδραστικών ενώσεων όσο και των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων:

- Υλικά
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Αιθανόλη, 99.5%
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Υπερκάθαρο νερό

#### Συσκευές

Πίνακας 9: Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας

Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Plate Reader	Spectra Max 250	<b>Molecular Devices</b>
Vortex	ZX3 Advanced Vortex Mixer	VELP Scientifica

## 4.5.2. Πειραματική διαδικασία

Η αντιοξειδωτική δράση των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων έγκειται στην αντιοξειδωτική δράση των βιοδραστικών ενώσεων που εγκλείστηκαν σε αυτά.

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH 0.0025% σε αιθανόλη, το οποίο αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 30 min απουσία φωτός. Στη συνέχεια παρασκευάζονται οι αρχικές συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων δειγμάτων. Συγκεκριμένα η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε τόσο στα νανοσωματίδια, υπό μορφή διασποράς, όσο και στις καθαρές ενώσεις αυτές καθ' αυτές. Με κατάλληλες αραιώσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται με υπερκάθαρο νερό, στην περίπτωση των διασπορών, και με DMSO, στην περίπτωση των καθαρών ενώσεων, προκύπτουν οι επιθυμητές stock συγκεντρώσεις. Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) προστίθενται 195μL DPPH καθώς και 5μL από κάθε μια από τις stock συγκεντρώσεις. Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς 195μL DPPH και 5μL διαλύτη. Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι για 30 min και 60 min. Με τη χρήση του reader λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515nm για κάθε δείγμα και εξετάζεται ως προς τα control.

Τα αποτελέσματα δίνονται εκφρασμένα σε ΙC<sub>50</sub>.

TEEEEE	600000
	666655
666666	660000
666666	6666660
000000	

Εικόνα 43: Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate)

# 4.6. Ενσωμάτωση νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων σε φαρμακοτεχνική μορφή

#### 4.6.1. Υλικά

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κρεμών:

- Αμυγδαλέλαιο
- Λάδι αβοκάντο
- Μελισσοκέρι
- Βουτυλενογλυκόλη
- Ζελέ αλόης
- Αιθέριο έλαιο
- Υδατική διασπορά νανοσωματιδίων
- Υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος
- Απιονισμένο νερό

## 4.6.2 Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής (κρέμα)

Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής με ενσωμάτωση νανοσωματιδίων

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 18 mL αμυγδαλελαίου και 18 mL λαδιού αβοκάντο, όπως επίσης και 4.5 g μελισσοκέρι και 4.5 g βουτυλενογλυκόλη. Το σύστημα αναδεύεται στους 80 °C μέχρι την τήξη του κεριού. Ακολούθως το μίγμα αποσύρεται από την θέρμανση και προστίθενται 36 g ζελέ αλόης, υπό συνεχή

ανάδευση, έως ότου η κρέμα ομογενοποιηθεί. Στη συνέχεια η κρέμα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων για 2 min για περαιτέρω ομογενοποίηση, οπότε και προστίθενται 6 σταγόνες του αιθέριου ελαίου και ακολουθούν εκ νέου 2 min υπερήχων.

Η τελική περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας στην κρέμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0.01 % w/v. Επομένως, η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων στην κρέμα γίνεται με την προσθήκη κατάλληλου όγκου της διασποράς, ο οποίος υπολογίζεται με βάση την εκάστοτε απόδοση εγκλεισμού, υπό συνεχή ανάδευση. Παρασκευάστηκαν έτσι 3 είδη κρεμών, ένα με ενσωμάτωση των DHC-SLNs, ένα με ενσωμάτωση των DAPH-SLNs και ένα με ενσωμάτωση και των δύο ειδών SLNs.

#### Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής χωρίς ενσωμάτωση νανοσωματιδίων

Για την παρασκευή blank φαρμακοτεχνικής μορφής, ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και για την παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής με ενσωμάτωση νανοσωματιδίων, παραλείποντας όμως την ενσωμάτωση της διασποράς των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 44: Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής (κρέμας)



Εικόνα 45: Φαρμακοτεχνική μορφή (κρέμα)

## 4.6.2.3. Ρύθμιση pH των φαρμακοτεχνικών μορφών

Το pH της κρέμας πρέπει να είναι μεταξύ 5-6 ώστε να προσομοιάζει αυτό του δέρματος. Επομένως, ύστερα από την παρασκευή των κρεμών, το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος κιτρικού οξέος, εάν επιθυμείται μείωση, ή διαλύματος NaOH, εάν επιθυμείται αύξηση αυτού. Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται σε υδατική διασπορά της κρέμας, που προκύπτει από την διάλυση 0.1 g σε 10 mL απιονισμένου νερού. Τα τελικά pH των κρεμών που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Είδος κρέμας	рН
Κρέμα με ενσωμάτωση DHC-SLNs	5.93
Κρέμα με ενσωμάτωση DAPH-SLNs	5.90
Κρέμα με ενσωμάτωση DHC-SLNs – DAPH-SLNs	5.59
Κρέμα χωρίς ενσωμάτωση (blank)	5.45

Πίνακας 10: Τιμές pH των διαφόρων ειδών κρεμών

#### 4.6.3. Μελέτες σταθερότητας φαρμακοτεχνικής μορφής

#### 4.6.3.1. Μελέτη φυγοκέντρησης

Για τον σκοπό αυτό, λαμβάνονται 12 g από κάθε είδος κρέμας και φυγοκεντρούνται στις 5000 rpm για 10 min και σε θερμοκρασία 15 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, οι κρέμες ελέγχονται ως προς τον διαχωρισμό φάσεων.

#### 4.6.3.2. Μελέτη θερμοκρασίας

Για τον σκοπό αυτό, κάθε είδος κρέμας χωρίζεται σε 3 δείγματα τα οποία αποθηκεύονται σε 2 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, και συγκεκριμένα στους 15 °C και στους 40 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα δείγματα ελέγχονται ως προς τον διαχωρισμό φάσεων και το χρώμα τους.

#### 4.6.3.3. Μελέτη κύκλου freeze-thaw

Για τον σκοπό αυτό, λαμβάνεται δείγμα από κάθε είδος κρέμας το οποίο υπόκειται σε κύκλους απότομων εναλλαγών θερμοκρασίας. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει αποθήκευση στους 4 °C για 24h, μεταφορά και αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24h, μεταφορά και αποθήκευση στους 40 °C για

24h και τέλος μεταφορά και αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24h. Κατά την διάρκεια του κύκλου, τα δείγματα ελέγχονται ως προς τον διαχωρισμό φάσεων και το χρώμα τους. Η μελέτη αυτή πραγματοποιείται καθώς προσομοιάζει συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 5.1. Φασματοσκοπική μελέτη

αντίστοιχα.

Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη των μορίων που συντέθηκαν, καθώς και του ιζήματος της φυγοκέντρησης, όπως αυτό προκύπτει από την παράγραφο 3.3.



Το φάσμα αυτό εμφανίζει μια απλή κορυφή στα 12.59 ppm, η οποία αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 2. Αντίστοιχα, απλές κορυφές εμφανίζονται και στα 10.07 και 8.59 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα υδροξύλια των θέσεων 4 και 3

Στα 7.30 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο Η-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-5), το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 6.40 ppm.

Στα 2.52 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της καρβονυλομάδας.



Εικόνα 47: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας διπλής κορυφής στα 7.55 ppm, η οποία αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6). Όπως αναμένεται, στα 7.16 ppm εντοπίζεται ακόμα μια διπλή κορυφή, η οποία αφορά το Η-6.

Στα 7.27 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια H-2' & H-6' του φαινολικού δακτυλίου. Ομοίως, η διπλή κορυφή που εντοπίζεται στα 7.18 ppm ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αφορά τα ισοδύναμα H-3' & H-5'.

Στα 2.41 και 2.33 ppm εντοπίζονται δύο απλές κορυφές που η καθεμία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια, τα οποία αποδίδονται στις μεθυλο-ομάδες των θέσεων 4- και 4'- αντίστοιχα, του κουμαρινικού σκελετού. Τέλος, στα 2.31 ppm εντοπίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 6 πρωτόνια τα οποία αποδίδονται στις μεθυλο-ομάδες των θέσεων 7- και 8- του κουμαρινικού σκελετού.



Εικόνα 48: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης

Σύμφωνα με το παραπάνω φάσμα, στα 7.13 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή η οποία αποδίδεται στο Η-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (Η-6).

Στα 7.09 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια H-2' & H-6' του φαινολικού δακτυλίου.

Στα 6.82 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στο Η-6 αλλά και στα ισοδύναμα πρωτόνια Η-3' & Η-5' του φαινολικού δακτυλίου.

Τέλος, στα 2.20 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια, τα οποία αποδίδονται στην μεθυλο-ομάδα της θέσης 4.

Τα πρωτόνια των -ΟΗ αποτελούν πολύ ευκίνητες ομάδες που συχνά δεν εμφανίζονται στα φάσματα <sup>1</sup>Η NMR. Πολλές φορές εμφανίζουν μια ευρεία κορυφή όπως αυτή που διακρίνεται ελαφρώς περίπου στα 9.5 ppm.


Εικόνα 49: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR της δαφνετίνης

Το φάσμα αυτό εμφανίζει μια απλή κορυφή στα 10.07 ppm, που αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 8. Ομοίως, στα 9.31 εμφανίζεται ακόμα μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο υδροξύλιο της θέσης 7.

Το φάσμα αυτό παρουσιάζει επίσης μια διπλή κορυφή στα 7.86 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H-4, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-3). Αναμενόμενα, στα 6.15 ppm εντοπίζεται ακόμα μια διπλή κορυφή, η οποία αφορά το H-3.

Στη συνέχεια ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 6.96 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Όπως αναμένεται, στα 6.78 ppm εντοπίζεται ακόμα μια διπλή κορυφή, η οποία αφορά το H-6.

Η φασματοσκοπική μελέτη του ιζήματος της φυγοκέντρησης που ακολουθεί, πραγματοποιείται προκειμένου να επικυρωθεί η μέθοδος υπολογισμού της απόδοσης εγκλεισμού και να επιβεβαιωθεί ότι το ίζημα αποτελείται κατά κύριο λόγο από ένωση που δεν εγκλείστηκε, και πιθανώς από μικρή ποσότητα του φορέα που επίσης δεν συμμετείχε στον εγκλεισμό, οπότε για τον σκοπό αυτό γίνεται σύγκριση του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του ιζήματος με τα φάσματα <sup>1</sup>Η NMR των καθαρών DHC, TM και PC.



υδροξυφαινυλο)- 4-μεθυλο-κουμαρίνης

Στο φάσμα του ιζήματος παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές, μια στα 7.12 ppm και μια στα 7.08, οι οποίες αντιστοιχίζονται με τις διπλές κορυφές του φάσματος της DHC στα 7.13 και 7.09 ppm αντίστοιχα.

Παρατηρείται επίσης μια πολλαπλή κορυφή στα 6.81 ppm η οποία αντιστοιχίζεται με την πολλαπλή κορυφή του φάσματος της DHC στα 6.82 ppm, καθώς και μια απλή κορυφή στα 2.20 ppm η οποία αντιστοιχίζεται με την απλή κορυφή του φάσματος της DHC στα 2.20 ppm. Επομένως επιβεβαιώνεται η





Εικόνα 51: Συγκριτικό φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του ιζήματος και της τριμυριστίνης

Το φάσμα της τριμυριστίνης εμφανίζει μια απλή κορυφή στα 1.58 ppm, μια διπλή κορυφή στα 1.25 ppm και δύο πολλαπλές κορυφές στα 0.86 και 2.28 ppm. Παρατηρείται αντιστοίχιση των δύο πολλαπλών κορυφών με τις δύο πολλαπλές κορυφές του φάσματος του ιζήματος στα 0.86 και 2.28 ppm αντίστοιχα, καθώς και αντιστοίχιση της διπλής κορυφής με την απλή κορυφή του φάσματος του ιζήματος στα 1.23 ppm. Επομένως, επιβεβαιώνεται η παρουσία της τριμυριστίνης στο ίζημα της φυγοκέντρησης. Ωστόσο, η πολύ μικρή ένταση των κορυφών αυτών στο φάσμα του ιζήματος υποδεικνύει ότι η ποσότητα της τριμυριστίνης που εντοπίζεται στο ίζημα και άρα που δεν συμμετείχε στον εγκλεισμό, είναι πολύ μικρή.



Εικόνα 52: Συγκριτικό φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του ιζήματος και της φωσφατιδυλοχολίνης

Παρατηρώντας το φάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης, παρατηρείται ενδεχομένως η ύπαρξη ελάχιστης ποσότητας της στο ίζημα.

# 5.2. Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού, Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Στο κεφάλαιο αυτό αναπτύσσεται ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό καθώς και ως προς τις αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας.

# 5.2.1. Μέθοδος λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης (Thin Film Hydration technique)

Τα DHC-SLNs που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή, με αναλογία DHC:TM:Tween 80:PC = 20:200:100:100, παρουσίασαν μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 223.5 ± 48.7 nm, αρκετά υψηλή τιμή ζ-δυναμικού, -36.6 ±4.5 mV, αλλά και αρκετά υψηλή απόδοση διεργασίας (86.5 %). Ωστόσο, χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή τιμή δείκτη PDI (0.622 ±0.017), η οποία υποδεικνύει σημαντική ανομοιομορφία της διασποράς.

# 5.2.2. Γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση του διαλύτη (emulsification and solvent evaporation technique)

#### 5.2.2.1. Μαγνητική ανάδευση

Η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη επιλέχθηκε για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής DHC-SLNs, λόγω της χρήσης αιθανόλης που βοηθά στη διαλυτοποίηση του 3-αρυλο κουμαρινικού αναλόγου. Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη αναλογία για την παρασκευή τους, πραγματοποιήθηκε σειρά δοκιμών χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες των συστατικών κάθε φορά.

**Πίνακας 11**: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης εγκλεισμού των DHC-SLNs για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, με μαγνητική ανάδευση

Αρ. Πειρ.	Αναλογία TM:Tween 80:PC (mg)	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)	Απόδοση Διεργασίας (%)	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
2	200:100:-	320.4 ±23.8	0.501 ±0.069	-26.3 ±1.4	59.1	85.6
3	200 : 125 : -	180.1±27.5	0.517 ±0.073	-31.9 ±3.4	13.2	7.7
4	200:150:-	474.2±57.6	0.588 ±0.056	-30.5 ±0.7	2.1	36.0
5	200:100:100	235±41.8	0.488 ±0.061	-28.6 ±2.6	54.7	30.5
6	200:125:100	293.6±41.3	0.576 ±0.05	-27.3 ±1.7	58.2	52.2
7	200 : 150 : 100	219.2±48	0.444 ±0.087	-29.9 ±4.1	57.1	39.3
8	400:100:100	269.4±20.3	0.559 ±0.075	-28.2 ±0.9	32.7	32.5
9	200:150:50	246.6±25.2	0.424 ±0.038	-30.1 ±1.3	46.7	38.7
10	200:100:50	230.7±20.3	0.385 ±0.098	-30.3 ±2.9	75.9	43.4

Οι αρχικές δοκιμές αφορούσαν διαφορετικές ποσότητες Tween 80, παρουσία ή απουσία φωσφατιδυλοχολίνης (πειράματα 2,3,4,5,6 και 7).

Τα νανοσωματίδια που παραλήφθηκαν απουσία PC ύστερα από την λυοφιλοποίηση ήταν ανομοιογενή και κολλώδους υφής, ενώ χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά χαμηλές αποδόσεις διεργασίας (πειράματα 3,4) και από αυξημένο μέγεθος νανοσωματιδίων (πειράματα 2,4). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση προσθήκης της μέγιστης ποσότητας του επιφανειοδραστικού παράγοντα (150 mg), παρατηρούνται τα λιγότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα και για τις δυο αυτές παραμέτρους (2.1 % και 474.2 nm αντίστοιχα).

Αντιθέτως, οι δοκιμές παρουσία PC (πειράματα 5, 6 και 7) εμφανίζουν βελτίωση ως προς το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς, καθώς και υψηλές αποδόσεις διεργασίας. <u>Συνεπώς, η προσθήκη της PC στην παρασκευή των SLNs, κρίνεται</u> <u>απαραίτητη</u>. Στη συγκεκριμένη σειρά δοκιμών, τα λιγότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα εμφανίζονται στην περίπτωση της χρήσης 125 mg Tween 80 (μέγεθος 293.6 nm και δείκτης πολυδιασποράς 0.576), επομένως η αντίστοιχη αναλογία αποκλείστηκε από περαιτέρω δοκιμές.

Πραγματοποιήθηκε επίσης δοκιμή διπλάσιας ποσότητας TM, ίσης με 400 mg (πείραμα 8). Η αύξηση της ποσότητας της τριμυριστίνης δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στα αποτελέσματα, με εξαίρεση την απόδοση διεργασίας η οποία είναι εμφανώς χαμηλότερη (32.7%). Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι η κατάλληλη ποσότητα τριμυριστίνης είναι 200 mg.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση της βέλτιστης ποσότητας φωσφατιδυλοχολίνης (πειράματα 9 και 10), παρουσία 100 και 150 mg Tween 80. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η μείωση της PC κατά το ήμισυ (50 mg), το οποίο παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε πολύ μικρή αύξηση του μεγέθους, της τάξης των 10 nm, αλλά και σε εμφανώς καλύτερα αποτελέσματα τόσο στον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό όσο και στην απόδοση εγκλεισμού.

Μεταξύ των δύο δοκιμών, καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει το πείραμα 10, όπου παρατηρείται και η μέγιστη απόδοση διεργασίας (75.9 %). <u>Επομένως,</u> κρίνεται ότι οι βέλτιστες ποσότητες για την παρασκευή των SLNs είναι 200 mg <u>TM, 50 mg PC και 100 mg Tween 80</u>.



Εικόνα 53: Ενδεικτική κατανομή μεγέθους των DHC-SLNs



Εικόνα 54: Ενδεικτικό ζ-δυναμικό των DHC-SLNs

Τα DHC-SLNs που συντέθηκαν με τη μέθοδο αυτή, εμφανίζουν κατά μέσο όρο μέγεθος 230.7 nm και δείκτη πολυδιασποράς 0.385. Η τιμή αυτή του δείκτη πολυδιασποράς υποδηλώνει καλή προς μέτρια ομοιομορφία.<sup>55,56</sup> Επιπλέον, η τιμή του ζ-δυναμικού είναι αρκετά υψηλή (-30.3 mV), που υποδεικνύει σημαντική σταθερότητα και μειωμένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων. Η απόδοση διεργασίας είναι αρκετά υψηλή ενώ η απόδοση εγκλεισμού κρίνεται ικανοποιητική.<sup>57,58,59</sup>

Να σημειωθεί ότι στο ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους (εικόνα 53) παρατηρείται η ύπαρξη δύο οικογενειών, καθώς πέραν της κύριας οικογένειας,

περίπου στα 200 nm, εμφανίζεται και μια οικογένεια πολύ μικρότερης έντασης (ένταση 2%) περίπου στα 5240 nm.

Στις εικόνες 41 και 42 παρουσιάζονται η κατανομή μεγέθους και το ζ-δυναμικό διασπορών DHC-SLNs, αντίστοιχα, οι οποίες έχουν προηγουμένως φιλτραριστεί με φίλτρο 0.45 μm. Παρατηρείται ότι με την χρήση φίλτρου επιτεύχθηκε η απομάκρυνση των σωματιδίων μεγαλύτερων μεγεθών, καθώς πλέον εμφανίζεται μόνο μια οικογένεια, ενώ το γεγονός αυτό επέφερε, αναμενόμενα, σημαντική βελτίωση τόσο του μεγέθους (122.2 nm) όσο και του συντελεστή πολυδιασποράς (PDI 0.207). Αντιθέτως, το ζ-δυναμικό δεν εμφανίζει μεταβολή, που υποδεικνύει ότι, όπως είναι λογικό, η χρήση φίλτρου δεν επηρέασε την σταθερότητα των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 55: Κατανομή μεγέθους των DHC-SLNs ύστερα από φιλτράρισμα



Εικόνα 56: ζ-δυναμικό των DHC-SLNs ύστερα από φιλτράρισμα

Ακόμη, ύστερα από την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές οι οποίες αφορούσαν τον εγκλεισμό της δαφνετίνης (πείραμα 11) αλλά και τον σχηματισμό Blank-SLNs (πείραμα 18) βάσει αυτής.

**Πίνακας 12**: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης εγκλεισμού των DAPH-SLNs και Blank-SLNs για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, με μαγνητική ανάδευση

Αρ. Πειρ.	Αναλογία TM:Tween 80:PC (mg)	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)	Απόδοση Διεργασίας (%)	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
11	200 :100 :50	256.2±43.3	0.367 ±0.063	-41.3 ±1.5	59.6	80.5
18	200 :100 :50	236.3±24.6	0.38 ±0.063	-18.5 ±1.5	80.3	-



Εικόνα 57: Ενδεικτική κατανομή μεγέθους των DAPH-SLNs



Εικόνα 58: Ενδεικτικό ζ-δυναμικό των DAPH-SLNs

Τα DAPH-SLNs παρουσιάζουν κατά μέσο όρο μέγεθος 256.2 nm και συντελεστή πολυδιασποράς 0.367. Η τιμή αυτή του δείκτη πολυδιασποράς υποδηλώνει καλή προς μέτρια ομοιομορφία. Επιπλέον, η τιμή του ζ-δυναμικού είναι αρκετά υψηλή (-41.3), που υποδεικνύει σημαντική σταθερότητα και μειωμένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων. Η απόδοση διεργασίας στα 57.6% είναι εξαιρετικά ικανοποιητική ενώ εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλή απόδοση εγκλεισμού (80.5%).



Εικόνα 59: Ενδεικτική κατανομή μεγέθους των Blank-SLNs



Εικόνα 60: Ενδεικτικό ζ-δυναμικό των Blank-SLNs

Τα Blank-SLNs παρουσιάζουν κατά μέσο όρο μέγεθος 236.3 nm και συντελεστή πολυδιασποράς 0.38. Η τιμή αυτή του δείκτη πολυδιασποράς υποδηλώνει καλή προς μέτρια ομοιομορφία. Επιπλέον, η τιμή του ζ-δυναμικού είναι -18.5, που υποδεικνύει σταθερότητα και μειωμένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων, όχι όμως στον βαθμό των DHC-SLNs και DAPH-SLNs, ενώ η απόδοση διεργασίας εμφανίζει αρκετά υψηλή τιμή στα 80.3%.

## 5.2.2.2. Ομογενοποίηση

**Πίνακας 13**: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης εγκλεισμού των DHC-SLNs για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, με ομογενοποίηση υψηλών στροφών

Αρ. Πειρ	Στροφές (rpm)	Χρόνος υπερήχων (min)	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)	Απόδοση Διεργασίας (%)	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
12		0	285±25.1	0.517 ±0.022	-19.2 ±0.9		
13	11000	5	187.3±41.9	0.408 ±0.068	-24.8 ±5.4	78.9	45.3
14		10	288.7±96.8	0.582 ±0.072	-39.8 ±2.4		
15		0	320.3±58.3	0.583 ±0.147	-24.8 ±0.8		
16	15000	5	330.1±92.2	0.703 ±0.151	-33.8 ±2.2	78.1	32.9
17		10	360.8±86	0.678 ±0.093	-31.3 ±4		

Όσον αφορά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ομογενοποίησης, οι οποίες έγιναν με βάση την αναλογία TM:Tween 80:PC (mg) = 20 : 150 :100, εξετάστηκε η επίδραση τόσο <u>της έντασης της ομογενοποίησης</u> όσο και <u>του</u> <u>χρόνου υπερήχων</u> στον σχηματισμό των SLNs.

Αρχικά παρατηρείται ότι <u>η χρήση υπερήχων</u> (δοκιμές 13, 14, 16 και 17) συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της τιμής του ζ-δυναμικού, και άρα στην <u>σταθερότητα των νανοσωματιδίων</u>, σε σχέση με τις δοκιμές 12 και 15 όπου οι υπέρηχοι δεν πραγματοποιήθηκαν (-19.2 και -24.8 mV αντίστοιχα). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα που προκύπτουν στην περίπτωση των χαμηλότερων στροφών φαίνεται ότι ιδανικό χρόνο υπερήχων αποτελούν τα 5 min, καθώς στα 10 min εμφανίζεται σημαντική αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς. Συμπεραίνεται επομένως ότι <u>η πρόσδοση πλεονάζουσας</u> ενέργειας στο σύστημα των νανοσωματιδίων προκαλεί την συσσωμάτωση τους, λόγω των υψηλών τιμών κινητικής ενέργειας που αποκτούν, με αποτέλεσμα την αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς.<sup>60</sup> Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση της πρόσδοσης περίσσειας ενέργειας μέσω της χρήσης υψηλότερης έντασης στροφών (πειράματα 15, 16, 17), καθώς αυτές οδηγούν σε σημαντική αύξηση του μεγέθους και του δείκτη PDI, αλλά και σε μείωση της απόδοσης εγκλεισμού, σε σχέση με τις χαμηλότερες στροφές.

### 5.3. Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασπορών

Η σταθερότητα των DHC-SLNs αξιολογήθηκε τόσο ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, σε βάθος 3 μηνών, όσο και ως προς την απόδοση εγκλεισμού, σε βάθος 1 μήνα.

# 5.3.1. Μελέτη σταθερότητας μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικού

Νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με αναλογία TM:Tween 80:PC (mg) = 200 : 150 : 100 αξιολογήθηκαν ως προς την σταθερότητα τους μετά από διάστημα 3 μηνών. Στον πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS αμέσως μετά την σύνθεση των νανοσωματιδίων (i), μετά από διάστημα τριών μηνών και αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (ii) και μετά από διάστημα τριών μηνών και αποθήκευσή τους σε εντός ψυγείου (iii).

**Πίνακας 14**: Μελέτη σταθερότητας της υδατικής διασποράς ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό

	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)
i	209.1±13.8	$0.42 \pm 0.077$	-29.9±0.7
ii	207.8±11.6	$0.391 \pm 0.071$	-31.6±2.0
iii	259.7±55.8	$0.465 \pm 0.052$	-30.1±2.4

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, τα νανοσωματίδια έπειτα από διάστημα τριών μηνών με αποθήκευση σε συνθήκες περιβάλλοντος (ii) εμφανίζουν πολύ μικρή απόκλιση συγκριτικά με το αντίστοιχο αρχικό δείγμα (i), επομένως συμπεραίνεται ότι υπό αυτές τις συνθήκες είναι ιδιαιτέρως σταθερά με την πάροδο του χρόνου.

Τα αποτελέσματα της αποθήκευσης εντός ψυγείου (iii) φανερώνουν αύξηση του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση της θερμοκρασίας οδήγησε πιθανώς σε συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Ωστόσο οι μεταβολές αυτές βρίσκονται εντός ορίων της τυπικής απόκλισης αυτής της αναλογίας, επομένως θεωρούνται αποδεκτές. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την τιμή του ζ-δυναμικού, η οποία παραμένει πρακτικά σταθερή, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και υπό αυτές τις συνθήκες τα νανοσωματίδια παραμένουν αρκετά σταθερά.

### 5.3.2. Μελέτη σταθερότητας απόδοσης εγκλεισμού

Νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων που παρασκευάστηκαν με αναλογία TM : PC : Tween 80 = 200 : 50 : 100 αξιολογήθηκαν ως προς τη σταθερότητα της απόδοσης εγκλεισμού τους μετά από διάστημα 1 μήνα, οπότε και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου και μετρήθηκε η ποσότητα της ένωσης που καταβυθίστηκε ως ίζημα και άρα απελευθερώθηκε στο διάστημα αυτό.

Πιο συγκεκριμένα, σε DHC-SLNs που παρασκευάστηκαν, υπολογίστηκε η απόδοση εγκλεισμού, και στη συνέχεια αυτά αποθηκεύτηκαν <u>σε συνθήκες</u> <u>περιβάλλοντος</u>. Έπειτα από ένα μήνα, με την ίδια μέθοδο, προσδιορίστηκε η ποσότητα της ένωσης που απελευθερώθηκε από τα νανοσωματίδια στο διάστημα αυτό, και βρέθηκε ότι <u>η απόδοση εγκλεισμού μειώθηκε κατά 52%</u>.

Σε αντίστοιχο πείραμα, DHC-SLNs, τα οποία ωστόσο αποθηκεύτηκαν για διάστημα 1 μήνα <u>εντός ψυγείου</u>, έπειτα από την επαναφυγοκέντρησή τους καταβυθίστηκε πολύ μικρή ποσότητα ιζήματος, η οποία δε μπόρεσε να ανιχνευθεί μέσω φασματοφωτομετρίας UV-VIS, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι <u>η διασπορά</u> <u>παρέμεινε σταθερή κατά το διάστημα αυτό</u>.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η αποθήκευση των υδατικών διασπορών των SLNs είναι θεμιτό να πραγματοποιείται σε συνθήκες ψύξης, καθώς έτσι αποφεύγεται η ανεπιθύμητη απελευθέρωση της ένωσης και άρα και η μείωση της δραστικότητάς τους.

5.4. Μελέτη μορφολογίας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

5.4.1. Blank-SLNs











d



Τα blank-SLNs χαρακτηρίζονται από ασύμμετρο και ανομοιογενές σχήμα και μορφολογία. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα (61a), παρατηρείται η ύπαρξη κοιλοτήτων κυκλικών διατομών καθώς και επιφανειών, οι οποίες εμφανίζουν ασυνέχειες (εικόνες 61b, 61c) και προεξοχές (εικόνες 61c, 61d).

#### 5.4.2. DHC-SLNs



Εικόνες 62 a, b, c, d: Απεικονίσεις SEM των DHC-SLNs

Τα DHC-SLNs αντιθέτως, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ομοιογένεια στην μορφολογία τους. Παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ομοιογενούς και δομημένου δικτύου με συμπαγή δομή, (εικόνες 62a, 62b), ενώ εντός του δικτύου αυτού παρατηρείται η ύπαρξη μικρότερων, επίσης συμπαγών, σφαιρικών δομών (εικόνες 62c, 62d) που αποδίδονται πιθανώς στα νανοσωματίδια που έχουν σχηματιστεί.

Να σημειωθεί ότι η επίτευξη μεγαλύτερων μεγεθύνσεων, που θα έδιναν μια καλύτερη εικόνα της μορφολογίας των νανοσωματιδίων, κρίθηκε αδύνατη. Τα νανοσωματίδια απαρτίζονται από λιπίδια με χαμηλό σημείο τήξης, με αποτέλεσμα η ενέργεια που αναπτύσσεται από την πηγή των ηλεκτρονίων

(electron gun) στις μεγαλύτερες μεγεθύνσεις να προκαλεί την τήξη τους, οδηγώντας έτσι σε αλλοίωση της μορφολογίας και της δομής τους.<sup>[34]</sup>

## 5.5. Μελέτη δομής μέσω Υπέρυθρης Φασματομετρίας (FT-IR)

Στο παρόν υποκεφάλαιο, πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη των φασμάτων FT-IR των Blank-SLNs, των DHC-SLNs και των DAPH-SLNs.



Το φάσμα των Blank-SLNs παρουσιάζεται στην εικόνα 63.

**Εικόνα 63:** Φάσμα FT-IR των Blank-SLNs

Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος των Blank-SLNs εμφανίζονται στα 3436.53 cm<sup>-1</sup>, που αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης του Tween 80, στα 2915.84 cm<sup>-1</sup> και 2849.31 cm<sup>-1</sup>, που αποδίδονται στην C-Η δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της TM, της PC και του Tween 80, στα 1736.58 cm<sup>-1</sup>, που αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης της TM και του Tween 80, και στα 1112.73 cm<sup>-1</sup> που αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της TM του Tween 80, ενώ η κορυφή στα 1472.38 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στην C-H δόνηση κάμψης και αυτή στα 1392.35 cm<sup>-1</sup> στην O-H δόνηση κάμψης.

Τα φάσματα των DHC-SLNs και DAPH-SLNs παρουσιάζονται στις εικόνες 64 και 65.



Εικόνα 64: Φάσμα FT-IR των DHC-SLNs



Εικόνα 65: Φάσμα FT-IR των DAPH-SLNs

Συγκρίνοντας τα φάσματα των Blank-SLNs με αυτά των DHC-SLNs και DAPH-SLNs, παρατηρούνται οι ίδιες κύριες κορυφές, όπως αυτές αναλύθηκαν στο φάσμα των Blank-SLNs. Η ομοιότητα μεταξύ των φασμάτων έγκειται, πιθανώς, στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα των νανοσωματιδίων σε φορέα σε σχέση με την βιοδραστική ουσία.

Ωστόσο, σημαντική διαφορά αποτελεί η μετατόπιση της κορυφής που αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης, η οποία εμφανίζεται πλέον στα 3424.96 cm<sup>-1</sup>. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις ομάδες -ΟΗ των μορίων DHC και DAPH, που έχουν εγκλειστεί στα νανοσωματίδια.

## 5.6. Μελέτη υγροσκοπικότητας

Τα βάρη των δειγμάτων μετρήθηκαν αρχικά στη μια και στις δύο εβδομάδες ύστερα από την αποθήκευση τους, ώστε να προσδιοριστεί η άμεση προσρόφηση υγρασίας, και στη συνέχεια στους 5 μήνες, ώστε να προσδιοριστεί η προσρόφηση υγρασίας ύστερα από αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Συνθήκες αποθήκευσης	Αύξηση βάρους-1 εβδομάδα	Αύξηση βάρους-2 εβδομάδες	Αύξηση βάρους- 5 μήνες
Ξηραντήρας	-	-	-
Ψυγείο	8.5%	8.8%	9.4%
Περιβάλλον	5.2%	5.5%	9.6%

Πίνακας 15: Αποτελέσματα μελέτης υγροσκοπικότητας

Παρατηρείται ότι η αποθήκευση τόσο εντός ψυγείου όσο και σε συνθήκες περιβάλλοντος οδηγεί σε αύξηση του βάρους των δειγμάτων ήδη από την 1 εβδομάδα, το οποίο παραμένει πρακτικά σταθερό και στις 2 εβδομάδες, καθώς και ότι η αύξηση είναι μεγαλύτερη κατά την αποθήκευση εντός ψυγείου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κατά την αποθήκευση τους σε αυτές τις συνθήκες, τα δείγματα εμφάνισαν άμεση προσρόφηση υγρασίας. Μετά το πέρας 5 μηνών, το τελικό ποσοστό προσρόφησης υγρασίας είναι το ίδιο, (περίπου 9.5%), και για τις δύο περιπτώσεις.

Παρατηρείται, επιπλέον, ότι η αποθήκευση εντός ξηραντήρα παρουσία αζώτου δεν οδηγεί σε μεταβολή του βάρους. Συμπεραίνεται επομένως ότι η αποθήκευση εντός ξηραντήρα προστατεύει αποτελεσματικά τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια από την προσρόφηση υγρασίας.

# 5.7. Μελέτη απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών από τα νανοσωματίδια

## 5.7.1. Μέθοδος Α

Το παρακάτω διάγραμμα περιγράφει την απελευθέρωση της DHC από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, σύμφωνα με την Μέθοδο Α. Το προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης χαρακτηρίζεται από μια απότομη απελευθέρωση που παρατηρείται στα πρώτα 10 λεπτά, καθώς απελευθερώνεται περίπου το 13% της ένωσης. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη μορίων της ένωσης ασθενώς προσδεμένων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Ακολουθεί μια σταδιακή απελευθέρωση που παρατηρείται μέχρι και τις 5 ώρες, όπου φαίνεται πως η ένωση απελευθερώνεται με σταθερό ρυθμό. Στο διάστημα αυτό απελευθερώνεται περίπου το 77% της ένωσης. Η απελευθέρωση σταδιακά περιορίζεται και αρχίζει να σταθεροποιείται, έως ότου τελικά απελευθερωθεί το 86% της ένωσης.



Διάγραμμα 1: Προφίλ απελευθέρωσης της DHC από την διασπορά

Το κινητικό μοντέλο για την περιγραφή του προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας προσδιορίζεται μέσω της κατάλληλης προσαρμογής των δεδομένων σε γραμμικά συστήματα και επιλέγοντας αυτό με το υψηλότερο R<sup>2</sup>. Την καλύτερη γραμμικότητα με τον υψηλότερο συντελεστή R<sup>2</sup> για τη μέθοδο A παρουσίασαν το κινητικά μοντέλα Korsmeyer-Peppas και Higuchi όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 16: Συντελεστής R<sup>2</sup> για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης-Μέθοδος Α

Μοντέλο	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer- Peppas
<b>R</b> <sup>2</sup>	0.618	0.442	0.860	0.943

Το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas αποτελεί ημι-εμπειρικό μοντέλο και δεν επιλέγεται για τον ακριβή προσδιορισμό της %αθροιστικής απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, καθώς εκφράζει μόνο το 60% αυτής. Επομένως, το μοντέλο που επιλέγεται για την μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Higuchi.

Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Higuchi είναι:

$$y = 17.373x + 11.964$$



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi-Μέθοδος Α

Ωστόσο, η τιμή του εκθέτη διάχυσης n της εξίσωσης Korsmeyer-Peppas υποδεικνύει το μηχανισμό απελευθέρωσης.

Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas είναι:

$$y = 0.4063x + 0.7436$$

Επομένως, η τιμή του εκθέτη διάχυσης, 0.4063, (<0.5) υποδεικνύει την διάχυση κατά Fick ως μηχανισμό απελευθέρωσης.



**Διάγραμμα 3:** Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas-Μέθοδος Α

#### 5.7.2. Μέθοδος Β

Το παρακάτω διάγραμμα περιγράφει την απελευθέρωση της DHC από τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, σύμφωνα με την Μέθοδο Β. Το προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης φαίνεται να προσομοιάζει αυτό της Μεθόδου Α. Αρχικά παρατηρείται μια απότομη απελευθέρωση στα πρώτα 10 λεπτά, κατά την οποία απελευθερώνεται περίπου το 15% της ένωσης, και η οποία συνεχίζει μέχρι και τα 30 λεπτά οπότε και η απελευθέρωση φθάνει το 30%. Στη Μέθοδο Α, συγκρίσιμη απελευθέρωση (28%) εμφανίζεται αργότερα, και συγκεκριμένα στην πρώτη ώρα. Η διαφορά μεταξύ των 2 Μεθόδων έγκειται στο γεγονός ότι, στη Μέθοδο Β, πραγματοποιείται απευθείας διασπορά των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα, επομένως η βιοδραστική ένωση γίνεται γρηγορότερα διαθέσιμη σε αυτό, σε αντίθεση με την Μέθοδο Α. Ακολουθεί μια σταδιακή απελευθέρωση που παρατηρείται μέχρι και τις 5 ώρες, όπου φαίνεται πως η ένωση απελευθερώνεται με σταθερό ρυθμό. Στο διάστημα αυτό έχει απελευθερωθεί περίπου το 77% της ένωσης. Η απελευθέρωση σταδιακά περιορίζεται και τελικά αρχίζει να σταθεροποιείται, έως ότου τελικά απελευθερωθεί το 89% της ένωσης.



**Διάγραμμα 4**: Προφίλ απελευθέρωσης της DHC από τα λυοφιλοποιημένα νανοσωματίδια

Την καλύτερη γραμμικότητα με τον υψηλότερο συντελεστή  $R^2$  παρουσίασαν το κινητικά μοντέλα Korsmeyer-Peppas και Higuchi όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 17:** Συντελεστής  $R^2$  για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης-Μέθοδος B

Μοντέλο	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer- Peppas
<b>R</b> <sup>2</sup>	0.512	0.376	0.803	0.924

Το μοντέλο που επιλέγεται για την μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Β είναι το μοντέλο Higuchi.

Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Higuchi είναι:



y = 18.136x + 17.682



Ο μηχανισμός απελευθέρωσης προκύπτει από την τιμή του εκθέτη διάχυσης n της εξίσωσης Korsmeyer-Peppas.

Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas είναι:

Ο εκθέτης διάχυσης που προκύπτει, 0.3708, είναι χαμηλότερος του 0.5 γεγονός που υποδεικνύει την διάχυση κατά Fick ως μηχανισμό απελευθέρωσης και σε αυτή τη μέθοδο



**Διάγραμμα 6:** Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas-Μέθοδος Β

# 5.8. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των *in vitro* βιοδοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) στα DHC-SLNs και DAPH-SLNs υπό υπό μορφή διασποράς καθώς και στις καθαρές DHC και DAPH:

	Δομή	DPPH 30min IC50 (µM)	DPPH 60min IC50 (µM)			
7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη						
DHC-SLNs	CH <sub>3</sub> OH	36.7	7.1 ± 0.8			
DHC	но он	28.8 ± 5.8	$12.8 \pm 4.1$			
Δαφνετίνη						
DAPH-SLNs		9.5 ± 1.7	4.8 ± 1.5			
DAPH	HO´ Ý `O´ `O OH	18.3 ± 3	9.1 ± 0.1			
Blank-SLNs	-	no	no			

Πίνακας 18: Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης

Ύστερα από μελέτη των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι και οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, με την DAPH, η οποία είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της ιδιότητα, να εμφανίζει ισχυρότερη δράση απ' ότι η DHC. Η αντιοξειδωτική δράση τόσο της DHC όσο και της DAPH οφείλεται στην παρουσία κατεχολικού συστήματος στην δομή τους. Είναι γνωστό ότι η παρουσία κατεχολικού συστήματος στη δομή μιας ένωσης συνεισφέρει στην αντιοξειδωτική της δράση, ενώ ειδικά στην περίπτωση των φλαβονοειδών και των κουμαρινικών αναλόγων έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία όρθο-διυδροξυ συστήματος σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες μέσω συντονισμού.



Εικόνα 66: Κατεχολικό σύστημα δαφνετίνης



Εικόνα 67: Κατεχολικό σύστημα 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης

Όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από τα νανοσωματίδια, παρατηρείται ότι τα DAPH-SLNs εμφανίζουν αναμενόμενα ισχυρότερη δράση σε σχέση με τα DHC-SLNs. Συγκρίνοντας, στη συνέχεια, την αντιοξειδωτική δράση των νανοσωματιδίων με αυτή των καθαρών ενώσεων, αξιοσημείωτο είναι ότι οι διασπορές των νανοσωματιδίων εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις καθαρές ενώσεις στα 60min. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ενώσεις όχι μόνο διατήρησαν την αντιοξειδωτική τους δράση ύστερα από τον εγκλεισμό τους στα νανοσωματίδια, αλλά ότι ο εγκλεισμός οδήγησε τελικώς σε αύξηση της δράσης αυτής.

Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στον συνδυασμό των βιοδραστικών ενώσεων και της λιπιδικής μήτρας των νανοσωματιδίων και στη συνεργιστική τους δράση.<sup>61</sup>

#### 5.9. Μελέτες σταθερότητας φαρμακοτεχνικής μορφής

#### 5.9.1. Μελέτη φυγοκέντρησης

Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 min και σε θερμοκρασία 15 °C και οπτική παρατήρηση των δειγμάτων, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων ή μεταβολή των χαρακτηριστικών των κρεμών, επομένως συμπεραίνεται ότι και οι 4 κρέμες εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα στις συνθήκες αυτές.

#### 5.9.2. Μελέτη θερμοκρασίας

Μετά από αποθήκευση για χρονικό διάστημα 15 ημερών και οπτική παρατήρηση των δειγμάτων στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, δεν παρατηρήθηκε

διαχωρισμός φάσεων ή μεταβολή των χαρακτηριστικών των κρεμών σε κανένα από τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 15 °C.

Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 40 °C εμφάνισαν ελαφρώς αυξημένη ρευστότητα, χωρίς ωστόσο αυτή να προκαλεί αλλοίωση της υφή τους, ενώ επίσης δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων ή κάποια άλλη μεταβολή.

Επομένως, συμπεραίνεται ότι και οι 4 κρέμες εμφανίζουν σημαντική σταθερότητα στις συνθήκες αυτές.

### 5.9.3. Μελέτη κύκλου freeze-thaw

Ύστερα από την οπτική παρατήρηση των δειγμάτων που υποβλήθηκαν στον κύκλο απότομων εναλλαγών θερμοκρασίας, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων ή μεταβολή των χαρακτηριστικών των κρεμών, ούτε κατά την διάρκεια του κύκλου ούτε και στο τέλος αυτού. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει εξαιρετικά σημαντική σταθερότητα των κρεμών, επαρκή για την ασφαλή μεταφορά τους.







с





**Εικόνα 68**: Κρέμες ύστερα από κύκλο freeze-thaw. a) Κρέμα χωρίς ενσωμάτωση. b) Κρέμα με ενσωμάτωση DHC-SLNs. c) Κρέμα με ενσωμάτωση DAPH-SLNs. d) Κρέμα με ενσωμάτωση DHC-SLNs – DAPH-SLNs.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν η δαφνετίνη (DAPH), μια φυσική κουμαρίνη και ένα νέο συνθετικό ανάλογό της, η 7,8-διυδροξυ-3-(4υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (DHC), σε ικανοποιητικές αποδόσεις και η δομή τους τακτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>Η NMR. Τα ανάλογα αυτά επιλέχθηκαν καθώς έχουν παρουσιάσει αξιόλογη βιολογική δράση και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων.

Αρχικά μελετήθηκε ο εγκλεισμός της DHC, ενώ η πρώτη μέθοδος εγκλεισμού που εξετάστηκε ήταν η μέθοδος λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης. Ωστόσο τα DHC-SLNs που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή εμφάνισαν πολύ υψηλή τιμή δείκτη PDI (0.622), η οποία υποδεικνύει σημαντική ανομοιομορφία της διασποράς, και έτσι η μέθοδος αυτή απορρίφθηκε.

Για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής DHC-SLNs εξετάστηκε στη συνέχεια η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη. Ακολούθησε εις βάθος διερεύνηση της κατάλληλης αναλογίας συστατικών, TM:PC:Tween 80, ώστε να προκύψουν νανοσωματίδια με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε σειρά δοκιμών χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες των συστατικών κάθε φορά.

Με βάση τα παραπάνω, βέλτιστη αναλογία για την παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων κρίθηκε η TM:Tween 80:PC = 200:100:50. Τα DHC-SLNs που συντέθηκαν με τη μέθοδο αυτή παρουσίασαν απόδοση διεργασίας 75.9% και απόδοση εγκλεισμού 43.4%. Ακόμη, ύστερα από την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές οι οποίες αφορούσαν τον εγκλεισμό της δαφνετίνης αλλά και τον σχηματισμό Blank-SLNs. Στα DAPH-SLNs υπολογίστηκε απόδοση διεργασίας 59.6% και απόδοση εγκλεισμού 80.5%, ενώ η απόδοση διεργασίας των Blank-SLNs υπολογίστηκε στο 80.3%.

Τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο χαρακτηρίστηκαν στη συνέχεια μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους, και προέκυψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- Στην περίπτωση των DHC-SLNs η μέση υδροδυναμική διάμετρος βρέθηκε 230.7 nm, ενώ στην περίπτωση των DAPH-SLNs 256.7 nm. Και στις δύο περιπτώσεις σχηματίστηκαν εξαιρετικά σταθερές διασπορές (-30.3 mV και -41.3 mV αντίστοιχα), με μέτρια προς καλή ομοιομορφία (PDI 0.385 και 0.367 αντίστοιχα).
- Τα Blank-SLNs εμφάνισαν μέσο μέγεθος 236.3 nm και σχημάτισαν σχετικά σταθερές διασπορές (-18.5 mV), με μέτρια προς καλή ομοιομορφία (PDI 0.38).
- Η μελέτη σταθερότητας 3 μηνών επέδειξε ότι το μέγεθος και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων που αποθηκεύονται σε συνθήκες περιβάλλοντος δεν

μεταβάλλονται σημαντικά. Στην περίπτωση αποθήκευσης εντός ψυγείου, παρατηρείται μικρή αύξηση του μεγέθους, πιθανώς λόγω συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων.

- Η μελέτη επίδρασης της ενέργειας που προσδίδεται, μέσω των υπερήχων αλλά και της ομογενοποίησης, στα νανοσωματίδια κατά την παρασκευή τους, επέδειξε ότι:
- a) η χρήση υπερήχων συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της τιμής του ζδυναμικού, και άρα στην σταθερότητα των νανοσωματιδίων, και
- b) η πρόσδοση πλεονάζουσας ενέργειας προκαλεί την συσσωμάτωση τους, λόγω των υψηλών τιμών κινητικής ενέργειας που αποκτούν, με αποτέλεσμα την αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς.

Αξιολογήθηκε, επίσης, η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των νανοσωματιδίων ως προς την απόδοση εγκλεισμού σε διάστημα ενός μήνα, οπότε και συμπεραίνεται ότι η αποθήκευση αυτών είναι θεμιτό να πραγματοποιείται σε συνθήκες ψύξης, καθώς έτσι αποφεύγεται η ανεπιθύμητη απελευθέρωση της ένωσης και άρα και η μείωση της δραστικότητάς τους.

Ακόμη, μελετήθηκε η μορφολογία των νανοσωματιδίων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Παρατηρήθηκε ότι τα blank-SLNs εμφανίζουν ασύμμετρη και ανομοιογενή μορφολογία, ενώ τα DHC-SLNs χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ομοιογένεια.

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς την δομή τους μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR). Η ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των φασμάτων των Blank-SLNs και των DHC-SLNs και DAPH-SLNs έγκειται, πιθανώς, στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα των νανοσωματιδίων σε φορέα σε σχέση με την βιοδραστική ουσία. Ωστόσο, σημαντική διαφορά αποτελεί η μετατόπιση της κορυφής που αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης, η οποία μπορεί να αποδοθεί στις ομάδες -OH των μορίων DHC και DAPH, που έχουν εγκλειστεί στα νανοσωματίδια.

Ακολούθησε μελέτη της απελευθέρωσης της DHC από τα νανοσωματίδια, τόσο υπό μορφή διασποράς όσο και υπό λυοφιλοποιημένη μορφή, υποδεικνύοντας την εμφάνιση "burst effect" στα πρώτα 30 λεπτά (περίπου 30% απελευθέρωση) για την περίπτωση των λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων και βραδύτερη απελευθέρωση (εμφάνιση περίπου 28% απελευθέρωσης στην πρώτη ώρα) για την περίπτωση της υδατικής διασποράς. Και στις δυο περιπτώσεις, η απελευθέρωση ολοκληρώθηκε στις 24 h, ενώ προέκυψε ότι το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει καλύτερα τα δυο προφίλ είναι το μοντέλο Higuchi. Η τιμή του εκθέτη διάχυσης n όπως προέκυψε από την εξίσωση του ημι-εμπειρικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas υποδεικνύει ως μηχανισμό απελευθέρωσης και στις δύο περιπτώσεις τη διάχυση κατά Fick.

Τα νανοσωματίδια, αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, οπότε και προέκυψε ότι στα 60 min εμφανίζουν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τις καθαρές ενώσεις. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ενώσεις όχι μόνο διατήρησαν την αντιοξειδωτική τους δράση ύστερα από τον εγκλεισμό τους στα νανοσωματίδια, αλλά ότι ο εγκλεισμός οδήγησε τελικώς σε αύξηση της δράσης αυτής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση των υδατικών διασπορών των νανοσωματιδίων σε καλλυντικές κρέμες. Παρασκευάστηκαν έτσι 4 είδη κρεμών, ένα με ενσωμάτωση των DHC-SLNs, ένα με ενσωμάτωση των DAPH-SLNs, ένα με ενσωμάτωση και των δύο ειδών SLNs καθώς και ένα χωρίς SLNs, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την σταθερότητα τους ύστερα από φυγοκέντρηση, αποθήκευση σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υποβολή σε κύκλους απότομης εναλλαγής θερμοκρασιών. Και στις τρεις αυτές περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων ή μεταβολή των χαρακτηριστικών των κρεμών, επομένως οι κρέμες κρίνονται εξαιρετικά σταθερές και η ενσωμάτωση των SLNs σε αυτές, επιτυχής.

# 7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μελλοντικοί στόχοι της παρούσας εργασίας αποτελούν:

- Η περαιτέρω μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού με την μέθοδο της ομογενοποίησης, δεδομένων των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν τόσο από τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων με την μέθοδο DLS, όσο και από τις αποδόσεις διεργασίας και εγκλεισμού.
- Η ολοκληρωμένη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης της δαφνετίνης από τα DAPH-SLNs και η προσπάθεια επίτευξης ελεγχόμενης αποδέσμευσης της από αυτά.
- Η αξιολόγηση της μορφολογίας των νανοσωματιδίων μέσω της τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης Cryo-SEM, η οποία επιτρέπει την παρατήρηση των δειγμάτων σε παγωμένη κατάσταση, προς αποφυγή της τήξης του λιπιδίου και άρα προς επίτευξη μεγαλύτερων μεγεθύνσεων.
- Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων και με άλλες μεθόδους, όπως με τη χρήση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (TGA) με σκοπό την αξιολόγηση των θερμικών τους ιδιοτήτων.
- Η αξιολόγηση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο των τριών μηνών προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία αλλοίωσής τους κατά την μεταφορά και την αποθήκευση.
- Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με περισσότερες *in vitro* μεθόδους, π.χ. αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης (AAPH) καθώς και της ικανότητας τους να αναστέλλουν την δράση του ενζύμου λιποξυγονάσης από σόγια ως ένδειξη της αντιφλεγμονώδους δράσης τους.
- Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των καλλυντικών κρεμών στις οποίες έχουν ενσωματωθεί τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, καθώς και η μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των βιοδραστικών ενώσεων από αυτές.

#### 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Matos, M. J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Abreu, O. A.; Molina, E.; Yordi, E. G. Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. In *Phytochemicals -Isolation, Characterisation and Role in Human Health*; InTech, **2015**. <u>https://doi.org/10.5772/59982</u>.
- Egan Richard, D. O.; Elizabeth O. W.; Dermot Cox; Ena Prosser, K. M.; Douglas Thornes, R. The Pharmacology, Metabolism, Analysis and Applications of Coumarin and Coumarin Related Compounds. *Drug Metabolism Reviews*. 1990, 22, 503-529.
- Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International*. 2013, 1-14. <u>https://doi.org/10.1155/2013/963248</u>.
- Ibrar, A.; Shehzadi, S. A.; Saeed, F.; Khan, I. Developing Hybrid Molecule Therapeutics for Diverse Enzyme Inhibitory Action: Active Role of Coumarin-Based Structural Leads in Drug Discovery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2018, 26, 3731–3762. <u>https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.042</u>.
- 5. Vekariya, R. H.; Patel, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synthetic Communications*. **2014**, *44*, 2756-2788.
- 6. Xu, L.; Wu, Y.-L.; Zhao, X.-Y.; Zhang, W. The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins. In *Proceedings of the 2015 Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference*. **2015**, 135-138. <u>https://doi.org/10.2991/ap3er-15.2015.33</u>
- Detsi, A.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin Derivatives: An Updated Patent Review (2015-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2017, 27, 1201-1226. <u>https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1360284</u>
- 8. Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins And Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*. **2005**, *12*, 887-916.
- Laurin, P.; Ferroud, D.; Klich, M.; Dupuis-Hamelin, C.; Mauvais, P.; Lassaigne, P.; Bonnefoy, A.; Musicki, B. Synthesis And In Vitro Evaluation of Novel Highly Potent Coumarin Inhibitors of Gyrase B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1999**, *9*, 2079-2084.

- 10. Schio, L.; Chatreaux, F.; Loyau, V.; Murer, M.; Ferreira, A.; Mauvais, P.; Bonnefoy, A.; Klich, M. Fine tuning of physico-chemical parameters to optimise a new series of novobiocin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 11(11), 1461-1464. <a href="https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00257-8">https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00257-8</a>
- Sardari, S.; Mori, Y.; Horita, K.; Micetich, R. G.; Nishibe, S.; Daneshtalab, M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **1999**, *7*(9), 1933-1940.

https://doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00138-8

- 12. Fylaktakidou, K.; Hadjipavlou-Litina, D.; Litinas, K.; Nicolaides, D. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory / Antioxidant activities. *Current Pharmaceutical Design*. **2004**, *10*(30), 3813-3833. <u>https://doi.org/10.2174/1381612043382710</u>
- 13. Rohini K, S. P. (2014). Therapeutic role of coumarins and coumarin-related compounds. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, **2014**, *05*(01). https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000130
- 14. Hadjipavlou-Litina, D.; Litinas, K.; Kontogiorgis, C. (2007). The antiinflammatory effect of coumarin and its derivatives. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. **2007**, *6*(4), 293-306. <u>https://doi.org/10.2174/187152307783219989</u>
- 15. Michaelidou, A. S.; Hadjipavlou-Litina, D. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A comparative QSAR study. *Chemical Reviews*. 2005, 105(9), 3235 3271. <u>https://doi.org/10.1021/cr040708m</u>
- 16. Gkionis, L.; Kavetsou, E.; Kalospyros, A.; Manousakis, D.; Garzon Sanz, M.; Butterworth, S.; Detsi, A.; Tirella, A. Investigation Of The Cytotoxicity Of Bioinspired Coumarin Analogues Towards Human Breast Cancer Cells. *Molecular Diversity* 2020. <u>10.1007/s11030-020-10082-6</u>
- 17. Kavetsou, E.; Katopodi, A.; Argyri, L.; Chainoglou, E.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Chroni, A.; Detsi, A. Novel 3-Aryl-5-Substituted-

Coumarin Analogues: Synthesis And Bioactivity Profile. *Drug Development Research* **2020**, *81*, 456-469. <u>https://doi.org/10.1002/ddr.21639</u>

- 18. Kolodziej, H.; Kayser, O.; Woerdenbag, H. J.; Uden, W. V.; Pras, N. Structure -cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 1997, *52*(3-4), 240-244. https://doi.org/10.1515/znc-1997-3-416
- 19. Myers, R. B.; Parker, M.; Grizzle, W. E. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **1994**, *120*(S1), S11-S13. https://doi.org/10.1007/bf01377115
- 20. Kawase, M.; Sakagami, H.; Hashimoto, K.; Tani, S.; Hauer, H.; Chatterjee, S. Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins. *Anticancer research*. **2003**, *23*, 3243-3246.
- 21. Budzisz E.; Brzezinska E.; Krajewska U.; Rozalski M. Cytotoxic effects, alkylating properties and molecular modelling of coumarin derivatives and their phosphonic analogues. *Eur J Med Chem.* **2003**, *38*, 597-603.
- 22. Lee, B.; Lee, S. Y.; Lee, H. J.; Sim, G.; Kim, J.; Kim, J.; Cho, Y.; Lee, D.; Pyo, H.; Choe, T.; Moon, D. C.; Yun, Y. P.; Hong, J. T. Anti-oxidative and photoprotective effects of coumarins isolated from Fraxinus chinensis. *Archives of Pharmacal Research*. **2007**, *30*(10), 1293-1301. <u>https://doi.org/10.1007/bf02980270</u>
- Roussaki, M.; Zelianaios, K.; Kavetsou, E.; Hamilakis, S.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kontogiorgis, C.; Liargkova, T.; Detsi, A. Structural Modifications Of Coumarin Derivatives: Determination Of Antioxidant And Lipoxygenase (LOX) Inhibitory Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2014, 22, 6586-6594.
- 24. Lin, H.; Tsai, S.; Chen, C.; Chang, Y.; Lee, C.; Lai, Z.; Lin, C. Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*. **2008**, *75*(6), 1416-1425. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.11.023</u>

25. Kavetsou, E.; Gkionis, L.; Galani, G.; Gkolfinopoulou, C.; Argyri, L.; Pontiki, E.; Chroni, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Detsi, A. Synthesis Of Prenyloxy Coumarin Analogues And Evaluation Of Their Antioxidant, Lipoxygenase (LOX) Inhibitory And Cytotoxic Activity. Medicinal Chemistry Research 2017, 26, 856-866. 10.1007/s00044-017-1800-6

26. Deshpande, A.; Mohamed, M.; Daftardar, B.S.; Patel, M.; H.S. Boddu, S.; Nesamony, J. Chapter 12 - Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges, Editors: Ashim K. Mitra, Kishore Cholkar, Abhirup Mandal, *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery* and Medical Devices, **2017**, Pages 291-330, ISBN 9780323429788.

https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00012-7.

- 27. Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, 47(2-3), 165-196. <u>https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00105-3</u>
- 28. Gordillo-Galeano, A.; Mora-Huertas, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2018**, *133*, 285-308. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017</u>
- 29. Geszke-Moritz, M.; Moritz, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Materials Science and Engineering: C*, **2016**, *68*, 982-994. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119
- 30. Schwarz, C.; Mehnert, W.; Lucks, J.; Müller, R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release*. **1994**, *30*(1), 83-96. https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90047-7
- Freitas, C.; Lucks, J.; Müller, R. P238 effect of storage conditions on long-term stability of "solid lipid nanoparticles" (SLN) in aqueous dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994, 2(1-2), 178. https://doi.org/10.1016/0928-0987(94)90411-1
- 32. Morel, S.; Ugazio, E.; Cavalli, R.; Gasco, M. R. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. **1996**, *132*(1-2), 259-261.
  https://doi.org/10.1016/0279.5172(05)04299.9

https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04388-8

33. Siekmann, B.; Westesen, K. P234 solid lipid nanoparticles stabilized by tyloxapol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1994**, *2*(1-2), 177. https://doi.org/10.1016/0928-0987(94)90407-3

- 34. Joshi, M. D.; Müller, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, 71(2), 161-172. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003</u>
- 35. Shah, B.; Khunt, D.; Bhatt, H.; Misra, M.; Padh, H. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2015**, *78*, 54-66. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.002</u>
- 36. Shen, J.; Sun, M.; Ping, Q.; Ying, Z.; Liu, W. Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement. *Nanotechnology*. **2009**, *21*(2), 025101. <u>https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/2/025101</u>
- 37. Yuan, H.; Chen, J.; Du, Y.; Hu, F.; Zeng, S.; Zhao, H. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007, 58(2), 157-164. <u>https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.03.002</u>
- 38. Weber, S.; Zimmer, A.; Pardeike, J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2014**, *86*(1), 7-22. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.013
- 39. S. Lombardi Borgia; M. Regehly; R. Sivaramakrishnan; W. Mehnert; H.C. Korting; K. Danker; B. Röder; K.D. Kramer; M. Schäfer-Korting. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement Correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. *J. Control. Release.* 2005, *110*, 151–163. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.045.
- 40. Shah, R.; Eldridge, D.; Palombo, E.; Harding, I. Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability. *Briefs in Pharmaceutical Science* & Drug Development. **2015** <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-10711-0</u>
- 41. Venkateswarlu, V.; Manjunath, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2014, 95(3), 627-638. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.005

- 42. Muchow M.; Maincent P.; Müller R. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. **2008** *34*(12), 1394–1405.
- 43. Müller R.; Radtke M.; Wissing S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* **2008**, *54*, S131–S155
- 44. Shah, R. M.; Malherbe, F.; Eldridge, D.; Palombo, E. A.; Harding, I. H. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2014**, *428*, 286-294. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.04.057
- 45. Shaikh, H.; Kshirsagar, R.V.; Patil, S.G. MATHEMATICAL MODELS FOR DRUG RELEASE CHARACTERIZATION: A REVIEW. **2015**
- 46. Mathematical Models Of Drug Release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems.* **2015**, 63-86. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9</u>
- 47. Roussaki, M.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.; Hamilakis, S.; Detsi, A. A Novel Synthesis Of 3-Aryl Coumarins And Evaluation Of Their Antioxidant And Lipoxygenase Inhibitory Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3889-3892.
- 48. Li, J. J. Fischer–Speier esterification. *Name Reactions.* **2014**, *252–252*. doi:10.1007/978-3-319-03979-4\_105
- 49. Blatt, A. H. The Fries reaction. *Organic Reactions*. **2011**, 342-369. https://doi.org/10.1002/0471264180.or001.11
- 50. Majumder, S.; Majumder, P. L. Further evidence for the mechanism of formation of Coumarin by Perkin reaction from salicylaldehyde and a novel synthesis of 1,1-diphenyl-2(2'-hydroxyphenyl) ethene from O-α,α-diphenylacetylsalicylaldehyde with Et3N. *Proceedings of The 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*. **2007**. https://doi.org/10.3390/ecsoc-11-01310
- 51. Sethna, S.; Phadke, R. The Pechmann reaction. *Organic Reactions*. **2011**, 1-58. <u>https://doi.org/10.1002/0471264180.or007.01</u>

- 52. Sethna, S.; Phadke, R. Organic Reactions. New York: John Wiley & Sons. 1953, 7, 4.
- 53. Lin, J.; Zhang, W.; Jiang, N.; Niu, Z.; Bao, K.; Zhang, L.; Liu, D.; Pan, C.; Yao, X. Total Synthesis Of Bulbophylol-B. Journal of Natural Products 2008, 71, 1938-1941.
- 54. Shimomura, H.; Sashida, Y.; Ohshima, Y. The chemical components of artemisia apiacea Hance. II. More coumarins from the flower heads. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN. 1980, 28(1), 347-348. https://doi.org/10.1248/cpb.28.347
- 55. Trapani, A.; Mandracchia, D.; Di Franco, C.; Cordero, H.; Morcillo, P.; Comparelli, R.; Cuesta, A.; Esteban, M. A. In vitro characterization of 6-Coumarin loaded solid lipid nanoparticles and their uptake by immunocompetent fish cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015, 127, 79-88.

https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.022

- 56. Rao, M. P.; Manjunath, K.; Bhagawati, S. T.; Thippeswamy, B. S. Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection – Preparation, characterisation and in vivo evaluation. International Journal of Pharmaceutics. 2014, 473(1-2), 485-492. https://doi.org/10.1016/j.jpharm.2014.07.027
- 57. Zhang, N.; Ping, Q.; Huang, G.; Xu, W.; Cheng, Y.; Han, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. International Journal of Pharmaceutics. 2006, 327(1-2), 153-159. https://doi.org/10.1016/j.jpharm.2006.07.026
- 58. Islan, G. A.; Tornello, P. C.; Abraham, G. A.; Duran, N.; Castro, G. R. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016, 143, 168-176.

https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.040
- 59. Kathe, N.; Henriksen, B.; Chauhan, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: Principles and limitations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **2014**, *40*(12), 1565-1575. https://doi.org/10.3109/03639045.2014.909840
- 60. Becker Peres, L.; Becker Peres, L.; De Araújo, P. H.; Sayer, C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2016, 140, 317-323. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.033
- 61. Lacatusu, I.; Badea, N.; Murariu, A.; Oprea, O.; Bojin, D.; Meghea, A. Antioxidant activity of solid lipid nanoparticles loaded with Umbelliferone. *Soft Materials.* **2013**, *11*(1), 75-84. https://doi.org/10.1080/1539445x.2011.582914

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 19**: Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της DHC σε αιθανόλη

Συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση (10 <sup>-4</sup> mol/L)	Abs
0.02	0.704	0.951
0.016	0.563	0.763
0.012	0.422	0.576
0.008	0.282	0.380
0.004	0.141	0.195

**Πίνακας 20**: Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της DAPH σε αιθανόλη

Συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση (10 <sup>-4</sup> mol/L)	Abs
0.0166	0.932	0.968
0.01328	0.745	0.775
0.00996	0.559	0.598
0.00664	0.373	0.399
0.00332	0.186	0.209

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ



Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς της DHC (333 nm)



Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς της DAPH (338 nm)

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Γραφική περίληψη3
Image 1: Graphical abstract6
<b>Εικόνα 2:</b> Χημική δομή της <b>a</b> : δαφνετίνης και <b>b</b> : 7,8-διυδροξυ-3-(4-
υδροξυφαινυλο)- 4-μεθυλο-κουμαρίνης4
Image 2: Chemical structure of a: daphnetin and b: 7,8 - dihydroxy - 3-(4-
hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin7
<b>Εικόνα 3:</b> Dipteryx odorata (tonka beans)13
<b>Εικόνα 4:</b> Dipteryx odorata (tonka beans)13
<b>Εικόνα 5:</b> Χημική δομή a: βενζο-α-πυρονών και b: βενζο-γ-πυρονών15
<b>Εικόνα 6:</b> Χημική δομή ουμπελιφερόνης15
Εικόνα 7: Χημική δομή a: ψωραλενίου και b: αγγελικίνης16
<b>Εικόνα 8:</b> Χημική δομή a: ξανθυλετίνης και b: σεσελίνης16
<b>Εικόνα 9:</b> Χημική δομή βαρφαρίνης16
<b>Εικόνα 10:</b> Χημική δομή Novobiocin και Clorobiocin17
<b>Εικόνα 11:</b> Χημική δομή a: Imperatorin και b: Osthole

<b>Εικόνα 12:</b> Χημική δομή a: Esculetin, b: Daphnetin και c: Fraxetin20
<b>Εικόνα 13:</b> Χημική δομή 5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμο-φαινυλο)-4-μεθυλο- κουμαρίνης
<b>Εικόνα 14:</b> Χημική δομή σκοπολετίνης23
<b>Εικόνα 15:</b> Χημική δομή τριμυριστίνης27
<b>Εικόνα 16:</b> Τριμυριστίνη27
<b>Εικόνα 17:</b> Χημική δομή Tween 8029
<b>Εικόνα 18</b> : Tween 8029
<b>Εικόνα 19:</b> Χημική δομή L-α-φωσφατιδυλοχολίνης30
<b>Εικόνα 20</b> : L-α-φωσφατιδυλοχολίνη30
Εικόνα 21: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο ομογενο9οίησης υψηλών στροφών31
<b>Εικόνα 22;</b> Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο θερμής ομογενοποίησης
Εικόνα 23: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο θερμής ομογενοποίησης
Εικόνα 24: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο μικρογαλακτώματος
Εικόνα 25: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο μικρογαλακτώματος με μικροκύματα
Εικόνα 26: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο διπλού
γαλακτώματος35
Εικόνα 27: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ανάδευσης
Εικόνα 28: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο λεπτού
φιλμ και ενυδάτωσης36

Εικόνα 29: Μοντέλα ενσωμάτωσης βιοδραστικών ουσιών. a) Μοντέλο
εμπλουτισμένου περιβλήματος, b) Μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος, c)
Μοντέλο ομοιογενούς μήτρας37
<b>Εικόνα 30</b> : 2-3-4 τριυδροξυακετοφαινόνη51
<b>Εικόνα 31</b> : 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη52
<b>Εικόνα 32:</b> 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη53
<b>Εικόνα 33</b> : Δαφνετίνη54
Εικόνα 34: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο λεπτού
φιλμ και ενυδάτωσης56
Εικόνα 35: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο
γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ανάδευσης57
<b>Εικόνα 36</b> : Λυοφιλοποιημένα DHC-SLNs58
<b>Εικόνα 37</b> : Λυοφιλοποιημένα DHC-SLNs58
<b>Εικόνα 38:</b> Λυοφιλοποιημένα DAPH-SLNs58
Εικόνα 39: Παρασκευή νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων με την μέθοδο
γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ομογενοποίησης υψηλών
στροφών59
<b>Εικόνα 40</b> : Λυοφιλοποιημένα DHC-SLNs ύστερα από ομογενοποίηση: a) 15000 rpm. b)11000 rpm
<b>Εικόνα 41:</b> Λυοφιλοποιημένα Blank-SLNs60
Εικόνα 42: Απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανοσωματίδια
στερεών λιπιδίων με την μέθοδο Α63
<b>Εικόνα 43</b> : Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate)65
<b>Εικόνα 44:</b> Παρασκευή φαρμακοτεχνικής μορφής (κρέμας)66
<b>Εικόνα 45</b> : Φαρμακοτεχνική μορφή (κρέμα)66
<b>Εικόνα 46:</b> Φάσμα <sup>1</sup> Η NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

<b>Εικόνα</b> μεθυλο-κ	<b>47:</b> Φα κουμαρ	άσμα <sup>1</sup> Η ΝΜΙ ίνης	R της 3-(·	4-ακε	τυλοξυα	φαινυλ	.o)-7,8-διαι	ετυλοξυ-4 7	 0
<b>Εικόνα</b> κουμαρίν	<b>48:</b> Φά /ης	ασμα <sup>1</sup> Η NMR	της 7,8-δ	διυδρα	οξυ-3-(4	<b>1-</b> υδρο	ξυφαινυλο	)-4-μεθυλα 7	)- 1
Εικόνα 4	<b>!9:</b> Φάα	σμα <sup>1</sup> Η NMR τ	ης δαφνετ	ίνης				7	2
<b>Εικόνα</b> ! υδροξυφ	<b>50:</b> Συγ αινυλο	κριτικό φάσμ )- 4-μεθυλο-κ	α <sup>1</sup> Η NMR ουμαρίνης	του ι	ζήματο	ς και τι	ງç 7,8 -δເນð	ροξυ- 3-(4 7	3
Εικόνα 5	<b>51:</b> Συγ	κριτικό φάσμ	α <sup>1</sup> H NMR	του ι	ζήματος	ς και τι	ις τριμυρισ	τίνης74	4
<b>Εικόνα</b> φωσφατ	<b>52:</b> ιδυλοχ	Συγκριτικό ολίνης	φάσμα	<sup>1</sup> H	NMR	του	ιζήματος	και τη 7!	ς 5
Εικόνα 5	<b>53:</b> Ενδ	εικτική καται	ομή μεγέθ	θους τ	ων DH(	C-SLNs		78	8
Εικόνα 5	<b>54:</b> Ενδ	εικτικό ζ-δυνο	αμικό των	DHC-	SLNs			78	8
Εικόνα 5	<b>55:</b> Κατ	ανομή μεγέθα	ους των DI	HC-SL	Ns ύστε	ερα απ	ό φιλτράρι	σμα79	9
Εικόνα 5	<b>56:</b> ζ-δι	υναμικό των Ε	HC-SLNs	ύστερ	α από φ	ριλτρά	ρισμα	79	9
Εικόνα 5	<b>57</b> : Ενδ	εικτική καται	ομή μεγέθ	θους τ	ων DAF	PH-SLN	[s	8	0
Εικόνα 5	<b>58:</b> Ενδ	εικτικό ζ-δυνο	αμικό των	DAPH	I-SLNs			80	0
Εικόνα 5	<b>59:</b> Ενδ	εικτική καταν	ομή μεγέθ	θους τ	ων Blaı	nk-SLN	S	8	1
Εικόνα (	5 <b>0:</b> Ενδ	εικτικό ζ-δυνα	αμικό των	Blank	x-SLNs			82	1
Εικόνα θ	5 <b>1:</b> Απε	εικονίσεις SEM	l των Blan	k-SLN	ls			8	5
Εικόνα (	5 <b>2:</b> Απε	εικονίσεις SEM	Ι των DHC	-SLNs	5			8	6
Εικόνα (	<b>53:</b> Φάα	σμα FT-IR των	Blank-SL	Ns				87	7
Εικόνα (	<b>54:</b> Φάα	σμα FT-IR των	DHC-SLN	[s					3
Εικόνα (	<b>55:</b> Φάα	σμα FT-IR των	DAPH-SL	Ns					3
Εικόνα (	5 <b>6</b> : Κατ	εχολικό σύστ	ημα δαφν	ετίνης				9	5
<b>Εικόνα</b> ( κουμαρίν	6 <b>7</b> : Κα΄ /ης	τεχολικό σύσ	τημα 7,8-8	διυδρο	οξυ-3-(4	<b>Ι-</b> υδρο	ξυφαινυλο	)-4-μεθυλο 9	)- 5

#### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης45
<b>Σχήμα 2:</b> Συνθετική πορεία 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4- μεθυλο-κουμαρίνης
<b>Σχήμα 3:</b> Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο- κουμαρίνης
<b>Σχήμα 4:</b> Συνθετική πορεία δαφνετίνης46
<b>Σχήμα 5</b> : Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης46
<b>Σχήμα 6:</b> Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer47
<b>Σχήμα 7:</b> Αναδιάταξη Fries48
<b>Σχήμα 8.</b> Τροποποιημένη αντίδραση Perkin-Oglialoro48
<b>Σχήμα 9:</b> Μετατροπή μηλικού οξέος49
<b>Σχήμα 10:</b> Αντίδραση Pechmann49

### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα και προοπτικές νανοσωματιδίων στερεών
λιπιδίων24
Πίνακας 2: Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα λιπίδια στην παρασκευή των
νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων26
Πίνακας 3: Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες
στην παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων
<b>Πίνακας 4:</b> Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas43
Πίνακας 5: Υλικά της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νανοσωματιδίων
στερεών λιπιδίων

Πίνακας 6: Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής
νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων55
Πίνακας 7: Αναλογίες παρασκευής DHC-SLNs με την μέθοδο
γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη57
<b>Πίνακας 8</b> : Συνθήκες στροφών και χρόνου υπερήχων59
<b>Πίνακας 9</b> : Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας64
<b>Πίνακας 10</b> : Τιμές pH των διαφόρων ειδών κρεμών67
Πίνακας 11: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης
εγκλεισμού των DHC-SLNs για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης
του διαλύτη, με μαγνητική ανάδευση76
Πίνακας 12: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης
εγκλεισμού των DAPH-SLNs και Blank-SLNs για την μέθοδο
γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, με μαγνητική ανάδευση80
Πίνακας 13: Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης
εγκλεισμού των DHC-SLNs για την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης
του διαλύτη, με ομογενοποίηση υψηλών στροφών82
Πίνακας 14: Μελέτη σταθερότητας της υδατικής διασποράς ως προς το μέγεθος,
τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό83
<b>Πίνακας 15</b> : Αποτελέσματα μελέτης υγροσκοπικότητας89
Πίνακας 16: Συντελεστής R <sup>2</sup> για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης-
Μέθοδος Α90
Πίνακας 17: Συντελεστής R <sup>2</sup> για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης-
Μέθοδος Β92
<b>Πίνακας 18:</b> Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης94
Πίνακας 19: Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της DHC
σε αιθανόλη106
<b>Πίνακας 20:</b> Τιμές απορρόφησης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της DAPH
σε αιθανόλη106

# ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Διάγραμμα 1</b> : Προφίλ απελευθέρωσης της DHC από την διασπορά90
Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi-Μέθοδος
A91
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas-
Μέθοδος Α91
Διάγραμμα 4: Προφίλ απελευθέρωσης της DHC από τα λυοφιλοποιημένα
νανοσωματίδια92
Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi-Μέθοδος
B93
Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas-
Μέθοδος Β93
<b>Διάγραμμα 7</b> : Καμπύλη αναφοράς της DHC (333 nm)108
<b>Διάγραμμα 8:</b> Καμπύλη αναφοράς της DAPH (338 nm)108