Αικατερίνη Σπανού

ΔΠΜΣ ΕΤΥ

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΔΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



«ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΠΑΝΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

AOHNA 2021

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS IPP MATERIAL SCIENCE AND ENGINEERING LABORATORY OF ORGANIC CHEMISTRY



"SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ENCAPSULATION OF COUMARIN DERIVATIVES IN LIPID NANOPARTICLES"

MASTER THESIS AIKATERINI SPANOU

<u>SUPERVISOR</u>: ANASTASIA DETSI ASSOCIATE PROFESSOR OF N.T.U.A.

ATHENS 2021

2

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, του τμήματος Χημικών Μηχανικών Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, στα πλαίσια του Διατμηματικού-Διεπιστημονικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών. Υπεύθυνη του εργαστηρίου και επιβλέπουσα καθηγήτρια ήταν η κυρία Δέτση Αναστασία, αναπληρώτρια καθηγήτρια της σχολής Χημικών Μηχανικών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην κυρία Δέτση, που μου παρείχε την ευκαιρία εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, καθώς και για την αμέριστη βοήθεια και συμβουλευτική κατεύθυνση για την πορεία του πειραματικού σχεδιασμού. Παρόλη τη δύσκολη συνθήκη ολοκλήρωσης πειραματικών σκοπών λόγω της παρούσας πανδημίας Covid-19, η κυρία Δέτση με αδιάκοπο ενδιαφέρον, πρωτίστως για την εξασφάλιση της ατομικής και συλλογικής υγείας, αλλά και για τη συνέχιση του ερευνητικού οράματος, παρείχε την απαραίτητη ηθική και επιστημονική στήριξη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα Κατωπόδη Αννίτα για τη προσοδοφόρα συνεργασία, τόσο στο επίπεδο γνώσεων, όσο και στο επίπεδο διαμόρφωσης ορθού προτύπου συμπεριφοράς στο εργαστηριακό περιβάλλον, πάντα με αλληλοσεβασμό και αμοιβαία στήριξη. Ειλικρινώς, ευχαριστώ βαθύτατα για το αδιάκοπο ενδιαφέρον της για την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, την ανιδιοτελή προσφορά γνώσεων και στήριξης σε κάθε εμπόδιο για την επίτευξη ενός πειραματικού στόχου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, ξεχωρίζοντας τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Καβέτσου Ελένη, η οποία με την καταλυτική παρουσία της συνέδραμε στην επίλυση οποιουδήποτε ζητήματος, όσο δύσκολο και αν φάνταζε.

<u>Συντομογραφίες</u>

- DLS: Dynamic Light Scattering Δυναμική Σκέδαση Φωτός
- DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ
- DSC: Differential Scanning Calorimetry Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
- FTIR: Fourrier Transform InfraRed Spectroscopy Φασματοσκοπία υπερύθρου
- HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance Ισορροπία Υδρόφιλου-Υδρόφοβου
- NLCs: Nanostructured Lipid Carriers Νανοδομημένων Σωματιδίων Στερεών Λιπιδίων
- NMR: Nuclear Magnetic Resonance Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητισμού
- PC: Phospatidilocholine Φωσφατιδυλοχολίνη
- SEM: Scanning Electron Microscopy Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Σάρωσης
- Span 60: Sorbitan monostearate Μονοστεατική σορβιτάνη
- SLNs: Solid Lipid Nanoparticles Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων
- TM: Trimyristin Τριμυριστίνη
- TGA: Thermogravimetric Analysis Θερμοσταθμική Ανάλυση
- Tween 80: Polysorbate 80

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια σημαντική οικογένεια φυσικών ή/και συνθετικών ετεροκυκλικών ενώσεων και απαντώνται σε πολλά είδη φυτών είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως γλυκοζίτες. Παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών δράσεων, όπως είναι η αντιφλεγμονώδης, η αντικαρκινική και η αντιοξειδωτική δράση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, καθώς και η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός κατάλληλων λιπιδικών νανοσυστημάτων. Η πλειονότητα των κουμαρινικών ενώσεων παρουσιάζει λιπόφιλο χαρακτήρα, καθιστώντας αδύνατη τη διάλυση αυτών σε υδατικό περιβάλλον που επικρατεί στο εσωτερικό ζώντος οργανισμού. Επομένως, καθίσταται απαραίτητη η μεταφορά τους σε ειδικά συστήματα, αυξάνοντας την υδατοδιαλυτότητά τους. Τέτοιου είδους συστήματα αποτελούν τα λιπιδικά νανοσωματίδια.



Μοριακοί τύποι κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Απεικονίζονται a) 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνη, b) 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και c) 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ŋ σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων, που συγκαταλέγονται στην ευρύτερη ομάδα των κουμαρινών. Αναλυτικότερα, συντέθηκαν 3 κουμαρινικά ανάλογα, εκ των οποίων η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο κουμαρίνη, η 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο κουμαρίνη και η 7-υδροξυ-4-φαινυλο κουμαρίνη. Και οι 3 συνθετικές πορείες ακολουθούν το μηχανισμό συμπύκνωσης "Pechmann". Ακολούθησε χαρακτηρισμός των ενώσεων με Φασματοσκοπία ¹Η NMR, καθώς και αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους «in vitro», σύμφωνα με την τεχνική αναστολής της ρίζας DPPH. Το πείραμα DPPH επέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση μόνο για την 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο κουμαρίνη και η τιμή IC_{50} άγγιξε την τιμή 12.7 μM.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή λιπιδικών φορέων της επιλεχθείσας βιοδραστικής ουσίας, με σκοπό την ανάπτυξη φορέα βιοδραστικής ουσίας με βέλτιστες χημικές και φυσικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά είδη λιπιδικών νανοσωματιδίων με την τεχνική γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη: τα Σωματίδια Στερεών Λιπιδίων, (SLNs), τα Νανοδομημένα Σωματίδια Στερεών Λιπιδίων (NLCs) και τέλος τα Νιοσώματα. Επακόλουθο βήμα αποτέλεσε ο δομικός, μορφολογικός και θερμικός χαρακτηρισμός τους με τη βοήθεια των αναλυτικών τεχνικών DLS, TGA, SEM και Φασματοσκοπίας UV-VIS και FTIR.

Το σύστημα SLNs επέδειξε μέγεθος 265.2 nm, PDI = 0.368 και ζ-δυναμικό ίσο με - 26.1 mV, καθώς η απόδοση εγκλεισμού ανήλθε σε 79%. Το σύστημα NLCs αντίστοιχα μέγεθος 260 nm, PDI = 0.436 και ζ-δυναμικό ίσο με -29.5 mV, καθώς η απόδοση εγκλεισμού ήταν ίση με 84%. Τέλος, το σύστημα των Νιοσωμάτων επέδειξε μέγεθος 238.2 nm, δείκτη PDI = 0.333 και ζ-δυναμικό ίσο με -28.7 mV, καθώς η απόδοση εγκλεισμού ήταν ίση με 30%. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε μελέτη κινητικής μοντελοποίησης της απελευθέρωσης της κουμαρινικής ένωσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση βιοδραστικότητας με την τεχνική αναστολής ελεύθερης ρίζας DPPH, καθώς πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ για τα 3 λιπιδικά νανοδωματίδια. Τα SLNs επέδειξαν IC₅₀ ίσο με 15.7 μM, τα NLCs 13.2 μM και τέλος τα Νιοσώματα 19.7 μM.

Λέξεις κλειδιά: Κουμαρινικά ανάλογα, Μεταφορά Φαρμακευτικών ουσιών, Νανοσυστήματα Στερεών Λιπιδίων, αντιοξειδωτική δράση, απελευθέρωση βιοδραστικής ουσίας

<u>ABSTRACT</u>

Coumarins are an important family of natural and / or synthetic heterocyclic compounds and are found in many plant species either in free form or as glycosides. They have a number of biological effects, such as anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant activity.

In the present work, the synthesis of new coumarin analogs with remarkable antioxidant activity as well as the development and characterization of suitable lipid nanosystems was studied. The majority of coumarin compounds are lipophilic in nature, making it impossible to dissolve them in an aqueous environment that predominates within a living organism. Therefore, it becomes necessary to transfer them to special systems, increasing their water solubility. Such systems are lipid nanoparticles.



Molecular structures of the synthesized coumarin compounds: a) 7,8-dihydroxy-4-phenyl-coumarin, b) 5,7dihydroxy-4-phenyl-coumarin and c) 7-hydroxy-4-phenyl-coumarin.

Initially, the synthesis of bioactive compounds, which belong to the wider group of coumarins, took place. More specifically, three coumarin analogs were synthesized, of which 7,8-dihydroxy-4-phenyl coumarin, 5,7-dihydroxy-4-phenyl coumarin and 7-hydroxy-4-phenyl coumarin. All three synthetic pathways follow the "Pechmann" condensation mechanism. This was followed by characterization of the compounds by ¹H NMR spectroscopy, as well as evaluation of their antioxidant activity "*in vitro*", according to the DPPH free radical scavenging assay. 7,8-Dihydroxy-4-phenyl coumarin showed the best DPPH scavenging ability among the three tested coumarin analogues (IC₅₀ 12.7 μ M).

Subsequently, lipid carriers of the selected bioactive substance were prepared, with the aim of developing a bioactive carrier with optimal chemical and physicochemical properties. More specifically, 3 different types of lipid nanoparticles were prepared by solvent emulsification and evaporation technique: Solid Lipid Particles (SLNs), Nanostructured Solid Lipid Particles (NLCs) and finally Nosomes. The next step was their structural, morphological and thermal characterization with the help of analytical techniques DLS, TGA, SEM and UV-VIS and FTIR spectroscopy.

The SLNs system showed mean particle size of 265.2 nm, PDI = 0.368 and z-potential equal to -26.1 mV, whereas the encapsulation efficiency was 79%. The NLCs system showed mean particle size 260 nm, PDI = 0.436 and z-potential equal to -29.5 mV,

whereas the encapsulation efficiency was 84%. Finally, the Niosome system showed a mean particle size of 238.2 nm, PDI = 0.333 and z-potential equal to -28.7 mV, whereas the encapsulation efficiency reached 30%. In addition, a kinetic modeling study of the release of the coumarin compound was performed. Finally, a bioactivity evaluation was performed with the DPPH free radical scavenging assay, as the IC₅₀ value for the three lipid nanoparticles was determined. The SLNs showed an IC₅₀ of 15.7 μ M, the NLCs 13.2 μ M and finally the Niosomes 19.7 μ M.

Keywords: Coumarin analogues, Drug Delivery, Solid Lipid Nanosystems, antioxidant activity, release of bioactive substance

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1Κουμαρίνες1	12
1.1.1. Φυσική προέλευση κουμαρινών1	.2
1.2 Βασική χημική δομή κουμαρινών1	12
1.3. Βιολογικές ιδιότητες κουμαρινών1	.4
1.3.1 Αντιοξειδωτική	.4
1.3.2. Αντιφλεγμονώδης	16
1.3.3. Αντιμικροβιακή	17
1.3.4. Αντιμυκητιακή	18
1.3.5. Αντικαρκινική	18
1.4. Λιπιδικά Νανοσωματίδια ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών1	.9
1.5 SLNs	1
1.6 NLCs	31
1.7 Σύγκριση NLCs – SLNs	34
1.8 Νιοσώματα	36
1.9 Χαρακτηρισμός κουμαρινικών αναλόγων	39
1.9.1 Φασματοσκοπία 1Η NMR	39
1.9.2 Φασματοσκοπία UV-VIS	40
1.9 Δομικός, Μορφολογικός και χημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών νανοσωματιδίων4	1
1.10 Αξιολόγηση βιοδραστικότητας -Δοκιμασία DPPH4	6
1.11 Κινητική μοντελοποίηση απελευθέρωσης βιοδραστικής ουσίας	48
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ5	52
2.1 Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων5	52
2.1.1 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων	52
2.2 Μηχανισμοί αντιδράσεων5	54
Πειραματικός σκοπός	56
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ5	9
3.1 Οργανολογία	59
3.2 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων	50

3.3 Παρασκευή Νανοσωματίδιων	64
3.4 Χαρακτηρισμός κουμαρινικών αναλόγων	70
3.5 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων	71
3.6 Δομικός, μορφολογικός και χημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών νανοσωματιδίων	74
3.7 Μελέτη απελευθέρωσης εγκλεισμένης ένωσης – Release	76
3.8 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρικικών αναλόγων και λιπιδικών νανοσωματιδίων – Δοκιμασία DPPH	77
4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	78
4.1 Φασματοσκοπική μελέτη 1Η NMR	78
4.2 Αξιολόγηση βιοδραστικότητας Κουμαρινικών Αναλόγων-Δοκιμασία DPPH	31
4.3 Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού, Μέγεθος, δείκτης PDI και ζ-δυναμικόδ	35
4.4 Δομικός χαρακτηρισμός λιπιδικών συστημάτων με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας FTIR 9) 5
4.5 Μελέτη απελευθέρωσης κουμαρινικής ένωσης (a) σε σύστημα SLNs-Κινητικό μοντέλο10	02
4.6 Αξιολόγηση συστημάτων λιπιδικών νανοσωματιδίων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)	11
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ1	17
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ12	19
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ12	20
ПАРАРТНМА	25

ΜΕΡΟΣ Α

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ι. ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ-ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

1. Κουμαρίνες

1.1 Φυσική προέλευση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες αποτελούν ενώσεις που απομονώθηκαν σε πληθώρα φυτών. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες σε σπόρους, ρίζες και φύλλα πολλών ειδών φυτών, ιδίως σε υψηλή συγκέντρωση στο φασόλι "Τόνκα" (Tonka beans- Dipteryx Odorata). Το όνομα τους προέρχεται από την γαλλική λέξη "Coumarou", η μετάφραση του οποίου δόθηκε για τα φασόλια "Τόνκα". Εμφανίζεται επίσης σε γρασίδι βανίλιας (Anthoxanthum odoratum), γλυκό ξύλο (Galium odoratum), γλυκό γρασίδι (Hierochloe odorata) και γλυκό τριφύλλι (γένος Melilotus), το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό γλυκαντικών ουσιών. Άλλα φυτά με σημαντική περιεκτικότητα σε κουμαρίνη αποτελεί το Cassia Cinnamon (Cinnamomum Cassia), και σε πολλές ποικιλίες δέντρων κερασιάς (του γένους Prunus). Η κουμαρίνη απομονώνεται φυσικά και σε πολλά βρώσιμα φυτά, όπως φράουλες, κούμαρα, μαύρες σταφίδες, βερίκοκα και κεράσια [1,2].

Πέρα από την ανίχνευσή τους σε μέλη φυτικών οργανισμών, συναντώνται και σε πληθώρα μικροοργανισμών και ζωικών οργανισμών, όπως σε μιρκοοργανισμούς που παρασιτούν σε φυτικούς οργανισμούς (Arabidopsis thaliana) και αντιστοίχως φυτοφάγους οργανισμούς (χελώνες) [3].

1.2 Βασική Χημική δομή Κουμαρινών

Οι κουμαρίνες κατατάσσονται στην ευρύτερη ομάδα των βενζοπυρονών (C₃H₆), οι οποίες αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία ομάδα πυρόνης (pyrone). Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τη θέση υποκατάστασης της καρβονυλικής ομάδας, σε βενζο-α-πυρόνες (στον α- άνθρακα) στις βενζο-γ-πυρόνες (στον γ- άνθρακα). Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι κουμαρινικές ενώσεις που θα μας απασχολήσουν στη συνέχεια, ενώ στην δεύτερη άλλου τύπου ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή.



[A] α-Benzopyrone



Εικόνα 1. Μοριακή δομή βενζοπυρονών, όπου [Α] η α-βενζοπυρόνη και [Β] η β-βενζοπυρόνη.

Οι κουμαρινικές ενώσεις ονομάζονται και 2*H*-Chromen-2-one ή 1,2-benzopyrone, κατά IUPAC. Οι περισσότερες κουμαρινικές ενώσεις παρουσιάζουν υποκατάσταση είτε στο βενζολικό, είτε στον πυρονικό δακτύλιο. Μία συνήθης υποκατάσταση είναι υδρόξυ ή μεθόξυ ομάδων (-OH ή -CH₂OH) στον βανζολικό δακτύλιο, συνήθως στη θέση 7. Ανάλογα με τις διαφορετικές πιθανές υποκαταστάσεις οι κουμαρίνες κατατάσσονται σε 4 βασικές υποκατηγορίες, οι οποίες είναι οι εξής:

<u>Απλές κουμαρίνες</u>

Η κατηγορία αυτή αποτελείται από ενώσεις υποκατεστημένες με υδροξυ-, αλκοξυκαι αλκυλο- ομάδες στον βενζολικό δακτύλιο, καθώς και τους αντίστοιχους γλυκοζίτες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα απλής κουμαρίνης είναι η 7-υδρόξυ κουμαρίνη ή αλλιώς ουμπελιφερόνη (umbelliferone), μια από τις πιο διαδεδομένες κουμαρινικές ενώσεις.



Εικόνα 2. Μοριακή δομής ουμπελιφερόνης

<u>Πυρανοκουμαρίνες</u>

Οι πυρανοκουμαρίνες παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις φουρανοκουμαρίνες, με τη διαφορά ότι αποτελούνται από έναν εξαμελή πυρονικό δακτύλιο συνδεδεμένο με το βασικό ανθρακικό σκελετό των κουμαρινών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν η ξανθυλετίνη (xanthyletin) και η



Εικόνα 3. Μοριακή δομή α) ξανθυλετίνης και β) σεσελίνης

σεσελίνη (seselin).

<u>Φουρανοκουμαρίνες</u>

Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούνται από έναν πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με το βασικό ανθρακικό σκελετό των κουμαρινών. Ο δακτύλιος αυτός δύναται να είναι συνδεδεμένος είτε γραμμικά είτε υπό γωνία. Τα δύο πιο γνωστά παράγωγα είναι το μόριο του ψωραλενίου (psoralen) και της αγγελικίνης (angelicin).



Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο

Οι συνήθεις υποκαταστάσεις είναι στις ανθρακικές θέσεις 3- ή 4- ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας κουμαρινικής ένωσης είναι η βαρφαρίνη (warfarin).



Εικόνα 5. Μοριακή δομή βαρφαρίνης

1.3 Βιολογική δραστικότητα κουμαρινών

Οι κουμαρινικές ενώσεις επιδεικνύουν πέρα από χημική και βιολογική δραστικότητα. Οι πιο σημαντικές εξ αυτών είναι η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντικαρκινική δράση που επιδεικνύουν. Ακολούθως αναλύεται αυτοτελώς η βιοδραστικότητά τους.

1.3.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που αναστέλλουν την οξείδωση, μια χημική αντίδραση που μπορεί να παράγει ελεύθερες ρίζες με ακόλουθες αλυσιδωτές αντιδράσεις που μπορεί να βλάψουν ζωντανά κύτταρα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές χημικές οντότητες, όπως άτομα, μόρια ή ιόντα που διαθέτουν μονήρη

ηλεκτρόνια. Συνήθως τέτοιες χημικές οντότητες συναντώνται σε μόρια που περιέχουν στοιχεία οξυγόνου, αζώτου και θείου. Τέτοια μόρια συνοψίζονται στις κατηγορίες δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), δραστικών μορφών αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και δραστικών μορφών θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) [4,5]

Παραδείγματα ελευθέρων ριζών που ανήκουν στις ROS, είναι το ανιόν υπεροξειδίου $-O^{2-}$, η ρίζα υδροξυλίου -OH, αλλά και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού κι έχουν σημαντικό ρόλο σε αντιδράσεις μεταγωγής σήματος στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, στην έκφραση γονιδίων, στη μεταφορά ιόντων, αλλά και σε άλλες λειτουργίες του οργανισμού. Ωστόσο, εάν η ισορροπία μεταβληθεί και οι συγκεντρώσεις ROS αυξηθούν σημαντικά μπορεί να προκληθεί καταστροφή πολλών χημικών μορίων, απαραιτήτων για τη λειτουργικές ανάγκες ζωντανών κυττάρων, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, μόρια DNA ή RNA.

Τα αντιοξειδωτικά δρουν καταστέλλοντας την ύπαρξη ελεύθερων ριζών και των αλυσιδωτών αντιδράσεών τους. Αποτελούν μόρια που είναι κυρίως δέκτες ηλεκτρονίων, αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες, εξισορροπώντας την περίσσεια ηλεκτρονιακού φορτίου και σταθεροποιώντας το σε μια θερμοδυναμικά σταθερότερη δομή. Συνήθως αποτελούν μόρια δότες υδρογόνου (hydrogendonating), που περιλαμβάνουν χαρακτηριστικές ομάδες υδροξυλίου στο βενζολικό δακτύλιο, φαινολικές ομάδες, αλλά και ομάδες -NH, -SH.

Ως χημικά μόρια παρουσιάζουν έντονη φαρμακευτική δράση, καθώς αποτρέπουν το οξειδωτικό στρες ζωντανών ιστών και κυττάρων, με σοβαρές επιπτώσεις συνολικά στον οργανισμό, όπως την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μάλιστα, συνεισφέρουν σημαντικά στην αποτροπή γήρανσης του δέρματος, ως συστατικό προϊόντων κοσμητολογίας. Κυριότερες φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα φρούτα και τα λαχανικά. Μόρια φυτικής προέλευσης με χαρακτηριστική αντιοξειδωτική δράση ανήκουν στις ομάδες Καροτενοειδών (Carotenoids), Κουμαρινών (Coumarins), Φλαβονοειδών (Flavonoids), Κατεχινών (Catechins), Ταννινών (Tannines), Λυκοπενίου (Lycopene), Βιταμινών (Vitamin C) και πολλών άλλων.

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα γύρω από την αντιοξειδωτική δράση έχει επεκταθεί σημαντικά, λόγω του δυνητικού οφέλους στην πρόληψη ασθενειών και προαγωγή της υγείας. Πολλά ερευνητικά μοντέλα έχουν δημιουργηθεί για τις μελέτες μηχανισμών δράσης των αντιοξειδωτικών καθώς και αναγνώριση νέων αντιοξειδωτικών, ιδίως φυσικής προέλευσης. Στην παρούσα εργασία που εξετάζεται η σύνθεση κουμαρινικών ενώσεων και η αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση αυτών, αξίζει να γίνει αναφορά σε κουμαρινικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Η εσκουλετίνη (6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη) είναι ένα κουμαρινικό παράγωγο που αναστέλλει την λιποξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση, μεταβολικά μονοπάτια του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (arachidonate acid)[6,7].



Εικόνα 6. Μοριακή δομή εσκουλετίνης.

Επιπλέον, σημαντική αντιοξειδωτική δράση επιδεικνύει 4-μεθυλοκουμαρίνες που διαθέτουν δύο υδροξυλομάδες τοποθετημένες σε όρθο θέση μεταξύ τους στο βενζολικό δακτύλιο και έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν εξαιρετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες [8]. Στην πραγματικότητα οι υδροξυκουμαρίνες μπορούν να συμπεριφέρονται όπως άλλες αντίστοιχες αντιοξειδωτικές ομάδες, όπως η φαινόλη ή η κινόλη, που λόγω ύπαρξης συντονισμού προκαλούν απεντοπισμό του μονήρους ηλεκτρονίου και κατ'επέκταση θερμοδυναμική σταθερότητα.

Η προκύπτουσα ρίζα φαινοξυλίου ή η ημικινόνη μπορεί είτε να σταθεροποιηθεί με την παρουσία ογκώδων υποκαταστατών ή με ύπαρξη ομάδων που δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων στο σύστημα δακτυλίου [9]



Εικόνα 7. Μοριακή δομή 7,8 διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης

1.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονώδης αντίδραση αποτελεί μία δράση άμυνας του οργανισμού, ως προς οποιοδήποτε αντιγόνο που αντιμετωπίζει, αλλά και ενδεχόμενα τραυματισμού. Χαρακτηρίζεται από τη σειρά συμπτωμάτων ερυθρότητας, τοπικής αύξησης θερμοκρασίας, οιδήματος, πόνου και διαταραχές ιστών.

Οι κουμαρινικές ενώσεις, πέρα από αντιοξειδωτική δράση, επιδεικνύουν και αντιφλεγμονώδη δράση. Αναλυτικότερα, αποδείχθηκαν ικανές για τη μείωση του πρηξίματος σε ζώντα ιστό. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης δεν είναι σαφής, φαίνεται ότι οι κουμαρίνες δεν λειτουργούν μειώνοντας τη ροή στα τριχοειδή αγγεία, αλλά είναι πιο πιθανό να μεταφέρονται μέσω κυκλοφορίας σε μικροαγγεία.

Οι κουμαρίνες και ο πρωτεϊνικός φορέας τους αντιμετωπίζονται ως στόχος των μακροφάγων, μειώνοντας την εξωαγγειακή πρωτεΐνη. 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, τα φαγοκύτταρα παράγουν υπεροξειδικές ρίζες στο σημείο της ελεύθερες ρίζες υδροξυλίων (•OH).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα κουμαρινικών ενώσεων που επιδεικνύουν αντιφλεγμονώδη δράση είναι το ψωραλένιο (psoralene), ιμπεροτονίνη (imperatorin) και η σεσελίνη (seselin), ενώσεις που εξετάστηκαν κατά του οιδήματος του αυτιού σε ποντίκια. Το ψωραλένιο και η ιμπεροτονίνη παρουσιάζουν διπλή απόκριση, δηλαδή χαμηλότερες συγκεντρώσεις των ενώσεων παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ υψηλότερες προκαλούν προφλεγμονώδη δράση. Η σεσελίνη εμφάνισε χαμηλή δραστικότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιφλεγμονώδης δράση εξαρτάται από την ατομική υποκατάσταση στο βενζολικό δακτύλιο παρά στον κεντρικό σκελετό της κουμαρίνης [10,11].



Εικόνα 8. Μοριακή δομή, Α) ψωραλενίου, Β) σεσελίνης και Γ) ιμπεροτονίνης

1.3.3 Αντιμικροβιακή δράση

Η απλή κουμαρίνη παρουσιάζει χαμηλή αντιμικροβιακή δράση. Όμως, ορισμένα παράγωγά της, που προκύπτουν από τις πιθανές υποκαταστάσεις της εμφανίζουν ισχυρή δράση. Ένας υποκαταστάτης καρβοξυλικού οξέος ή εστέρα στον κουμαρινικό σκελετό μεταβάλει δραματικά την αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια. Η παρουσία υδροξυλίου ή φαινολικού υποκαταστάτη και καρβοξυλικού οξέος στο δακτύλιο ενισχύει τη δράση εναντίον του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.

Γνωστές αντιοβιοτικές ουσίες που περιέχουν κουμαρίνες είναι το Novobiocin, που απομονώθηκε ως μεταβολίτης από τους μύκητες «Streptomyces niveus» και «Str. Spheroides» και το Clorobiocin. Η δράση τους έγκειται στην αναστολή της DNA γυράσης, ένα ένζυμο στην κατηγορία της τοποϊσομεράσης και μάλιστα στην υποκατηγορία τοποϊσομεράσης τύπου ΙΙ. Η δράση του περιορίζεται στην ελάττωση της προκαλούμενης υπερελίκωση (supercoiling) του DNA, που σχηματίζεται ενώ το δίκλωνο DNA ξετυλίγεται με επιμήκυνση της RNA-πολυμεράσης ή με το ένζυμο της ελικάσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο δρουν εναντίον των gram-θετικών βακτηρίων, όπως «Staphylococcus aureus» ακόμη και εναντίον βακτηριδίων ανθεκτικών σε μεθυκυλλίνη.

Πιο συγκεκριμένα η απόκριση της κουμαρινικής ένωσης με χλωρο-, βρωμο- ή νιτρομάδα ως υποκαταστάστη στη θέση C6 και C8 του δακτυλίου χρωμενίου έδειξε μέγιστη αναστολή ανάπτυξης δύο βακτηριακών στελεχών «Ε. Coli» (Gram αρνητικό) και «Β. Cereus» (Gram θετικό) με μέθοδο καλλιέργειας σε άγαρ με χρήση DMSO [12].

1.3.4 Αντιμυκητιακή δράση

Πέρα από την αντιμικροβιακή δράση των κουμαρινικών ενώσεων, σημειώνεται έντονη αντιμυκητιακή δράση. Τη μεγαλύτερη δραστικότητα επιδεικνύουν ενώσεις που έχουν αναφερθεί και ανωτέρω, όπως το ψωραλένιο, η ιμπερατορίνη και η οσθόλη.

Η οσθόλη (7-μεθοξυ-8-πρενυλο- κουμαρίνη), αποτελεί παραδοσιακό βότανο που χρησιμοποιείται στην Κίνα εδώ και πολλά χρόνια εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως ο «Rhizoctonia solani», «Phytophtora capsici», «Botrytis cinerea» και άλλων. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι η ύπαρξη αρωματικής υδροξυλομάδας, εστέρα ή αιθέρα στις ανθρακικές θέσεις 6 και 7, κρίνονται απαραίτητη για την εκδηλωση αντιμυκητιακής δράσης. Μάλιστα, αλκυλο-υποκατεστημένες κουμαρίνες της 7- υδροξυκουμαρίνης επιδεικνύουν και αυτά αντιμυκητιακή δράση [13].



Εικόνα 9. Μοριακή δομή οσθόλης

1.3.5 Αντικαρκινική δράση

Οι κουμαρινικές ενώσεις επιδεικνύουν επίσης σημαντική αντινεοπλασματική δράση. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί η κυτταροτοξική δράση της 7-υδροξυκουμαρίνης έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Αναφερόμενοι στη χημειοθεραπεία, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή νατρίου βαρφαρίνης σε καρκινικά κύτταρα V2, κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα, καθώς και καρκινικά κύτταρα που συναντώνται σε καρκίνο του προστάτη και κακοήθη μελάνωμα.

Πολλές διαφορετικές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί ως προς τον τρόπο αντικαρκινικής δράσης παραγώγων κουμαρίνης, συμπεριλαμβανομένων 4υδροξυκουμαρίνη (4-HC) και 7-υδροξυκουμαρίνη (7-HC). Αυτές περιλαμβάνουν τις παρατηρήσεις ότι η 4-HC μειώνει τη φωσφορυλίωση τυροσίνης πολλών πρωτεϊνών σε κύτταρα μελανώματος γραμμή τύπου B16-F10, ενώ η 7-HC αναστέλλει την κινάση αλυσίδας μυοσίνης και διακόπτει τον σχηματισμό των μιτωτικών μικροσωληνίσκων ατράκτου στα κύτταρα Allium cepa, οδηγώντας στην τυχαία κατανομή των χρωμοσωμάτων στη μεταφάση της μίτωσης. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η ανεξέλεγκτη μίτωση των καρκινικών κυττάρων [14-16].

1.4 Λιπιδικά νανοσωματίδια ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών

Πρόσφατες μελέτες στην ανάπτυξη νέων βιοδραστικών ουσιών έχουν επιφέρει θετικές αλλαγές στο χώρο της φαρμακευτικής χημείας. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη αρκετά εμπόδια να υπερκεραστούν για την επιτυχή στόχευση της βιοδραστικής ουσίας στον επιθυμητό στόχο, με αποτέλεσμα οι δοκιμές "in vivo" να παρουσιάζουν αρνητικά αποτελέσματα, σε σύγκριση με τις προσδοκίες των δοκιμών "in vitro". Κάποιοι από τους κύριους λόγους αποτυχίας των δοκιμών "in vivo" είναι οι εξής:

•Η ανεπαρκής συγκέντρωση βιοδραστικής ουσίας στους ιστούς στόχους, λόγω ανεπαρκούς απορρόφησης, έλλειψης εξειδίκευσης, ταχέως μεταβολισμού και απόρριψης του φαρμάκου (π.χ. πεπτίδια, πρωτεΐνες). Λόγω έλλειψης εξειδίκευσης επηρεάζονται και γύρω ιστοί, με αποτέλεσμα την εμφάνιση παρενεργειών (side effects). Ιδιαίτερα όταν γίνεται αναφορά σε αντικαρκινικά φάρμακα υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης τοξικότητας και σε παρακείμενους ιστούς.

 Κακή διαλυτότητα φαρμάκων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις λιπόφιλων φαρμακευτικών ουσιών

Υψηλή διάχυση των επιπέδων φαρμακευτικής ουσίας στο πλάσμα του αίματος,
 λόγω ανεξέλεγκτης βιοδιαθεσιμότητας μετά από στοματική χορήγηση

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, καθίσταται σημαντική η εύρεση στρατηγικής προστασίας και μεταφοράς της βιοδραστικής ουσίας στον στοχευόμενο ιστό, καθώς και αύξηση διαλυτότητας αυτής, πράγμα που επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση αυτών σε ειδικά μακρομοριακά συστήματα που λειτουργούν ως φορείς φαρμάκων. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου "in vivo" δεν καθορίζεται πλέον από τις καθαυτού τις ιδιότητες του φαρμάκου, αλλά από το σύστημα μεταφοράς, το οποίο θα πρέπει να επιτρέπει ένα ελεγχόμενο και εντοπισμένο τρόπο απελευθέρωσης της ουσίας.

Το μέγεθος του φορέα φαρμάκων εξαρτάται από τον επιθυμητό ιστό-στόχο καθώς και την πορεία του μέχρι εκεί. Το μέγεθος των φορέων κυμαίνεται από λίγα νανόμετρα (κολλοειδή σωματίδια), στην περιοχή των μικρομέτρων (μικροσωματίδια) μέχρι και σε αρκετά χιλιοστά (εμφυτεύματα). Εμφυτεύματα και μικροσωματίδια είναι πολύ μεγάλα για στόχευση φαρμάκων και ενδοφλέβια χορήγηση. Ως εκ τούτου, οι κολλοειδείς φορείς έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τέτοιου είδους εφαρμογές. Τα διερευνηθέντα συστήματα περιλαμβάνουν λιπιδικά νανοσυστήματα (λιποσώματα, νανογαλακτώματα, στερεών λιπιδίων) και πολυμερικά συστήματα [17, 18].

<u>Πολυμερικά συστήματα</u>

Τα πολυμερικά συστήματα βασίζονται σε πολυμερή υλικά στο εύρος μεγέθους των υπομέτρων και αποτελούν υδατοδιαλυτά πολυμερή με συζευγμένη βιοδραστική Συναντώνται πολυμερικές νανοκάψουλες και νανοσφαίρες. ουσία. Ένα συγκεκριμένο πλεονέκτημα των πολυμερικών συστημάτων είναι η δυνατότητα επιφανειακών χημικών τροποποιήσεων και η δομική τους ποικιλομορφία. Μάλιστα, η δυνατότητα συμμετοχής συσταδικών συμπολυμερών (block co-polymers) προσδίδει μία πληθώρα χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων, ιδιαίτερα στην περίπτωση ανάπτυξης σωματιδίων υποκινούμενα από κάποιο ερέθισμα (Stimuli responsive nanosystems), όπως το συσταδικό συμπολυμερές polyethylene glycol (PEG)–polycaprolactone (PCL), που παρουσιάζει δομικές μεταβολές προς απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας [19].

Τα μειονεκτήματα χρήσης των πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι η πιθανότητα ύπαρξης υπολειμμάτων οργανικών διαλυτών κατά τη διαδικασία σύνθεσης, προσδίδοντας τοξικότητα στο σύστημα φορέα φαρμάκου, καθώς και η πιθανή κυτταροτοξικότητα του επιλεχθέντος πολυμερούς. Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψη η αντίδραση υδρόλυσης του πολυμερούς που λαμβάνει χώρα, παρουσία υγρασίας κατά την αποθήκευση του, προκαλώντας αποικοδόμηση της δομής.

<u>Λιπιδικά Σωματίδια</u>

Η πιο διαδεδομένη δομή λιπιδικών σωματιδίων είναι τα λιποσώματα (liposomes). Είναι σφαιρικά σωματίδια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες φωσφολιπίδικές διπλοστιβάδες. Σε αυτές τις υπερμοριακές δομές μπορούν να ενσωματωθούν τόσο λιπόφιλα, όσο υδρόφιλα μόρια. Τα λιπόφιλα μόρια μπορούν να ενσωματωθούν στο εσωτερικό των λιπιδικών διπλοστιβάδων, ενώ τα υδρόφιλα φάρμακα διαλυτοποιούνται στον εσωτερικό υδατικό πυρήνα. Η απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας, η σταθερότητα του συστήματος "in vivo" και η βιοκατανομή καθορίζεται από το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο, την επιφανειακή υδροφοβικότητα και ρευστότητα μεμβράνης.

Κάποια προτερήματα των λιποσωμάτων είναι η δυνατότητα μεταβολής της διαπερατότητας της επιφάνειας με κατάλληλη ενσωμάτωση πρόσθετων (π.χ. χοληστερόλη). Μάλιστα, οι φορείς φαρμάκων με βάση λιπόσωμα επιτρέπουν την ενδοφλέβια ένεση λιπόφιλων βιοδραστικών ουσιών με πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, π.χ. αμφοτερικίνη Β. Η τοξικότητα του συστήματος λιποσωμάτων είναι υποδεκαπλάσια συγκριτικά με την αντίστοιχο σύστημα μεταφοράς αμφοτερικίνης με βάση τα μικκύλια.

Ωστόσο, προβλήματα χημικής και φυσικής σταθερότητα μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση λιποσωμάτων και αποικοδόμηση της βιοδραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, καθιστώντας την επιφανειακή σύσταση και τροποποίηση των λιποσωμάτων μία εν εξελίξει μελέτη [20].

Τα νανογαλακτώματα είναι λιπιδικά νανοσωματίδια, στη σύσταση των οποίων συναντώνται φυτικά έλαια (π.χ. σογιέλαιο) ή τριγλυκερίδια μεσαίας αλυσίδας για τη λιπιδική φάση, η οποία ανέρχεται περίπου σε 10-20% του γαλακτώματος. Κάποια επιπλέον συστατικά αποτελούν φωσφολιπίδια (σταθεροποιητές, 0.6-15%) και γλυκερόλη (ρύθμιση οσμωτικότητας, 2.25%). Το υπόλοιπο ποσοστό του γαλακτώματος αποτελεί την υδατική φάση.

Τα λιπιδικά νανογαλακτώματα παρουσιάζουν σημαντικά προτερήματα ως φορείς βιοδραστικών ουσιών, κυρίως λιπόφιλων μορίων. Η πιθανότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης της ουσίας από νανογαλακτώματα είναι περιορισμένη λόγω του μικρού μεγέθους και της υγρής κατάστασης του φορέα. Τα πλεονεκτήματα των νανογαλακτωμάτων περιλαμβάνουν χαμηλή τοξικότητα, υψηλή περιεκτικότητα της λιπιδικής φάσης, καθώς και τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλης κλίμακας με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης.

Η χρήση στερεών λιπιδίων αντί για υγρά έλαια είναι πολύ ελκυστική ιδέα ώστε να επιτευχθεί ελεγχόμενη απελευθέρωση βιοδραστικών ουσιών, επειδή η απελευθέρωση της ουσίας δυσχεραίνεται στην περίπτωση στερεών λιπιδίων σε σύγκριση με λιπίδιο στην υγρή του φάση, με αποτέλεσμα να δίνεται η ευκαιρία ελεγχόμενης απελευθέρωσης της ουσίας [17]. Τέτοιου είδους λιπιδικά νανοσωματίδια αποτελούν τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων.

1.5 Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SLNs)

<u>Γενικά</u>

Τα SLNs σχεδιάστηκαν ώστε να σταθεροποιούνται θερμοδυναμικά στο περιβάλλλον υδατικής διασποράς. Πρόκειται για σωματίδια της τάξης του «νανο» με σύσταση βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων λιπιδίων. Εκτός από την ύπαρξη στερεού λιπιδίου, καθίσταται απαραίτητη η παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα, μία χημική οντότητα που δρα με σκοπό την εξισορρόπηση της λιπιδικής στιβάδας με το υδατικό περιβάλλον.

Η δομή που λαμβάνουν είναι σφαιροειδής. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 50-1000 nm, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συνθετική αναλογία λιπιδίουεπιφανειοδραστικού παράγοντα, καθώς και τη μέθοδο σύνθεσης που ακολουθήθηκε. Σε υδατικό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου απαντώνται σε διασπορά, ενώ με αύξηση της περιβάλλουσας θερμοκρασίας έχουν την τάση προς σχηματισμό συσσωματωμάτων και κατ' επέκταση συνενώσεων, ξεπερνώντας το μέγεθος της τάξης των μικροσωματιδίων [17].



Εικόνα 10. Αναπαράσταση σφαιροειδούς δομής και σύστασης των SLNs

Ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η ικανότητα φόρτωσης μεγάλης ποσότητας βιοδραστικής ουσίας, η δυνατότητα εγκλεισμού υδρόφιλων και υδρόφοβων ουσιών με διάφορες φυσικοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες, η δυνατότητα παρασκευής «stealth» σωματιδίων, ικανά να αποφεύγουν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES) και επίσης να επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας [17,18]

Έχει μάλιστα μελετηθεί επιτυχώς τόσο η χρήση τους για την παρεντερική μεταφορά διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων, όσο και η χορήγηση τους διαμέσου της ρινικής και της οφθαλμικής κοιλότητας [17]. Λόγω χαμηλής τοξικότητας είναι κατάλληλα και για πνευμονικές εφαρμογές, καθώς και σε προϊόντα δερματικής χορήγησης, βελτιώνοντας την διείσδυση της βιοδραστικής ουσίας στο δέρμα [18]

Ωστόσο, κατά τη στερεοποίηση και την επακόλουθη κρυστάλλωση του λιπιδίου του SLN, προκαλείται πιθανή αποβολή των δραστικών ουσιών. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα μόρια του λιπιδίου κρυσταλλώνονται προοδευτικά σε πιο σταθερές μορφές, γεγονός που δημιουργεί μείωση της χωρητικότητας σε δραστική ουσία [21]. 1.5.1 Συστατικά1.5.1.1 Λιπίδιο

Δομή-Ιδιότητες

Τα λιπίδια αποτελούν οργανικά μόρια που απαντούν στη φύση και μπορούν να απομονωθούν κατά την εκχύλιση κυττάρων και ιστών με άπολους οργανικούς διαλύτες. Χαρακτηρίζονται κυρίως από τις φυσική ιδιότητα της διαλυτότητας. Κατηγοριοποιούνται σε λιπίδια που περιέχουν εστερομάδες και μπορούν να υδρολυθούν, όπως λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια (φωσφογλυκερίδια και σφιγγολιπίδια) και κήροι, καθώς και σε λιπίδια με εστερομάδες που δεν υδρολύονται, όπως χοληστερόλη και στεροειδή.

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 εσωτερική σωματική θερμοκρασία, ενώ λόγω της φυσικής προέλευσής τους παρουσιάζουν βιοαποικοδομησιμότητα και βιοσυμβατότητα.

Ως βασικό συστατικό τους, τα λιπίδια επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων, όπως τη σταθερότητα τους σε υδατικό περιβάλλον, το ποσοστό κρυσταλλικότητας και αμόρφου υλικού, την ικανότητα φόρτωσης λιπόφιλων και υδρόφιλων βιοδραστικών ουσιών, μάλιστα ικανοποιητικής ποσότητας αυτών και η ικανότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης των βιοδραστικών ουσιών.

Για την επιτυχή ενσωμάτωση της επιθυμητής βιοδραστικής ουσίας, πρέπει να παρουσιάζεται σημαντική διαλυτότητα στο λιπίδιο που έχει επιλεχθεί, προκειμένου να υπάρχει επαρκής φόρτωση της ουσίας στο εσωτερικό των λιπιδικών στρωμάτων. Σε αυτή την ιδιότητα καταλυτικό ρόλο κατέχουν οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες. Ένας επιπλέον παράγοντας αύξησης ποσοστού φόρτωσης της βιοδραστικής ουσίας στο εσωτερικό των λιπιδικών συμάτων. Σε αυτή την ιδιότητα καταλυτικό ρόλο κατέχουν οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες. Ένας επιπλέον παράγοντας αύξησης ποσοστού φόρτωσης της βιοδραστικής ουσίας στο εσωτερικό των λιπιδικών σωματιδίων είναι η ιδιότητα του μερισμού, δηλαδή η συγγένεια της βιοδραστικής ένωσης τόσο με το λιπόφιλο τμήμα του λιπιδίου όσο και με το υδατικό περιβάλλον. Τέλος, η ποικιλομορφία των φάσεων της δομής των λιπιδικών σωματιδίων επιφέρουν μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού της βιοδραστικής ουσίας, λόγω απόκλισης από το αυστηρό κρυσταλλικό πλέγμα. Με την ύπαρξη ατακτικών διαμορφώσεων (ατελειών της βιοδραστικής 21].

Ωστόσο, η ύπαρξη άμορφης δομής προσδίδει χαμηλότερη θερμοδυναμική σταθερότητα στο σύστημα, με αποτέλεσμα τα σωματίδια να χαρακτηρίζονται από αστάθεια δομής στο υδατικό περιβάλλον. Βέβαια, αυτό μπορεί να αποφευχθεί στην περίπτωση λιπιδίων που έχουν μακριά, γραμμική, λιπόφιλη ανθρακική αλυσίδα,

λόγω της χαμηλής στερικής παρεμπόδισης, ευνοώντας την τακτική διευθέτηση με σκοπό τη κρυστάλλωση.

Κάποια από τα συχνά χρησιμοποιούμενα λιπίδια σε συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών είναι λιπαρά οξέα (Δωδεκανοικό, Μυριστικό, Παλμιτικό οξύ), κήροι (Μελισσοκέρι, Καρναουβικό κερί), τριγλυκερίδια (Τριμυριστίνη, Τριπαλμιτίνη) και μονογλυκερίδια (Μονοστεατικός εστέρας της γλυκερίνης, Υδροξυστεατικός εστέρας της γλυκερίνης). Στην παρούσα μελέτη ως στερεό λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο της Τριμυριστίνης [21].

<u>Τριμυριστίνη</u>

Η Τριμυριστίνη - ΤΜ είναι ένας εστέρας και αποτελεί τριγλυκερίδιο του μυριστικού οξέος. Με άλλα λόγια αποτελείται από 3 μόρια μυριστικού οξέος, ενωμένα με ένα μόριο γλυκερόλης μέσω εστερικών δεσμών. Η ΤΜ είναι φυσικής προέλευσης και προκύπτει από την φυσική απομόνωσής της από το φυτό μοσχοκάρυδο. Έχει τη μορφή λευκού στερεού σε καθαρή μορφή. Παρουσιάζει διαλυτότητα σε άπολους διαλύτες, όπως διχλωρομεθάνιο και χλωροφόρμιο, ενώ παραμένει αδιάλυτο σε πολικούς διαλύτες και στο νερό.

Σε ακόλουθο κεφάλαιο (βλ. Κεφάλαιο 2) περιγράφεται αναλυτικώς η πειραματική διαδικασία φυσικής απομόνωσης του λιπιδίου και σύνθεσης των SLNs.



Εικόνα 11. Μοριακή δομή ΤΜ

1.5.1.2 Επιφανειοδραστικοί παράγοντες

<u>Γενικά</u>

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες αποτελούν ενώσεις που μειώνουν την επιφανειακή τάση (ή διεπιφανειακή τάση) μεταξύ δύο υγρών, μεταξύ αερίου και υγρού ή μεταξύ υγρού και στερεού. Οι επιφανειοδραστικές παράγοντες μπορούν να δρουν ως απορρυπαντικά, διαβρέκτες, γαλακτωματοποιητές, αφροίζοντες παράγοντες ή παράγοντες διασποράς.

Δομή-Ιδιότητες

Τα επιφανειοδραστικά, ή αλλιώς τασιενεργά, είναι συνήθως οργανικές ενώσεις που είναι αμφίφιλες, δηλαδή χαρακτηρίζονται από υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες. Συνήθως, έχουν την διευθέτηση πολικών κεφαλών και άπολων μακριών ανθρακικών αλυσίδων. Ως αποτέλεσμα, παρουσιάζει εν μέρει διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες και νερό, αλλά και σε άπολους, με την αντίστοιχη χωροταξική τους διευθέτηση, για ελαχιστοποίηση της εσωτερικής ενέργειας.



Εικόνα 12. Αναπαράσταση τρόπου αυτό-οργάνωσης επιφανειοδραστικών ουσιών σε υδατικό περιβάλλον

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το φορτίο της πολικής κεφαλής. Ένα μη-ιοντικό επιφανειοδραστικό δεν χαρακτηρίζεται από φορτίο στην πολική κεφαλή του. Αντιθέτως, ένα ιοντικό επιφανειοδραστικό μπορεί να χαρακτηριστεί από θετικό φορτίο (κατιοντικό) ή αρνητικό (ανιοντικό). Στην περίπτωση που υπάρχουν δύο αντίθετα φορτισμένες περιοχές στη δομή του, τότε κάνουμε λόγο για την ουδέτερη μορφή του (zwitterion). Οι ιοντικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην ηλεκτροστατική σταθερότητα, ενώ οι μη-ιοντικοί 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.

υδατική φάση, επιφανειοδραστικά τείνουν Στην τα να σχηματίζουν συσσωματώματα, όπως μικκύλια, όπου οι υδρόφοβες ουρές σχηματίζουν τον πυρήνα του συσσωματώματος και οι υδρόφιλες κεφαλές είναι σε επαφή με το περιβάλλον υγρό. Σε υδατικό περιβάλλον λαμβάνουν χώρα φαινόμενα αυτόοργάνωσης όπως σφαιρικά ή κυλινδρικά μικκύλια ή διπλοστιβάδες λιπιδίων. Το σχήμα της σχηματιζόμενης δομής εξαρτάται από τη χημική δομή των επιφανειοδραστικών, δηλαδή την ισορροπία στο μέγεθος μεταξύ της υδρόφιλης κεφαλής και της υδρόφοβης ουράς. Ένα μέτρο αυτού είναι η υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (HLB) [22,23].

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ιοντικών επιφανειοδραστικών παραγόντων είναι το Sodium Cholate και Sodium Glycocholate. Στην περίπτωση των μη-ιοντικών είναι το Polysorbate 20, 60, 80 (Tween 20, 60, 80) και Poloxamer 22, 188. Τέλος, παραδείγματα αμφοτερικών επιφανειοδραστικών αποτελούν η Φωσφατιδυλοχολίνη (Phosphatidilocholine) και η Λεκιθίνη (Lecithin).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο μη-ιοντικός Tween 80 και ο αμφοτερικός επιφανειοδραστικός παράγοντας της L-α-Φωσφατιδυλοχολίνης.

Tween 80

To Tween 80 είναι ένας συνθετικός, υδρόφιλος, μη ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας με τιμή HLB 15. Το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του οφείλεται στο ολεικό οξύ που ανιχνεύεται στη μοριακή δομή του. Χρησιμοποιείται συχνά ως σταθεροποιητής και γαλακτωματοποιητής, για την σταθεροποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων, ενώ η χρήση του προτιμάται λόγω της αυξημένης βιοσυμβατότητας.

Οι φυσικές ιδιότητές που είναι το υψηλό ιξώδες του και την αυξημένη διαλυτότητα στο νερό. Οι υδρόφιλες ομάδες του είναι πολυαιθέρες, γνωστές ως πολυοξυαιθυλενο-ομάδες, που αποτελούν πολυμερή του οξειδίου του αιθυλενίου.

Η δράση του έγκειται στο σχηματισμό μίας καλυπτικής επίστρωσης εξωτερικά της λιπιδικής επιφάνειας των λιπιδικών σωματιδίων, με σκοπό τη μείωση της επιφανειακής τάσης και αύξηση της διαλυτοποίησης των λιπιδικών σωματιδίων στο υδατικό περιβάλλον



Εικόνα 13. Μοριακό τύπος Tween 80

Φωσφατιδυλοχολίνη

Η φωσφατιδυλοχολίνη - PC αποτελεί μια τάξη φωσφολιπιδίων, κύρια ομάδα των οποίων είναι η χολίνη. Αποτελούν κύριο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών. 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 αποτελεί έναν αμφοτερικός σταθεροποιητή και γαλακτωματοποιητή. Ο τρόπος δράσης της είναι ο σχηματισμός πολλαπλών διπλών στρωμάτων (bilayers) από τη λιπιδική επιφάνεια των λιπιδικών σωματιδίων. Ουσιαστικά δρα συμπληρωματικά με το Tween 80, με σκοπό την επίτευξη χαμηλότερης εσωτερικής ενέργειας και τη δημιουργία πιο ομοιογενών διασπορών, με μικρότερη τάση συσσωμάτωσης των σωματιδίων.



R, R' = fatty acid residues

Εικόνα 14. Μοριακή δομή L-α-Φωσφατιδυλοχολίνης

1.5.2 Μέθοδοι παρασκευής SLNs

Τα SLNs δύνανται να παρασκευαστούν με ποικίλους τρόπους, μηχανικών και χημικών διεργασιών. Ακολούθως, αναλύεται ο κάθε τρόπος σύνθεσης.

1.5.2.1 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης

Η τεχνική της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης είναι μια από τις πρώτες τεχνικές που αξιοποιήθηκαν για την παραγωγή SLNs. Παρουσιάζει χαμηλό κόστος και δίνει τη δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα, όπως στη 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. Υπάρχουν δύο είδη ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, η θερμή και η κρύα ομογενοποίηση.



Εικόνα 15. Διάταξη ομογενοποιητή υψηλής πίεσης

Η <u>θερμή ομογενοποίηση</u> πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες άνω του σημείου τήξεως του λιπιδίου, και επομένως μπορεί να θεωρηθεί ως τεχνική ομογενοποίησης 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 παράγοντα και 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.

Η <u>κρύα ομογενοποίηση</u> περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των λιπιδίων σε στερεή μορφή, έναντι υγρής μορφής στην θερμή ομογενοποίηση. Στη μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται τήξη του λιπιδίου ύστερα από θέρμανση 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 μίγμα κατεργάζεται σε μύλο. Το μέσο μέγεθος σωματιδίων κυμαίνεται από 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 SLNs που παράγονται με την μέθοδο αυτή εμφανίζουν ελαφρώς αυξημένο μέγεθος (50-500 nm) σε σχέση με αυτά που παράγονται από την θερμή ομογενοποίηση, χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες πίεσης, 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 [24]

1.5.2.2 Μέθοδος μικρογαλακτώματος

Τα μικρογαλακτώματα αποτελούν ισοτροπικά μίγματα αποτελούμενα από μια υδατική και μια ελαιώδη φάση, σταθεροποιούμενα από έναν επιφανειοδραστικό παράγοντα. Αρχικά, πραγματοποιείται τήξη του λιπιδίου και προσθήκη βιοδραστικής ουσίας. Το λιπιδικό τήγμα διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα (υδατική φάση) 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 προς ψύξη του γαλακτώματος και σχηματισμό των SLNs.



Εικόνα 16. Αναπαράσταση σχηματισμού μικρογαλακτώματος. Στην παρούσα περίπτωση συμβαίνει σχηματισμός λιπιδικών σωματιδίων σε υδατική διασπορά (μπλε ποτήρι ζέσεως)

Τα νανοσωματίδια που παράγονται με αυτή την μέθοδο έχουν σφαιρικό σχήμα και μικρή κατανομή μεγέθους, επιθυμητές ιδιότητες για την ομοιογένεια των σωματιδίων. Η μέθοδος αυτή, ωστόσο, παρουσιάζει δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Η προσθήκη της ψυχρής υδατικής φάσης οδηγεί σε μεγάλη αραίωση του τελικής διασποράς, επομένως είναι απαραίτητη η εξάτμιση μεγάλων ποσοτήτων νερού με σκοπό τη συμπύκνωση, ενώ η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων των επιφανειοδραστικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα τοξικότητας και αυτοσυμπύκνωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα [24].

1.5.2.3 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 προς ψύξη του γαλακτώματος και σχηματισμό των SLNs.

1.5.2.4 Μέθοδος διπλού γαλακτώματος

Η μέθοδος διπλού γαλακτώματος αναπτύχθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η ενσωμάτωση κυρίως υδρόφιλων βιοδραστικών ουσιών στην εσωτερική υδατική φάση ενός water-in-oil-in-water συστήματος (νερού / λαδιού/νερού), 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.

1.5.2.5 Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη

Η τεχνική γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παρασκευή SLNs, που βασίζεται στην παρασκευή oil-in-water γαλακτωμάτων. Κατά την μέθοδο αυτή, το λιπίδιο τήκεται υπό θέρμανση και διαλύεται σε μικρή ποσότητα ενός οργανικού, μη αναμείξιμου με το νερό, διαλύτη. Στην οργανική αυτή φάση προστίθεται ποσότητα διαλυμένης σε όμοιο διαλύτη 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 [24].

1.5.2.6 Μέθοδος λεπτού φιλμ ενυδάτωσης

Η μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης αποτελεί μια συνήθη μέθοδο παρασκευής SLNs σε εργαστηριακή κλίμακα. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τήξη και την επακόλουθη 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, όπως και της περίπτωσης σύνθεσης γαλακρωματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη αποτελεί η χρήση οργανικών διαλυτών [24].

1.6 Νανοδομημένα Σωματίδια Στερεών Λιπιδίων (NLCs)

<u>Γενικά</u>

Τα νανοδομημένα υλικά αποτελούν υλικά με μικροδομή της οποίας μία χαρακτηριστική κλίμακα μεγέθους που χαρακτηρίζει το υλικό είναι της τάξης μερικών νανομέτρων (συνήθως 1–10) nm. Το νανοδομημένα υλικά συνήθως δεν παρουσιάζουν θερμοδυναμική σταθερότητα. Με τη συνδυαστική ανάπτυξη πολλών υπερμοριακών δομών δύναται να επιτευχθεί μία θερμοδυαναμικά σταθερή δομή με βελτιωμένες μάλιστα ιδιότητες.

Μερικοί σημαντικοί περιορισμοί των SLNs οδήγησαν στην ανάπτυξη νέου φορέα λιπιδίων το 1999 από τον Muller, γνωστά και ως NLCs. Τα NLCs αναπτύχθηκαν αντικαθιστώντας ένα κλάσμα στερεών λιπιδίων με αντίστοιχων ιδιοτήτων υγρά λιπίδια, σχηματίζοντας έτσι έναν καινοτόμο φορέα βιοδραστικών ουσιών [21].

Τα NLCs θεωρούνται βέλτιστοι φορείς βιοδραστικών ουσιών χάρη στη βιοσυμβατότητά τους και στις ποικίλες μορφολογικές διατάξεις που μπορούν να λάβουν. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότερες βιοδραστικές ουσίες έχουν λιπόφιλη φύση, παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα στην ποσότητα υγρών λιπιδίων της σύστασης των σωματιδίων.

Τα NLCs παρουσιάζουν πολλές εφαρμογές τόσο στην ανάπτυξη φαρμάκων, όσο και στην κοσμητολογία. Έχει παρατηρηθεί βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας υδρόφιλων βιοδραστικών ουσιών μέσω της χορήγησης από το στόμα. Επιπλέον, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για μεταφορά φαρμάκων στον οφθαλμικό, πνευμονικό και εγκεφαλικό καθώς και σε καρκινικούς ιστούς [25].

<u>Δομή</u>

Η παρουσία υγρών λιπιδίων μαζί με τα στερεά λιπίδια δημιουργεί περισσότερο χώρο αποθήκευσης βιοδραστικών ουσιών στον εσωτερικό πυρήνα των σωματιδίων. Αυτό το φαινόμενο λαμβάνει χώρα κατά τη στερεοποίηση των λιπιδίων και κρυσταλλοποίηση των στερεών λιπιδίων. Ουσιαστικά, η παρουσία μη κρυσταλλικών διευθετήσεων λόγω της ύπαρξης υγρού λιπιδίου, έχει ως αποτέλεσμα την εναλλαγή κρυσταλλικής και άμορφης κατάστασης, προσδίδοντας τελικά μία ατελή έως και άμορφη λιπιδική μήτρα.

Η άμορφη φύση του λιπιδικού πυρήνα αποτρέπει την αποβολή του φαρμάκου στην υδατική φάση. Όταν η βιοδραστική ουσία παρουσιάζει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο υγρό λιπίδιο που χρησιμοποιείται, μπορεί να αναπτυχθεί σύστημα στερεού λαδιού σε νερό (oil-water). Ουσιαστικά, αυτό προκύπτει με το σχηματισμό μικροσκοπικών σφαιριδίων υγρού λιπιδίου, τα οποία ενσωματώνονται και διασκορπίζονται εξίσου στον στερεό λιπιδικό πυρήνα. Η απελευθέρωση της βιοδραστικής ουσίας λαμβάνει χώρα αργά από το εσωτερικό των σταγονιδίων υγρού λιπιδίου

Οι κυριότερες κατηγορίες NLCs είναι οι εξής:

- Τύπου 1: Η ατελής διευθέτηση νανοσωματιδίων. Σε αυτή την περίπτωση έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση ενός κλάσματος στερεού λιπιδίου από υγρό λιπίδιο προκαλώντας σχηματισμό ατελούς κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό το φαινόμενο προσδίδει την ιδιότητα μεγαλύτερης χωρητικότητας σε βιοδραστική ουσία.
- Τύπου 2: Εξίσου ατελής διευθέτηση νανοσωματιδίων. Η διαφορά με τα NLCs
 Τύπου 1 είναι η πολυμορφικότητα των Στερεών Λιπιδίων, προσδίδοντας στο σύστημα μία περισσότερο τακτική δομή.
- Τύπου 3: Πολλαπλού τύπου. Αναφέρεται σε σύστημα υγρού λιπιδίου-σεστερεό ή στερεό λίπος σε νερό, συστήματα τα οποία αναπτύσσονται με τεχνική διαχωρισμού φάσεων. Στην περίπτωση που η βιοδραστική ουσία επιδεικνύει αυξημένη διαλυτότητα στο υγρό λιπίδιο τότε η ανάπτυξη NLCs είναι επιθυμητή, στα οποία μικρά σταγονίδια λαδιού διασκορπίζονται ομοιόμορφα στη μήτρα στερεών λιπιδίων και αυτό το σύστημα διασπείρεται στο υδατικό μεσαίο.



Εικόνα 17. Απεικόνιση της εσωτερικής διάταξης βιοδραστικής ουσίας και των 3 τύπων NLCs

<u>Σύσταση</u>

Η σύσταση που ακολουθείται για τη σύνθεση NLCs ομοιάζει εκείνης των SLNs. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ύπαρξη στερεού λιπιδίου, επιφανειοδραστικών παραγόντων, βιοδραστικής ουσίας και υδατικής φάσης. Ως στερεό λιπίδιο επικρατεί εκείνο στης τριμυριστίνης και ως επιφανειοδραστικών παραγόντων των μη-ιοντικού παράγοντα Tween 80 και του αμφοτερικού σταθεροποιητικού παράγοντα L-α-Φωσφατιδυλοχολίνης.

Καθοριστικής σημασίας στην σύσταση των NLCs είναι η ύπαρξη υγρού λιπιδίου. Το υγρό λιπίδιο λαμβάνει στερεή μορφή σε χαμηλή θερμοκρασία (έως και -18°C στην περίπτωση του αμυγδαλέλαιου), με αποτέλεσμα σε θερμοκρασία δωματίου ή αποθήκευσης να παρεμβάλει το στερεό κρυσταλλικό πλέγμα που διαμορφώνουν τα μόρια του στερεού λιπιδίου. Συνηθισμένα υγρά λιπίδια για τη σύνθεση NLCs είναι το καστορέλαιο, το αμυγδαλέλαιο, το λάδι καρύδας, το ολεικό οξύ, το ελαιόλαδο και το λάδι Argan. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύνθεση σωματιδίων με πηγή υγρού λιπιδίου το αμυγδαλέλαιο [27].

<u>Αμυγδαλέλαιο</u>

Τα αμύγδαλα είναι μια πλούσια πηγή ελαίου, με 50% ξηρή μάζα πυρήνα ως λίπος. Σε σχέση με τη συνολική ξηρά μάζα του πυρήνα, το αμυγδαλέλαιο περιέχει 32% μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (ένα ωμέγα-9 λιπαρό οξύ), 13% λινελαϊκό οξύ (ένα πολυακόρεστο ωμέγα-6 βασικό λιπαρό οξύ) και 10% κορεσμένο λιπαρό οξύ (κυρίως ως παλμιτικό οξύ, σύνδεσμος USDA στον πίνακα). Το λινολενικό οξύ, ένα πολυακόρεστο ωμέγα-3 λίπος. Η φυσική του κατάσταση είναι υγρή. Παρουσιάζει διαλυτότητα σε άπολους οργανικούς διαλύτες, όπως διχλωρομεθάνιο και χλωροφόρμιο, ενώ παραμένει αδιάλυτο σε πολικούς διαλύτες και στο νερό.



Εικόνα 18. Μοριακό τύπος αμυγδαλέλαιου

Μέθοδοι παρασκευής

Οι μέθοδοι σύνθεσης είναι όμοιοι με εκείνους τη σύνθεσης των SLNs.

1.7 Σύγκριση SLNs - NLCs

Τα δύο λιπιδικά συστήματα φορέων παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες, αλλά και διαφορές.

Στις ομοιότητες των δύο συστημάτων συγκαταλέγεται ότι και στις δύο περιπτώσεις η σύσταση ομοιάζει, τόσο στην ύπαρξη στερεού λιπιδίου, όσο και στην ύπαρξη όμοιου είδους επιφανειοδραστικών παραγόντων. Επιπλέον, οι μέθοδοι σύνθεσης των νανοσωματιδίων σε αμφότερες τις περιπτώσεις πραγματοποιείται με τις ίδιες μεθόδους, έχοντας όμοιο αποτέλεσμα ανεξαρτήτου του είδους λιπιδικού σωματιδίου που έχει παρασκευαστεί [26].

Εν αντιθέσει, η χωρητικότητα των λιπιδικών σωματιδίων σε βιοδραστική ουσία είναι μια ειδοποιός διαφορά. Λόγω ατακτικής λιπιδικής διευθέτησης των NLCs, δίνεται η δυνατότητα εγκλεισμού μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικής ουσίας, σε αντίθεση με τα SLNs που λόγω της υψηλής κρυσταλλικότητας παρουσιάζουν άκαμπτη δομή, περιορίζοντας τον διαθέσιμο χώρο προς ενσωμάτωση βιοδραστικής ουσίας.

Στην περίπτωση αποθήκευσης των λιπιδικών σωματιδίων, επιλέγεται η διαδικασία της λιοφιλοποίησης, μιας τεχνικής ξήρανσης και στερεοποίησης των νανοσωματιδίων, με σκοπό την απόκτηση μίας σταθερότερης δομής. Όταν λαμβάνει χώρα στερεοποίηση των SLNs, το μεγαλύτερο μέρος των σωματιδίων αποκτούν κρυσταλλική διευθέτηση. Ως εκ τούτου η λιπιδική μήτρα κρυσταλλοποιείται σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα τη μείωση του εσωτερικού διαθέσιμου όγκου. Ως αποτέλεσμα, ποσότητα εγκλεισμένης βιοδραστικής ουσίας
αποβάλλεται σε μεγάλο βαθμό στο εξωτερικό των σωματιδίων. Αντιθέτως, στην περίπτωση των NLCs που διαθέτουν πιο εύκαμπτη δομή, ένα ανάλογο φαινόμενο δεν λαμβάνει χώρα, με αποτέλεσμα η ποσότητα της βιοδραστικής ουσίας να παραμένει στο εσωτερικό των σωματιδίων.

Αναφέροντας Μάλιστα, αναπτύχθηκαν και συγκρίθηκαν SLNs και NLCs ως φορείς βιοδραστικής ουσίας Κλοτριμαζόλης. Και τα δύο συστήματα ακολούθησαν την ίδια μέθοδο σύνθεσης, η οποία είναι αυτή της γαλακτωματοποίησης με υπερήχηση.

Παρατηρήθηκε ότι ιδιότητες όπως το μέγεθος σωματιδίων, η απόδοση του εγκλεισμού της ουσίας, η απελευθέρωση της και η συνολική σταθερότητα παρουσίασαν εξάρτηση από την αναλογία λιπιδίου και βιοδραστικής ουσίας. Μάλιστα, συμπεράθηκε ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιοδραστικής ουσίας τα NLCs παρουσίασαν μεγαλύτερη σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου, εν αντιθέσει με τα SLNs που παρουσίαζαν σταθερότητα μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες [25].

Επιπλέον μελετήθηκε η μεταφορά βιοδραστικής ουσίας Ινδομεθακίνης στο οπίσθιο τμήμα των οφθαλμικών ιστών. Με βάση τις παραμέτρους όπως ποσότητα εγκλεισμένης βιοδραστικής ουσίας, αποτελεσματικότητα και διείσδυση του σκευάσματος στον οφθαλμικό ιστό, συμπεράθηκε ότι κατάλληλο φορέας αποτέλεσε το σύστημα NLCs, έναντι των SLNs.

Επιπλέον, μελετήθηκε σύστημα μεταφοράς ουσιών Βινκριστίνης και Τεμοζολομίδης και με τα δύο λιπιδικά συστήματα, με στόχο τη θεραπεία γλοιοβλαστώματος. Η "in vivo" μελέτη αναστολής όγκου ήταν επιτυχής και παρουσίαζε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην περίπτωση των NLCs. Η επιτυχία αυτής της μελέτης αποδείχθηκε από την «in vivo» κυτταροτοξική αποτελεσματικότητα του όγκου και το σύστημα NLCs ως αποτελεσματικό φορέα για συνεργατική χημειοθεραπεία [25].

1.8 Νιοσώματα

<u>Γενικά</u>

Τα Νιοσώματα αποτελούν ένα νέο σύστημα ελεγχόμενης και στοχευμένης μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών. Ως δομικές οντότητες παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με τα λιποσώματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από σφαιρική δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας, που το εσωτερικό τους δεν πληρώνεται από λιπιδική μάζα, αλλά υδατικό μέσο. Ωστόσο, τα λιποσώματα παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τοξικότητα και θέματα σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH [28].

Τα Νιοσώματα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την διάταξη και αυτό-οργάνωση των μορίων λιπιδίων σε μονοστρωματικά (unilamellar), ολιγοστρωματικά (oligolamellar) και πολυστρωματικά (multilamellar). Επιπλέον, τα Νιοσώματα σχηματίζονται συνήθως με τη βοήθεια μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών παραγόντων. Συνηθέστερα, περιέχουν ως δομικό συστατικό το λιπίδιο της χοληστερόλης ή των παραγώγων της, λόγω ότι προσδίδει την απαραίτητη ακαμψία και σταθερότητα στη συνολική δομή.

Λόγω της ιδιαίτερης δομής τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση υδρόφιλων και υδρόφοβων βιοδραστικών ουσιών. Επιπλέον, δίνουν τη δυνατότητα συνεργατικής μεταφοράς δύο διαφορετικών βιοδραστικών ουσιών, όπως η δοξορουβικίνη και κουρκουμίνη, ενώσεις που παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Παράλληλα, μπορούν να χρησιμοποιουθούν ως φορείς βιοδραστικών ουσιών στον οφθαλμικό, δερματικό, πνευμονικό και εγκεφαλικό ιστό. Μία πολύ σημαντική ιδιότητα είναι ότι τέτοια συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών μορίων έχουν το κατάλληλο μέγεθος και ιδιότητες για να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [28,29].

Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα Νιοσωμάτων

Τα Νιοσώματα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των δομών λιποσωμάτων. Προσφέρουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα, μεγαλύτερη οσμωτική ικανότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Επίσης, σε πειράματα "in vivo", αποικοδομούνται φυσικά χωρίς την πρόκληση ανοκατασταλκτικών διαδικασιών. Επίσης, δίνουν τη δυνατότητα μεταφοράς τόσο υδρόφιλων, όσο και υδρόφοβων βιοδραστικών ουσιών, καθώς δύνανται να μεταβάλλουν τις ιδιότητες τους ανάλογα με τη συνθετική αναλογία και την επιφανειακή τροποποίησή τους, με αποτέλεσμα τη μεταφορά τους σε ποικίλους ιστούς.

Ωστόσο, η ύπαρξη περιβάλλοντος υδατικού μέσου μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση της λιπιδικής μεμβράνης και εκροή της βιοδραστικής ουσίας στο εξωτερικό των Νιοσωμάτων. Σε αυτό το γεγονός, καθοριστικός παράγοντας καθίσταται η σταθεροποίηση των Νιοσωμάτων σε υδατική διασπορά με τη χρήση κατάλληλου επιφανειοδραστικού παράγοντα [30].

<u>Δομή</u>

Τα Νιοσώματα αποτελούν μία διστρωματική δομή λιπιδικών μορίων με την απαραίτητα παρουσία μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών παραγόντων. Αυτή η δομή δύο επιπέδων περιέχει ένα κοίλο χώρο στο κέντρο της σφαιρικής δομής. Λόγω της ειδικής γεωμετρίας τους, τα Νιοσώματα μπορούν να ενσωματώσουν υδρόφιλη καθώς και υδρόφοβη βιοδραστική ουσία στη δομή τους [31].



Εικόνα 19. Αναπαράσταση εσωτερικής δομής των διαφορετικών δομών Νιοσωμάτων

Η ενσωμάτωση υδρόφιλων βιοδραστικών ουσιών μπορεί να λάβει χώρα στο υδατικό κέντρο των σφαιρικών δομών ή να προσροφηθούν στην εσωτερική λιπιδική επιφάνεια της διπλής στιβάδας. Ενώ στην περίπτωση των λιπόφιλων βιοδραστικών ουσιών εισέρχονται στο εσωτερικό της δομής της διπλής λιπιδικής στιβάδας [31].

Τα Νιοσώματα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μέγεθός τους σε τρεις κατηγορίες:

- Εύρος μεγέθους 10–100 nm, κοινώς γνωστό ως μικρά μονοστρωματικά κυστίδια (SUV)
- Εύρος μεγεθών 100–3000 nm, μεγάλα πολυστρωματικά κυστίδια (LUV)
- Στην ύπαρξη περισσότέρων του ενός διπλού στρώματος, είναι γνωστά ως πολυεπίπεδα κυστίδια (MLV).

<u>Σύσταση</u>

Η σύσταση των Νιοσωμάτων αποτελείται από την ύπαρξη ενός λιπιδίου ή και φωσφολιπιδίου και ενός μη-ιοντικού επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συνήθη λιπίδια για τη συνθετική πορεία Νιοσωμάτων είναι η χοληστερόλη, η φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθυλαμίνη (phosphatidylethanolamine) και το βούτυρο Shea [28].

Οι μη-ιοντικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες έχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένες υδρόφιλες ομάδες που περιέχουν οξυγόνο, οι οποίες συνδέονται με υδρόφοβες αλυσίδες. Η υδατοδιαλυτότητα των ομάδων οξυγόνου είναι το αποτέλεσμα των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται. Οι δεσμοί υδρογόνου μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας και κατ' επέκταση η υδατοδιαλυτότητατους σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τα μη-ιοντικά επιφανειοδραστικά είναι λιγότερο ευαίσθητα στη σκληρότητα του νερού από τα ανιοντικά και αφρίζουν λιγότερο σε επαφή με το νερό. Οι διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων τύπων μη ιονικών επιφανειοδραστικών είναι μικρές και η επιλογή διέπεται κυρίως λαμβάνοντας υπόψη το κόστος των ειδικών ιδιοτήτων (π.χ. αποτελεσματικότητα και αποτελεσματικότητα, τοξικότητα, δερματολογική συμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα) ή άδεια χρήσης σε τρόφιμα. Συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι τα λιπαρά οξέα αιθοξυομάδων (Octaethylene glycol monododecyl ether), λιπαρά οξέα γλυκερόλης (Glycerol monostearate), λιπαρά οξέα σορβιτόλης (Glycerol Monostearate, Tween 20, 40, 60, 80, Span 20, 40, 60).

<u>Χοληστερόλη</u>

Η χοληστερόλη (Cholesterol) είναι ένα χοληστενοειδές (cholestanoid) που αποτελείται από χοληστάνη (cholestane) που έχει διπλό δεσμό στη θέση 5,6 καθώς και μια ομάδα 3β-υδροξυλίου (3beta-hydroxy group). Αποτελεί μία 3-βήτα-στερόλη (3beta-sterol), ένα χολεστανοειδές, ένα C27-στεροειδές (cholestanoid) και ένα 3-β-υδρόξυ-δ -στεροειδές (3beta-hydroxy-Delta-steroid).



Εικόνα 20. Μοριακή δομή χοληστερόλης

Η χοληστερόλη είναι ένα σημαντικό πρόσθετο στη σύνθεση των Νιοσωμάτων. Η παρουσία του συγκεκριμένου λιπιδίου μπορεί να επηρεάσει τη διαπερατότητα και ακαμψία της μεμβράνης, αποτελεσματικότητα ενσωμάτωσης, ευκολία επανενυδάτωσης λυοφιλοποιημένων Νιοσωμάτων και τη θερμοδυναμική σταθερότητα για μεγάλους χρόνους αποθήκευσης.

Εάν η χοληστερόλη χρησιμοποιείται με επιφανειοδραστικό παράγοντα χαμηλού HLB, υπάρχει η δυνατότητα να αυξηθεί η σταθερότητα της δομής και μάλιστα εάν η τιμή HLB είναι μεγαλύτερη από 6, ευνοείται ο σχηματισμός δομών διπλοστιβάδας. Ουσιαστικά, η προσθήκη χοληστερόλης αυξάνει το ιξώδες και συνεπώς την ακαμψία του λιπιδικού συστήματος. Συνήθως, η χοληστερόλη χρησιμοποιείται σε αναλογία 1: 1 M με το μη-ιοντικό επιφανειοδραστικό παράγοντα [28].

<u>Span 60</u>

Αποτελεί έναν μη-ιοντικό επιφανειοδραστικό παράγοντα, με HBL ίσο με 4,7. Είναι ένας λιπόφιλος γαλακτωματοποιητής, η δομή του οποίου αποτελείται από έναν εστέρα λιπαρού οξέος σορβιτάνης, που είναι ανάλογο της μονοστεατικής

γλυκερίνης που προέρχεται από τη σορβιτόλη. Είναι ένας μη-ιοντικός, διασπειρόμενος στο λάδι επιφανειοδραστικός παράγοντας.

To Span 60 είναι στερεό και διαλύεται βέλτιστα σε αιθανόλη. Παραμένει αδιάλυτο σε πολικούς διαλύτες και νερό. Αποτελεί σημαντικό επιφανειοδραστικό παράγοντας για τη σύνθεση Λιποσωμάτων και Νιοσωμάτων με σκοπό την ενσωμάτωση και μεταφορά βιοδραστικών ουσιών.

ΙΙ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ-ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

1.9 Χαρακτηρισμός κουμαρινικών αναλόγων

Ο χαρακτηρισμός των κουμαρινικών αναλόγων που συντέθηκαν (βλ. Υποκεφάλαιο 3.2.1-3.2.3) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια Φασματοκοπικών μεθόδων. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της Φασματοσκοπίας NMR και η Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-VIS).

Στην περίπτωση του χαρακτηρισμού με την τεχνική ¹Η NMR εξετάστηκε η καθαρότητα των κουμαρινικών ενώσεων και επαληθεύτηκε η μοριακή δομή τους. Επιπροσθέτως, με τη χρήση της Φασματοσκοπίας UV-VIS δόθηκε η δυνατότητα ποιοτικού χαρακτηρισμού της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης. Ακολούθως, αναλύονται συνοπτικώς οι τεχνικές ανάλυσης.

1.9.1 Φασματοσκοπία ¹Η NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, αποτελεί μια φασματοσκοπική τεχνική για την παρατήρηση τοπικών μαγνητικών πεδίων γύρω από τους ατομικούς πυρήνες. Το δείγμα τοποθετείται σε μαγνητικό πεδίο και το σήμα NMR παράγεται με διέγερση του δείγματος πυρήνων με ραδιοκύματα σε πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, το οποίο ανιχνεύεται με κατάλληλο ανιχνευτή.

Το ενδομοριακό μαγνητικό πεδίο γύρω από ένα άτομο στο μόριο που εξετάζεται, αλλάζει τη συχνότητα συντονισμού, δίνοντας έτσι πρόσβαση σε λεπτομέρειες της ηλεκτρονικής δομής ενός μορίου και των μεμονωμένων λειτουργικών ομάδων του. Καθώς τα πεδία είναι μοναδικά ή ιδιαίτερα χαρακτηριστικά για μεμονωμένες ενώσεις. Στη σύγχρονη πρακτική οργανικής χημείας, η φασματοσκοπία NMR είναι η πλέον καθοριστική μέθοδος για τον εντοπισμό μονομοριακών οργανικών ενώσεων.



Εικόνα 21. Όργανο NMR

Ακολούθως παρατίθεται χαρακτηριστικό Φάσμα NMR για το μόριο της αιθανόλης.





1.9.2 Φασματοσκοπία UV-VIS

н Υπεριώδης / Ορατή Φασματοσκοπία ή η Υπεριώδης / Ορατή Φασματοφωτομετρία (Ultraviolet / Visible) αναφέρεται σε φασματοσκοπία απορρόφησης ή φασματοσκοπία ανάκλασης σε μέρος της υπεριώδους ολόκληρες, παρακείμενες ορατές περιοχές του ακτινοβολίας και σε ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Σε αυτήν την περιοχή του φάσματος, τα άτομα και τα μόρια υφίστανται ηλεκτρονικές μεταβάσεις από διεγερμένο τροχιακό LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) στο αντίστοιχο HOMO (Highest Occuppied Molecular Orbital). Η φασματοσκοπία απορρόφησης είναι συμπληρωματική της φασματοσκοπίας φθορισμού, καθώς ο φθορισμός ασχολείται με μεταβάσεις ηλεκτρονίων από την κατάσταση διέγερσης στην κατάσταση γείωσης, ενώ η απορρόφηση μετρά μεταβάσεις από την κατάσταση εδάφους στην κατάσταση διέγερσης.

Η φασματοσκοπία UV / Vis χρησιμοποιείται συνήθως στην αναλυτική χημεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών αναλυτών, όπως ιόντα μετάλλων μετάβασης, οργανικές ενώσεις υψηλής σύζευξης (χρωμοφόρα) και βιολογικά μακρομόρια. Η φασματοσκοπική ανάλυση πραγματοποιείται συνήθως σε διαλύματα, αλλά μπορούν επίσης να μελετηθούν στερεά και αέρια.



Εικόνα 23. Όργανο Φασματοσκοπίας UV/VIS (V-770, Jasco)

- 1.9 Δομικός, Μορφολογικός και χημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών νανοσωματιδίων
- 1.9.1 Μελέτη μορφολογικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Μια από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές σήμερα για την μέτρηση του μεγέθους κολλοειδών νανοσωματιδίων είναι η τεχνική DLS, καθώς μπορεί να μετρηθεί το μέγεθος σωματιδίων σε διασπορά, ταχύτατα και απαιτώντας ελάχιστη προετοιμασία δείγματος.

Σκέδαση είναι το φυσικό φαινόμενο, κατά το οποίο κινούμενα σωματίδια, η ακτινοβολία ή ο ήχος, αποκλίνουν από την πορεία τους, λόγω ανομοιομορφιών ή μικροσωματιδίων που συναντούν στην πορεία τους. Συγκεκριμένα, ο όρος «σκέδαση του φωτός», αναφέρεται στην αλλαγή της κατεύθυνσης διάδοσης του φωτός, λόγω των ανομοιογενειών του μέσου στο οποίο διαδίδεται. Με το φαινόμενο αυτό, περιγράφεται ένα σύνολο από οπτικά φαινόμενα (περίθλαση, διάθλαση, ανάκλαση) τα οποία οφείλονται στην αλληλεπίδραση του μετώπου κύματος με τα σωματίδια της ύλης και τις ανομοιογένειές της.



Εικόνα 24. Όργανο Zetasizer nano ZS 173

1.9.2 Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής TGA

Η θερμοσταθμική ανάλυση είναι μια τεχνική στην οποία μετράται η μεταβολή στη μάζα του δείγματος ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου. Το δείγμα υποβάλλεται σε μεταβαλλόμενη θερμοκρασία, σε ορισμένο θερμοκρασιακό εύρος αναλόγως το δείγμα, σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Αυτή η μέτρηση παρέχει πληροφορίες για φυσικά φαινόμενα, όπως μεταβάσεις φάσης, απορρόφηση, προσρόφηση και εκρόφηση, καθώς και χημικά φαινόμενα που περιλαμβάνουν χημικές απορροφήσεις, θερμική αποσύνθεση και αντιδράσεις οξείδωσης και εξάχνωσης.

Η αναλυτική τεχνική TGA μπορεί να χρησιμοποιηθεί προς χαρακτηρισμό υλικών μέσω ανάλυσης χαρακτηριστικών προτύπων αποσύνθεσης. Είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη πολυμερών υλικών, όπως θερμοπλαστικά, θερμοσυστήματα, ελαστομερή, σύνθετα υλικά, πλαστικές μεμβράνες, ίνες, επιστρώσεις, χρώματα και καύσιμα.

Η ανάλυση TGA πραγματοποιείται σε ένα όργανο που αναφέρεται ως θερμοσταθμικός αναλυτής. Ένας θερμοσταθμικός αναλυτής μετρά συνεχώς τη μάζα ενώ η θερμοκρασία ενός δείγματος αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Η μάζα, η θερμοκρασία και ο χρόνος θεωρούνται βασικές μετρήσεις στη θερμοσταθμική ανάλυση, ενώ πολλές επιπλέον μετρήσεις μπορούν να προκύψουν από αυτές τις τρεις βασικές μετρήσεις.

Ένας τυπικός θερμοσταθμικός αναλυτής αποτελείται από μια ισορροπία ακριβείας με ένα δοχείο δείγματος που βρίσκεται μέσα σε έναν κλίβανο με προγραμματιζόμενη θερμοκρασία ελέγχου. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης η θερμοκρασία αυξάνεται με σταθερό ρυθμό (ή για ορισμένες εφαρμογές η θερμοκρασία ελέγχεται για σταθερή απώλεια μάζας) με σκοπό την πρόκληση θερμικής αντίδρασης. Η θερμική αντίδραση μπορεί να προκύψει σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα, κενού, αδρανούς αερίου, διαφόρων οξειδωτικών και αναγωγικών αερίων, διαβρωτικά αέρια, εξαερωτικά και ατμούς υγρών. Η εφαρμοζόμενη πίεση που δύναται να εφαρμοστεί είναι υψηλό κενό, υψηλή πίεση, σταθερή πίεση ή ελεγχόμενη πίεση.



Εικόνα 25. Όργανο TGA / DSC 1 STARe System Thermobalance, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA

Τα θερμοσταθμικά δεδομένα που συλλέγονται από μια θερμική αντίδραση συγκεντρώνονται σε μια γραφική παράσταση μάζας ή ποσοστό της αρχικής μάζας στον άξονα Υ συναρτήσει είτε της θερμοκρασίας είτε του χρόνου στον άξονα Χ. Η καμπύλη που συλλέγεται αναφέρεται ως καμπύλη TGA.



Διάγραμμα 1. Τυπική καμπύλη TGA με χαρακτηριστικά θερμοκρασιακά εύρη για κάθε είδος υλικού

1.9.3 Μελέτη δομικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής Φασματοσκοπίας FTIR

Το φασματόμετρο FTIR χρησιμοποιείται ευρέως ως τεχνική ανάλυσης στην οργανική σύνθεση, την επιστήμη πολυμερών, την πετροχημική μηχανική, τη φαρμακευτική βιομηχανία και την ανάλυση τροφίμων. Το εύρος της περιοχής υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι 12800 - 10 cm⁻¹ και μπορεί να χωριστεί σε περιοχή εγγύς υπέρυθρου (12800 - 4000 cm-1), περιοχή μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (4000 - 200 cm⁻¹) και περιοχή άπω υπερύθρου (50 - 1000 cm⁻¹).

Το υπέρυθρο φάσμα είναι ένα μοριακό δονητικό φάσμα. Όταν εκτίθενται σε υπέρυθρη ακτινοβολία, τα μόρια δείγματος απορροφούν επιλεκτικά την ακτινοβολία συγκεκριμένων μηκών κύματος, μεταβάλλοντας τη διπολική ροπή τους. Κατά συνέπεια, τα ηλεκτρόνια της θεμελιώδους κατάστασης διεγείρονται σε διεγερμένα δονητικά και περιστροφικά επίπεδα. Η συχνότητα της κορυφής απορρόφησης που αντιστοιχεί σε κάθε αυτοτελή δεσμό καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά διεγερμένης και θεμελιώδους στάθμης, καθώς ο αριθμός των κορυφών καθορίζεται από τους βαθμούς ελευθερίας του μορίου που μελετάται. Η ένταση των κορυφών απορρόφησης αποτελεί ένα δείκτη ποσοτικοποίησης της πιθανότητας δονητικής μετάβασης.

Τα περισσότερα μόρια είναι υπέρυθρα ενεργά εκτός από αρκετά ομοπυρηνικά διατομικά μόρια όπως Ο₂, N₂ και Cl₂ λόγω της μηδενικής μεταβολής διπολικής

ροπής στη δόνηση και περιστροφή αυτών των μορίων. Αυτό που κάνει τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας ακόμη πιο χρήσιμη είναι το γεγονός ότι δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης δείγματα αερίων, υγρών και στερεών.

Ένα κοινό φασματόμετρο FTIR αποτελείται από την πηγή, την οποία αποτελεί μια λάμπα βολφραμίου, ένα ιντερφερόμετρο, το δείγμα, τον ανιχνευτή σήματος, τον ενισχυτή, τον μετατροπέα αναλογικού σε ψηφιακού σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η πηγή παράγει ακτινοβολία που περνά το δείγμα μέσω του συμβολομέτρου και φτάνει στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται και μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα από τον ενισχυτή και τον μετατροπέα αναλογικού σο ψηφιακό, αντίστοιχα. Τέλος, το σήμα μεταφέρεται σε έναν υπολογιστή στον οποίο πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier.



Εικόνα 26. Όργανο FTIR FT-IR-4200 (Jasco).

Ακολούθως παρατίθεται χαρακτηριστικό φάσμα διοξειδίου του άνθρακα (CO₂).



Διάγραμμα 2. Φάσμα απορρόφησης FTIR CO₂.

1.9.4 Μελέτη μορφολογικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής SEM

Αποτελεί ένα από τα χρήσιμα εργαλεία ανάλυσης και παρατήρησης μικροδομώννανοδομών. Προσφέρει μέγιστη μεγέθυνση και ακρίβεια ανάλυσης, της τάξης 1.000.000x και διακριτική ικανότητα που φτάνει 1-5 nm. Επίσης, σε σύγκριση με το οπτικό μικροσκόπιο διευρύνει το βάθος του πεδίου κατά 2 τάξεις μεγέθους, που κυμαίνονται από 1 μm σε μεγέθυνση 10⁴x και έως 2 mm σε μεγέθυνση 10x. Επίσης, το SEM δίνει τη δυνατότητα στοιχειακής ανάλυσης μέσω των ακτινών X (X rays), ανάλυση που όμως δεν χρειάστηκε στην παρούσα μελέτη.

Συνοπτικώς, τα τμήματα του μικροσκοπίου SEM είναι η στήλη του μικροσκοπίου (δημιουργία, ενίσχυση και κατεύθυνση ηλεκτρονίων συγκεκριμένης συχνότητας), το θάλαμο του δείγματος, το σύστημα δημιουργίας κενού υποβοηθούμενο από την αντλία πετρελαίου και τέλος το ηλεκτρονικό σύστημα ελέγχου και εικόνας. Η τυπική διάταξη ενός μικροσκοπίου SEM διαφαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 27. Μικροσκόπιο SEM, Quanta 200 της εταιρείας EDAX

1.10 Αξιολόγηση βιοδραστικότητας -Δοκιμασία DPPH

Η αξιολόγηση βιοδραστικότητας της κουμαρινικών αναλόγων, τόσο σε ελεύθερη, όσο και σε εγκλεισμένη μορφή, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη δραστικότητα της κουμαρινικής ένωσης και τη μεταβολή των ιδιοτήτων αυτών κατά την ενσωμάτωσή της σε λιπιδικά νανοσωματίδια. Στην παρούσα ενότητα εξετάζεται η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μέσω της δοκιμασίας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυνη, C₁₈H₁₂N₅O₆, Sigma Aldrich D9132-1G).



Εικόνα 28. Αναπαράσταση δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του αντίστοιχου διαλύματος

Η συγκεκριμένη οργανική ένωση σταθεροποιείται σε υγρή φάση διαθέτοντας ασύζευκτη ρίζα σε άτομο του αζώτου, όπως διαφαίνεται και στην παραπάνω εικόνα. Όταν η ένωση ευρίσκεται επιδιαλυτωμένη και με τη μορφή ασύζευκτης ρίζας χαρακτηρίζεται από ιώδες χρώμα, ενώ όταν η ρίζα δεσμεύεται από την παρουσία αντιοξειδωτικού, το διάλυμα της ένωσης αποκτά έναν ωχρό χρωματισμό. Σύμφωνα με αυτό το γεγονός, η παρουσία χημικής ένωσης που παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή διαθέτει την ικανότητα δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, αποχρωματίζει το διάλυμα της ελεύθερης ρίζας DPPH [32].

Ουσιαστικά, η δέσμευση της ελεύθερης ρίζας προκαλεί μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος από ιώδες σε ωχρό. Η ανίχνευση της αντιοξειδωτικής δράσης συμβαίνει είτε με την οπτική μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, είτε με τη μέτρηση απορρόφησης σε μήκος κύματος λexc = 515 nm. Ακολούθως, παρουσιάζεται φάσμα απορρόφησης διαλύματος DPPH.



Διάγραμμα 3. Φάσμα απορρόφησης διαλύματος DPPH.

1.10 Κινητική μοντελοποίηση απελευθέρωσης βιοδραστικής ουσίας

Η απελευθέρωση της βιοδραστικής ουσίας από το εσωτερικό των λιπιδικών συστημάτων φορέων δύναται να ακολουθήσει μία συγκεκριμένη μαθηματική προσέγγιση. Γι' αυτόν το λόγο έχει γίνει προσπάθεια δημιουργίας μαθηματικών μοντέλων προσέγγισης του ρεαλιστικού τρόπου και ρυθμού απελευθέρωσης της επιθυμητής βιοδραστικής ουσίας.

Τα μαθηματικά μοντέλα έχουν ως κύριο στόχο την προσπάθεια ποσοτικοποίησης και την πρόβλεψη της απελευθέρωσης των εγκλεισμένων βιοδραστικών ουσιών συναρτήσει του χρόνου. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων του φαινομένου, όπως του συντελεστή διάχυσης της δραστικής ουσίας, μέσω των οποίων γίνεται εφικτή η πρόβλεψη του προφίλ απελευθέρωσης [33].

Ακολούθως παρατίθενται τα μαθηματικά μοντέλα που έχουν στοχεύουν στον προσδιορισμό κινητικότητας απελευθέρωσης βιοδραστικών ουσιών από λιπιδικά νανοσωματίδια.

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

1.10.1 Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order)

Η κινητική μηδενικής τάξης περιγράφει χημικά συστήματα, στα οποία η διεργασία πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξαρτήτως της συγκέντρωση της δραστικής ουσίας.

Η εξίσωση για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης είναι:

$\mathbf{C}_{\mathsf{t}} = \mathbf{C}_0 + \mathbf{k}_0 \mathbf{t}$

Όπου:

C₀: Η αρχική ποσότητα του δραστικής ουσίας στη διασπορά

 C_t : Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται σε χρόνο t

k₀: Η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης

t: χρόνος σε h

Το μοντέλο αυτό εφαρμόζεται σε συστήματα απελευθέρωσης όπου η απελευθέρωση πραγματοποιείται μέσω της ωσμωτικής πίεσης από το εσωτερικό των λιπιδικών Νανοσωματιδίων στο εξωτερικό της υδατικής διασποράς ή όπου οι βιοδραστικές ενώσεις περικλείονται από διαπερατή μήτρα.

1.10.2 Μοντέλο πρώτης τάξης (First order)

Η κινητική πρώτης τάξης χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απελευθέρωση βιοδραστικής ουσίας και αφορά συστήματα όπου ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται σε ευθεία αναλογία από την συγκέντρωση της ουσίας.

Η εξίσωση για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης είναι η εξής:

$LogQ_t = LogQ_0 + k_t/2.303$

Όπου:

 Q_0 : Η αρχική ποσότητα της βιοδραστικής ουσίας στην υδατική διασπορά

 Q_t : Η ποσότητα της βιοδραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t

k: Η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης

t: χρόνος σε h

Το μοντέλο αυτό εφαρμόζεται σε συστήματα απελευθέρωσης όπου οι βιοδραστικές ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές και περικλείονται από πορώδη μήτρα.

1.10.3 Κινητικό Μοντέλο «Higuchi»

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

Η εξίσωση για το κινητικό μοντέλο «Higuchi» είναι:

Q=k_Ht₁/2 ή M_t/M_o=kt₁/2

Όπου,

Q: Η ποσότητα της βιοδραστικής ουσίας που διαλύεται σε χρόνο t_1

k_H: 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 της διαλυτότητα της ουσίας
- II. Η διάχυση της ουσίας πραγματοποιείται κατά μία μόνο διάσταση
- III. Το πάχος του δισκίου είναι αρκετά μεγαλύτερο από ότι το μέγεθος των μορίων της δραστικής ουσίας
- IV. Η διόγκωση ή διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέα
- V. Ο ρυθμός διάχυσης της δραστικής ουσίας είναι σταθερός
- VI. Στο περιβάλλον απελευθέρωσης ισχύουν τέλειες συνθήκες βύθισης

1.10.4 Κινητικό Μοντέλο «Korsmeyer – Peppas»

Το κινητικό μοντέλο «Korsmeyer – Peppas» είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που περιγράφει την απελευθέρωση της βιοδραστικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα με βάση την εκθετική σχέση της απελευθέρωσης και του χρόνου. Αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα κινητικά μοντέλα που συνήθως περιγράφει τα περισσότερα συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών.

Η εξίσωση «Korsmeyer-Peppas» είναι η εξής:

F=(M_t/M)=k_mt_n

Όπου,

F: Κλάσμα της βιοδραστικής ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t

 M_t : Ποσότητα της βιοδραστικής ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t

Μ: Συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή ή σε ισορροπία

 k_m : Κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος

t: χρόνος σε h

n: Εκθέτης διάχυσης ή απελευθέρωσης

Αυτή η εξίσωση δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της βιοδραστικής ένωσης

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου «Korsmeyer-Peppas» χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές υποπεριπτώσεις που ισχύουν για τον εκθέτη απελευθέρωσης (n):

• 0.5 < n < 1

Σε αυτή την περίπτωση ισχύει μη Fickian διάχυση, δηλαδή ανώμαλη μεταφορά ουσίας

Για n≤0.5,

Στην περίπτωση αυτή κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης και η κινητική τέτοιων συστημάτων χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό διάχυσης

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.1 Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται συνοπτικώς η συνθετική πορεία των επιλεχθέντων κουμαρινικών αναλόγων. Σχηματικά, οι κουμαρινικές ενώσεις που συντέθηκαν ήταν οι εξής:



Εικόνα 29. Μοριακοί τύποι κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Απεικονίζονται a) 7,8-διυδροξυ-4φαινυλο-κουμαρίνη, b) 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και c) 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη.

2.1.1 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

Η σύνθεση των επιθυμητών κουμαρινικών αναλόγων, με υποκατάσταση υδρόξυκαι διυδρόξυ- ομάδων στο βενζολικό δακτύλιο της 4-φαινυλο-κουμαρίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον μηχανισμό συμπύκνωσης "Pechmann" (βλ. Κεφάλαιο 2.2). Το προϊόν παράχθηκε με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων πρόδρομων ενώσεων, παρουσία όξινου καταλύτη τριφθορο-οξικού οξέος (CF₃COOH). Η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία T=75°C, παρουσία αδρανούς αερίου N₂, υπό ανάδευση. Το προϊόν σχηματίστηκε έπειτα από 1 ημέρα. Στο κεφάλαιο 3 παρουσιάζεται εκτενώς η πειραματική διαδικασία.

Ακολούθως, παρατίθεται γενικό σχήμα αντίδρασης που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 29. Γενικό σχήμα αντίδρασης προς σύνθεση υδροξυ- ή διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρινών.

2.1.1.2 Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (a)

Το προϊόν παράχθηκε με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων πρόδρομων ενώσεων, στις οποίες συγκαταλέγεται ο βενζοϋλοξικός αιθυλεστέρας (C₈H₈O₂) και η πυρογαλλόλη (C₆H₃(OH)₃), παρουσία όξινου καταλύτη τριφθορο-οξικού οξέος (CF₃COOH).

2.1.1.2 Σύνθεση της 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (b)

Το προιόν σχηματίστηκε με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων φλορογλυκινόλης (C₆H₃(OH)₃) και βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα, παρουσία όξινου καταλύτη τριφθορο-οξικού οξέος.

2.1.1.3 Σύνθεση της 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (c)

Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες ρεσορκινόλης (C₆H₃(OH)₂) και βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα, παρουσία όξινου καταλύτη τριφθοροοξικού οξέος.

2.2 Μηχανισμοί αντιδράσεων

Ο σκοπός της παρούσας ενότητας είναι η εστίαση στον μηχανισμό αντίδρασης προς παραγωγή των τριών κουμαρινικών προϊόντων, ο λεγόμενος μηχανισμός συμπύκνωσης "Pechmann" [34].

2.2.1 Μηχανισμός συμπύκνωσης Pechmann

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων παρουσία όξινου καταλύτη (τριφθορο-οξικό οξύ), ακολουθεί την παρακάτω πορεία:



Αναλυτικότερα, τα στάδια του μηχανισμού αντίδρασης είναι τα εξής:

Μετεστεροποίηση (Trans-esterification)



Ενδομοριακή υδροξυλίωση (Intramolecular hydroxylation)



Αφυδάτωση (Dehydration)



56

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η σύνθεση κουμαρινικών ενώσεων με αξιόλογη βιοδραστικότητα καθώς και ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη λιπιδικών νανοσωματιδίων που δρουν ως φορείς βιοδραστικών ουσιών. Οι κουμαρινικές ενώσεις που επιλέχθηκαν αναμένεται να παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση λόγω της ύπαρξης μίας ή και δύο υδροξυλικών ομάδων στη μοριακή δομή τους. 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.



Εικόνα 30. Μοριακοί τύποι κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Απεικονίζονται a) 7,8-διυδροξυ-4φαινυλο-κουμαρίνη, b) 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και c) 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη.

Αναλυτικότερα, συντέθηκαν τρία κουμαρινικά ανάλογα (βλ. Εικόνα 33), η 7,8διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (a), η 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (b) και η 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (c). Το σύνολο των κουμαρινικών ενώσεων εξετάστηκαν ως προς την καθαρότητά τους, μέσω της Φασματοσκοπίας ¹Η NMR, αλλά και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (δοκιμασία δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH). Το κουμαρινικό παράγωγο (a) που επέδειξε τη βέλτιστη δράση, επιλέχθηκε να εγκλειστεί στα λιπιδικά νανοσυστήματα.

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά συστήματα νανοφορέων, τα Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SLNs), τα Νανοδομημένα Σωματίδια Στερεών Λιπιδίων (NLCs) και τέλος τα Νιοσωμάτα (Niosomes). Η επιλογή των λιπιδικών συστημάτων προέκυψε με κριτήριο τη βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα που παρουσιάζουν.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός των παραπάνω ενώσεων σε λιπιδικά νανοσωματίδια, 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 (FTIR). Τα λιπιδικά νανοσωματίδια υποβλήθηκαν ακόμη και σε μελέτη προσδιορισμού των θερμικών ιδιοτήτων, με τη βοήθεια της τεχνικής Θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA). Ακόμη, τα λιπιδικά νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν υποβλήθησαν σε διαδικασία προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής τους δράσης, μέσω της δοκιμασίας DPPH.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη απελευθέρωσης της ενσωματωμένης κουμαρινικής ένωσης και μελέτη κινητικής μοντελοποίησης.

ΜΕΡΟΣ Β

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ-ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

ΙΙ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ-ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ-

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Στην παρούσα ενότητα παρατίθενται η πειραματική διαδικασία, τόσο για τη σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων, όσο και για τη σύνθεση λιπιδικών νανοσωματιδίων ως φορείς βιοδραστικών ουσιών, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα κουμαρινικά ανάλογα. Αρχικά, γίνεται αναφορά στην πειραματική διαδικασία σύνθεσης των τριών κουμαρινικών αναλόγων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα (βλ. Υποκεφάλαια 2.1.1 έως 2.1.3). Εν συνεχεία, αναφέρεται η πειραματική διαδικασία σύνθεσης των τριών κουσιών διαφορετικών νανοσυστημάτων με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση, εκ των οποίων είναι τα SLNs, τα NLCs και τα Nιοσώματα (Niosomes).

Ακολούθως, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία χαρακτηρισμού των κουμαρινικών παραγώγων και των νανοσωματιδίων. Γίνεται περιγραφή της διαδικασίας υπολογισμού απόδοσης εγκλεισμού, καθώς και της μελέτης βιοδραστικότητας, τόσο των κουμαρινικών ενώσεων σε επιδιαλυτωμένη μορφή, όσο και των συστημάτων νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση. Τέλος, γίνεται αναφορά στις μεθόδους πραγματοποιίησης δομικού, μορφολογικού και θερμικού χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων.

3.1 Οργανολογία

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση τόσο των κουμαρινικών αναλόγων, όσο και των συστημάτων λιπιδικών νανοσωματιδίων ως φορείς κουμαρινικών ενώσεων, παρουσιάζουν ομοιότητες. Ακολούθως, παρατίθενται ονομαστικά τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικός πίνακας οργάνων και συσκευών που χρησιμοποιήθηακ για τη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων και λιπιδικών νανοσωματιδίων.

Όργανα και Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Αναλυτικός ζυγός	ADJ 200-4	Kern
Συσκευή υπερήχων	Vibra Cell probe sonicator (400 W)	Sonics & Materials Inc. company

Συσκευή Shaker	Temperature Controlled Shaker	Gallenkamp
Αντλία υψηλού κενού	RV-5	Edwards
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
Συσκευή λυοφιλοποίησης	Frozen In Time	Lablyo Mini
Φυγόκεντρος	Sorvall LYNX 6000	Thermo Scientific
Plate reader	Spectra Max 250	Molecular Devices

3.2 Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

3.2.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινικών αναλόγων



Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης φαινόλης (1eq) και σε στοιχειομετρική αναλογία ποσότητα βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα (1eq). Έπειτα από την προσθήκη των δύο αντιδραστηρίων ακολούθησε η προσθήκη του όξινου καταλύτη τριφθορο-οξικού οξέος (0.25eq). Στην σφαιρική φιάλη

τοποθετήθηκε κάθετος ψυκτήρας και μπαλόνι αερίου αζώτου (N₂).

Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75°C για 24 ώρες.

Η λήξη της αντίδρασης και η παραλαβή του τελικού προϊόντος αξιολογήθηκε με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, TLC, (Thin Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Η ανάπτυξη των χημικών ενώσεων (αντιδραστηρίων και προϊόντος) πραγματοποιήθηκε σε κλειστό θάλαμο, παρουσία μίγματος διαλυτών.

Στις συγκεκριμένες συνθετικές πορείες χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (PE, Petroleum ether) / οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc, Ethyl acetate) με αναλογία 3:2. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με λάμπα Υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας με μήκος κύματος διέγερσης λexc = 254 nm και ακολούθως με εμποτισμό σε αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) 7%w/v, και μετέπειτα θέρμανση αυτών με πιστολάκι θερμού αέρα (heatgun) [35-38]. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στη σφαιρική φιάλη προστέθηκε ποσότητα κρύου νερού για καταβύθιση του προϊόντος. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό. Το ίζημα ξηράνθηκε και συλλέχθηκε.

Για τον καθαρισμό του προϊόντος, ακολούθησε ανακρυστάλλωση ή καθαρισμός με διαιθυλαιθέρα με σκοπό την απομάκρυνση ακαθαρσιών, παραπροϊόντων και αντιδραστηρίων που δεν συμμετείχαν στην αντίδραση.

3.2.2 Σύνθεση 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (a)



Σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, σε σφαιρική φιάλη των 25 mL προστέθηκε ποσότητα πυρογαλλόλης (518.7 mg, 4.1103 mmol) και ποσότητα βενοϋλοξικού αιθυλεστέρα (709 μL, 4.1103 mmol), με ειδική πιπέτα ακριβείας (Gilson). Έπειτα από την προσθήκη των δύο αντιδραστηρίων ακολούθησε ο όξινος καταλύτης τριφθορο-οξικού οξέος (1 mL).

Για τον καθαρισμό του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση του προϊόντος με τη χρήση ποσότητας διαλύτη Διχλωρομεθανίου (10 mL)-Μεθανόλης (3 mL), με θέρμανση στους 40°C. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κατάψυξη με σκοπό την καταβύθιση του επιθυμητού προϊόντος για 1 ημέρα. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με εκπλύσεις ποσότητας ψυχρού διχλωρομεθανίου. Το ίζημα ξηράνθηκε σε αντλία κενού και συλλέχθηκε.

Το προϊόν (a) που παράχθηκε παρουσιάζει υψηλή φωτοευαισθησία και χαμηλή αντοχή σε οργανικούς διαλύτες, λόγω της υψηλής ευαισθησίας σε οξείδωση που επιδεικνύει. Κρίνεται αναγκαία η φύλαξη και αποθήκευση της ένωσης σε συνθήκες σκότους.

Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 70%

Σημείο τήξης: 188-189° C (Σ.Τ βιβλιογραφίας 194-197° C) [45]

¹**H NMR:** (600MHz, DMSO-*d6*): *δ* (ppm) 10.19 (s, 1H, -OH), 9.42 (s, 1H, -OH), 7.50-7.55 (m, 5H, H2'έως H6'), 6.76 (d, *J*= 9.9Hz, 1H, H6), 6.79 (d, *J*= 9.8Hz, 1H, H5), 6.13(s, 1H, H3).

3.2.2 Σύνθεση της 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (b)

Η συγκεκριμένη ένωση (b) παράχθηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται παραπάνω. Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλη ποσότητα φλωρογλυκινόλης (C₆H₃(OH)₃, 254.6 mg, 2.0189 mmol) και βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα (348.7 mL, 2.0189 mmol). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία όξινου καταλύτη τριφθορο-οξικού οξέος (0.5 mL). Για τον καθαρισμό του προϊόντος ακολούθησε έκπλυση του στερεού με ποσότητα ψυχρού διαλύτη διαιθυλαιθέρα και διήθηση υπό κενό. Το καθαρό στερεό ξηράνθηκε σε αντλία κενού και συλλέχθηκε.

Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 40%.**Σημείο τήξης**:230-235° C (Σ.Τ βιβλιογραφίας 245-247°C) [46]

¹**H NMR:** (600 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) 10.40 (s, 1-OH), 10.12 (s, 1-OH), 7.34 (m, 5H, H2'-H6'), 6.27 (d, J=4.2, 1H, H8), 6.16(d, J=4.8Hz, 1H, H6), 5.74 (s, 1H, H3).

3.2.3 Σύνθεση της 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (c)



Η συγκεκριμένη ένωση (c) παράχθηκε σύμφωνα με τη γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται παραπάνω Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες ρεσορκινόλης (C₆H₃(OH)₂, 249.6 mg, 2.2670 mmol) και βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα (391.4 μL, 2.2670 mmol). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία όξινου καταλύτη

τριφθορο-οξικού οξέος (0.5 mL).

Ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με ανακρυστάλλωση παρουσία διαλυτών Διχλωρομεθανίου (10 mL)-Μεθανόλης (3 mL), ψύξη και διήθηση του τελικού προϊόντος. Το καθαρό πλέον προϊόν ξηράνθηκε σε αντλία κενού και συλλέχθηκε.

Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 45%.

Σημείο τήξης: 248-250° C (Σ.Τ βιβλιογραφίας 251-253^oC) [47]

¹**H NMR:**(600MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) 10.66 (s, 1-OH), 7.50-7.56 (m, 5H, H2'έωςH6'), 7.27 (d, J=9Hz, 1H, H5), 6.81 (d, J=1.8Hz, 1H, H8), 6.78(dd, J=2.4, 9 Hz, 1H, H6), 6.15 (s, 1H, H3).

3.3 Παρασκευή Νανοσωματίδιων

3.3.1 Παρασκευή SLNs

Ως συστήματα εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων επιλέχθηκαν τα εξής συστήματα: τα SLNs, τα NLCs και τέλος τα Νιοσωμάτα. Η επιλογή του λιπιδικού συστήματος προέκυψε με κριτήριο τη βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα που παρουσιάζουν.

Ως στερεό λιπίδιο επιλέχθηκε η Τριμυριστίνη-ΤΜ για τη σύνθεση των SLNs, NLCs.



Εικόνα 32. Μοριακή δομή Αμυγδαλέλαιου

Για τη σύνθεση των Νιοσωμάτων αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκε η χοληστερόλη. Το λιπίδιο ήταν εμπορικής προέλευσης.



Εικόνα 33. Μοριακή δομή Χοληστερόλης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των τριών συστημάτων λιπιδικών νανοσωματιδίων ήταν κοινή και ήταν αυτή της γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη. Σε παρακάτω υποκεφάλαια περιγράφεται αναλυτικώς η πειραματική διαδικασία σύνθεσης αυτών.

3.3.2 Απομόνωση τριμυριστίνης από μοσχοκάρυδο

Ποσότητα στερεού μοσχοκάρυδου σε σκόνη (25 gr) και διαιθυλαιθέρας (70 mL), τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη 250 mL. Το μίγμα αναδεύεται με ήπια θέρμανση (40° C) για 1 ώρα.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό, παραλαβή του διηθήματος και εξάτμιση διαλύτη με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα και τέλος ξήρανση του διηθήματος, με τη χρήση αντλίας ξήρανσης υπό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι καθαρισμού της TM, οι οποίοι περιλάμβαναν ανακρυστάλλωση σε ακετόνη (1 mL ακετόνης για κάθε 50 mg ακαθαρτης TM) και διήθηση για την παραλαβή του τελικού προϊόντος. Σκοπός ήταν η παραλαβή καθαρού στερεού λιπιδίου TM λευκού χρώματος.

3.3.3 Παρασκευή SLNs (SLNs) με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, με προσαρτημένο κάθετο ψυκτήρα, τοποθετήθηκε επιθυμητή ποσότητα στερεής TM (200 mg) και τέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση έως 70°C, με σκοπό την τήξη του λιπιδίου.

Αφότου επήλθε η τήξη της TM, προστέθηκε ποσότητα επιφανειοδραστικού αντιδραστηρίου L-α-φωσφατιδυλοχολίνης (PC, 50 mg) και αιθανόλης (1 mL). Στη συνέχεια, προστέθηκε στη φιάλη ποσότητα αιθανολικού διαλύματος (2 mL) της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης (a) (20 mg). Το παραπάνω μίγμα αποτέλεσε την οργανική φάση του γαλακτώματος.

Την υδατική φάση αποτέλεσε υδατικό διάλυμα 1% w/v του επιφανειοδραστικού αντιδραστηρίου "Tween 80" σε τελικό όγκο 10 mL υπερκάθαρου νερού. Το διάλυμα μεταγγίστηκε στάγδην στην σφαιρική φιάλη, αφότου έχει επέλθει πλήρης διάλυση του και έχει αποκατασταθεί θερμοκρασία διαλύματος όμοια με αυτή του τηγμένου λιπιδίου (T = 70°C).

Με την στάγδην και ομαλή προσθήκη της υδατικής φάσης (1 σταγόνα / 1 sec) δημιουργήθηκε γαλάκτωμα ελαφρώς ωχρού χρώματος, το οποίο αφέθηκε σε έντονη ανάδευση για 1 ώρα. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι απαιτήθηκαν συνθήκες σκότους κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, λόγω της υψηλής φωτοευαισθησίας του επιλεγμένου κουμαρινικού παραγώγου.

Με το πέρας της 1 ώρας, το γαλάκτωμα αφέθηκε προς φυσική ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Μετέπειτα βήμα αποτέλεσε η εφαρμογή υπερήχων στη διασπορά νανοσωματιδίων που σχηματίστηκε. Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των υπερήχων για διάρκεια 5 λεπτών (120 Watt). Κατά την διάρκεια αυτών κρίθηκε απαραίτητη η ύπαρξη παγόλουτρου για απαγωγή της εκλυόμενης θερμότητας [39].

Τέλος, η διασπορά νανοσωματιδίων αφέθηκε προς ανάδευση και εξάτμιση ποσότητας αιθανόλης/νερού με τη βοήθεια Incubator-Shaker (80 rpm, 37°C) overnight. Η διασπορά συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Αντιδραστήριο	Ποσότητες	Κωδικός
ТМ	200 mg	
PC	50 mg	Sigma, 110M7024V
Tween 80	100mg	Alfa Aesar, L07032
Κουμαρίνη (a)	20 mg	

Πίνακας 2. Πίνακας ποσοτήτων αντιδραστηρίων για τη συνθετική πορεία SLNs

Αιθανόλη	3 mL	Acros 463680025	Organics,
Υπερκάθαρο Νερό	10 mL		

Ακολουθεί σχηματική αναπαράσταση μεθόδου παρασκευής SLNs με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a).



Εικόνα 34. Σχηματική αναπαράσταση πορείας παρασκευής SLNs (γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη) με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση

Με την ίδια μέθοδο αλλά χωρίς την προσθήκη κουμαρινικής ένωσης, παρασκευάστηκαν και «κενά» (blank) SLNs.

3.3.4 Παρασκευή NLCs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Για τη σύνθεση των NLCs ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία της σύνθεσης SLNs (βλ. Υποκεφάλαιο 3.2.1). Ειδοποιός διαφορά καθίσταται η προσθήκη υγρού λιπιδίου (αμυγδαλέλαιου) έπειτα από την τήξη του στερεού λιπιδίου TM [26, 39]. Οι αναλογίες στερεού προς υγρού λιπιδίου που εξετάστηκαν είναι TM:αμυγδαλέλαιο 70:30 και 85:15.

Ακολουθεί σχηματική αναπαράσταση μεθόδου παρασκευής NLCs με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a).



Εικόνα 35. Σχηματική αναπαράσταση πορείας παρασκευής NLCs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση

Ακολουθεί πίνακας ποσοτήτων της συνθετικής πορείας και των δύο αναλογιών:

Αντιδραστήριο	Ποσότητες		Κωδικός
Αναλογία στερεού:υγρού λιπιδίου	85:15	70:30	
ТМ	170 mg	140 mg	
Αμυγδαλέλαιο	36.6 mL	65.2 mL	Zarbis, 72010332
PC	50 mg	50 mg	Sigma, 110M7024V
Tween 80	100 mg	100 mg	Alfa Aesar, L07032
Κουμαρίνη (a)	20 mg	20 mg	
Αιθανόλη	3 mL	3 mL	Acros Organics, 463680025
Υπερκάθαρο Νερό	10 mL	10 mL	

Πίνακας 3. Πίνακας ποσοτήτων αντιδραστηρίων για τη συνθετική πορεία NLCs

Με την ίδια μέθοδο αλλά χωρίς την προσθήκη κουμαρινικής ένωσης, παρασκευάστηκαν και «κενά» NLCs.

3.3.5 Παρασκευή Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση(a)

Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL τοποθετήθηκε ποσότητα υπερκάθαρου νερού και αφέθηκε προς θέρμανση σε θερμοκρασία 60° C με τη βοήθεια θερμαντικής πλάκας, αφότου προσαρτήθηκε κατάλληλα σε κάθετο ψυκτήρα. Αυτό αποτέλεσε την υδατική φάση του γαλακτώματος.

Αφότου σταθεροποιήθηκε η θερμοκρασία της υδατικής φάσης, πραγματοποιήθηκε στάγδην προσθήκη αιθανολικού διαλύματος τηγμένου λιπιδίου Χοληστερόλης (100 mg), ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα "Span 60" και ποσότητα της κουμαρίνης (a). Το αιθανολικό διάλυμα αποτέλεσε την οργανική φάση του γαλακτώματος [26].

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αναλογίες: Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:100:10 (w/w/w) σε υδατική φάση ποσότητας των 45 mL, καθώς και η αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:10 σε υδατική φάση των 45 mL, και των 10mL. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε υδατική φάση των 10mL.

Η προσθήκη της οργανικής στην υδατική φάση πραγματοποιήθηκε με ρυθμό 1 mL ανά 5 λεπτά, προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο αυτό-συμπύκνωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα και του λιπιδίου, χωρίς τη δυνατότητα σχηματισμού των επιθυμητών σωματιδίων και εγκλεισμού της ένωσης σε αυτά [40].

Με την ολοκλήρωση προσθήκης των αντιδραστηρίων, το σχηματισθέν γαλάκτωμα τέθηκε σε έντονη ανάδευση. Με το πέρας της 1 ώρας, η διασπορά αφέθηκε προς εξάτμιση σε όργανο Incubator-Shaker για 1 ημέρα. Τέλος, εφαρμόστηκαν υπέρηχοι για διάρκεια 5 λεπτών (120 Watt) και αποθήκευση στους 4 °C.

Ακολουθεί σχηματική αναπαράσταση μεθόδου παρασκευής Νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a).



Εικόνα 36. Σχηματική αναπαράσταση πορείας παρασκευής Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση.

Ακολουθεί πίνακας ποσοτήτων:

Πίνακας 4. Πίνακας ποσοτήτων αντιδραστηρίων για τη συνθετική πορεία Νιοσωμάτων

Αντιδραστήριο	Ποσότητες	Κωδικός
Χοληστερόλη	100 mg	Alfa Aesar, A1170
Span 60	100 / 200 mg	Alfa Aesar, L11435
Κουμαρίνη (a)	10 / 20 mg	
Αιθανόλη	3 / 5mL	Acros Organics, 463680025
Υπερκάθαρο Νερό	10/45 mL	

Με την ίδια μέθοδο αλλά χωρίς την προσθήκη κουμαρινικής ένωσης, παρασκευάστηκαν και «κενά» Νιοσώματα.

ΙΙ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ-ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

3.4 Χαρακτηρισμός κουμαρινικών αναλόγων

Ο χαρακτηρισμός των κουμαρινικών αναλόγων που συντέθηκαν (βλ. Υποκεφάλαιο 3.2.1-3.2.3) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια Φασματοκοπικών μεθόδων. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της Φασματοσκοπίας NMR και η Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-VIS).

Στην περίπτωση του χαρακτηρισμού με την τεχνική ¹Η NMR εξετάστηκε η καθαρότητα των κουμαρινικών ενώσεων και επαληθεύτηκε η μοριακή δομή τους. Επιπροσθέτως, με τη χρήση της Φασματοσκοπίας UV-VIS δόθηκε η δυνατότητα ποιοτικού χαρακτηρισμού της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης. Ακολούθως, αναλύονται συνοπτικώς οι τεχνικές ανάλυσης [41].

3.4.1 Φασματοσκοπία ¹Η NMR

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Φασματόμετρο NMR (600MHz, Varian). Λήφθηκε φάσμα πρωτονίων (¹Η NMR) με σκοπό την ταυτοποίηση και των τριών κουμαρινικών παραγώγων. Η λήψη του φάσματος πραγματοποιήθηκε έπειτα από παρασκευή διαλύματος ποσότητας της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης (10 mg) σε ποσότητα δευτεριομένου διαλύτη DMSO (Dimethyl sulfoxide). Η λήψη φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και η επεξεργασία αυτών με τη βοήθεια του προγράμματος MasterNova Ltd. Τα αντίστοιχα φάσματα παρατίθενται στο Κεφάλαιο 4.

3.4.2 Φασματοσκοπία UV-VIS

Η διαδικασία λήψης φάσματος απορρόφησης περιλάμβανε αρχικά τη λήψη φάσματος υποβάθρου (blank), στο οποίο μετράται η απορρόφηση του καθαρού διαλύτη. Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε ο διαλύτης DMSO καθώς αποτελεί βέλτιστο διαλυτικό μέσο για τις κουμαρινικές ενώσεις που συντέθηκαν. Οι κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατασκευασμένες από χαλαζία (SiO₂, quartz), διότι ως υλικό επιδεικνύει μηδενική απορρόφηση στην περιοχή του Υπεριώδους. Η φασματική περιοχή που επιλέχθηκε για τις μετρήσεις απορρόφησης ήταν αυτή των 200 έως 500 nm.

Αφότου λήφθηκε φάσμα υποβάθρου, μετρήθηκε η απορρόφηση της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης επιδιαλυτωμένης σε διαλύτη DMSO. Η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης των κουμαρινικών ενώσεων κυμάνθηκε σε λmax= 330-340 nm. Η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και η επεξεργασία με το κατάλληλο πρόγραμμα.

3.5 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια που συντέθηκαν με πορεία που περιγράφεται ανωτέρω, είτε χωρίς, είτε με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a), χαρακτηρίστηκαν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Σε αυτούς συγκαταλέγεται ο υπολογισμός απόδοσης διεργασίας και εγκλεισμού της κουμαρινικής ένωσης, με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας Ορατού-Υπεριώδους (UV-VIS) και η μελέτη απελευθέρωσης της εγκλεισμένης κουμαρινικής ένωσης σε κάθε διαφορετικό λιπιδικό νανοσύστημα

Επιπλέον, χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά (DLS, SEM), δομικά (FTIR) και θερμικά (TGA). Ακολούθως παρατίθενται συνοπτικώς πειραματική διαδικασία και η προετοιμασία των δειγμάτων για λήψη μετρήσεων.

3.5.1 Υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού

3.5.1.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Απαραίτητο βήμα για τον υπολογισμό της ποσότητας εγκλεισμένης ένωσης στα λιπιδικά νανοσυστήματα (SLNs, NLCs, Niosomes) είναι η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με πρότυπο διάλυμα της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης διαλυμένη σε κατάλληλο διαλύτη. Στην συγκεκριμένη σειρά μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη. Για την κατασκευή τόσο της καμπύλης αναφοράς, όσο και για τον υπολογισμό της εγκλεισμένης ποσότητας ένωσης, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Από τη λήψη φασμάτων διαλύματος κουμαρινικής ένωσης διαφορετικών συγκεντρώσεων σημειώθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος λmax = 344 nm. Ακολούθως παρατίθεται καμπύλη αναφοράς της μετρηθείσας κουμαρινικής ένωσης.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης

Η εξίσωση ευθείας που εξήχθη για τον υπολογισμό άγνωστης συγκέντρωσης κουμαρινικής ένωσης (a) είναι η εξής:

$$y = 36.194x + 0.0135(1)$$

Όπου, γ η απορρόφηση του μετρηθέντος δείγματος και x η συγκέντρωση αυτού.

3.5.1.2 Υπολογισμός απόδοσης εγκλεισμού

Η ποσότητα της κουμαρίνης που εγκλείστηκε στα επιθυμητής δομής νανοσωματίδια (SLNs, NLCs, Niosomes) προσδιορίστηκε με τον εξής τρόπο: η διασπορά των νανοσωματιδίων φυγοκεντρήθηκε σε 4.000 rpm για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία T = 15° C. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τον διαχωρισμό αποτελεί την υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων. Η υδατική αυτή διασπορά ογκομετρήθηκε και ακολούθως αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Το ίζημα που καταβυθίστηκε αποτελείται κυρίως από ποσότητα μη δεσμευμένης κουμαρινικής ένωσης και ελεύθερης τριμυριστίνης που δεν έχει συμμετάσχει στον σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Για τον υπολογισμό της ποσότητας μη δεσμευμένης κουμαρινικής ένωσης πραγματοποιήθηκε διάλυση του ιζήματος σε

σύστημα διαλυτών διχλωρομεθανίου : μεθανόλης αναλογίας 1:1 και ακολούθως λήψη φάσματος απορρόφησης σε εύρος μηκών κύματος 200 – 500 nm. Καταγράφοντας την ένταση απορρόφησης στο αναμενόμενο μήκος κύματος μεγίστου (λmax = 330-340 nm) και χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης που έχει αναφερθεί παραπάνω κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της ποσότητας μη δεσμευμένης κουμαρινικής ένωσης

Απόδοση εγκλεισμού = αρχική μάζα κουμαρινικής ένωσης (mg)-μάζα κουμαρινικής ένωσης που δεν εγκλειστηκε(mg) αρχική μάζα κουμαρινικής ένωσης-(mg) * 100% (2)

3.5.1.3 Υπολογισμός απόδοσης 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 (3):

Aπόδοση διεργασίας = $\frac{\mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, \nu \alpha \nu o \sigma \omega \mu \alpha \tau \iota \delta \dot{\omega} \nu \, \pi o \upsilon \, \sigma \upsilon \lambda \lambda \dot{\epsilon} \chi \theta \eta \kappa \alpha \nu \, (mg)}{\alpha \rho \chi \iota \kappa \dot{\eta} \, \mu \dot{\alpha} \zeta \alpha \, TM + DHC / DAPH + PC + Tween 80 (mg)} *100\%$ (3)

- 3.6 Δομικός, μορφολογικός και χημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών νανοσωματιδίων
- 3.6.1 Προσδιορισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους (ή δείκτη πολυδιασποράς, PDI) και ζ-δυναμικού

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, το 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, 10 μL από την προκύπτουσα διασπορά των νανοσωματιδίων αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό προς τελικό όγκο 30 mL και οδηγούνται σε συσκευή υπερήχων (3 min, 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) μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C. Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών.

3.6.2 Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής TGA

Η μελέτη Θερμοσταθμικής Ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του οργάνου TGA/DSC 1 STARe System Thermobalance, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA, σε
θερμοκρασιακό εύρος από 25 °C έως 600 °C, με ένα σταθερό ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min υπό ροή αζώτου (10 mL/min). Μικρή ποσότητα δείγματος (15 mg) τοποθετήθηκε σε ειδικό μεταλλικό καψίδιο (αλουμινίου) εντός ειδικού θερμορυθμιζόμενου θαλάμου. Ως ισοζύγιο αυτού του μεταλλικού καψιδίου τοποθετήθηκε ένα δεύτερο καψίδιο χωρίς δείγμα χρησιμοποιούμενο ως αναφορικό δείγμα.

Μια τυπική μέτρηση TGA περιλαμβάνει τη θέρμανση μέχρι συγκεκριμένο θερμοκρασιακό όριο, σε συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης, με ελεγχόμενο σταθερό ρυθμό και παρακολούθηση της ροής θερμότητας για τον χαρακτηρισμό των μεταβάσεων φάσης και εντέλει εξάχνωσης του δείγματος.

3.6.3 Μελέτη δομικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής Φασματοσκοπίας FTIR

Τα λιπιδικά νανοσυστήματα με ή χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση μετρήθηκαν με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου FTIR-4200 (Jasco). 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).

Αρχικά, λήφθηκε φάσμα υποβάθρου, παρουσία μόνο ατμοσφαιρικού αέρα και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η λήψη μετρήσεων με εύρος κυματάριθμων 4000-400 cm⁻¹. Τα φάσμα πάρθηκαν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και επεξεργάστηκαν με το κατάλληλο πρόγραμμα.

3.6.4 Μελέτη μορφολογικών ιδιοτήτων μέσω της τεχνικής SEM

Η μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Οι απεικονίσεις SEM καταγράφηκαν με το όργανο SEM (Quanta 200) / EDAX, έπειτα από επιχρύσωση διάρκειας 75 sec, σε συνθήκες 25.00 kV, mag (2000x).

Το προς μέτρηση δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική βάση (plate) υπό τη μορφή υδατικής διασποράς νανοσωματιδίων. Με την προσθήκη 1-2 σταγόνων της διασποράς το δείγμα αφέθηκε προς εξάτμιση του νερού, με τα εναπομείναντα σωματίδια στην επιφάνεια της βάσης. Η παρατήρηση του μεγέθους μορφολογίας των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με σάρωση της ηλεκτρονιακής δέσμης σε όλη την έκταση της βάσης, σε μεγέθυνση ικανή για παρατήρηση των δομών. Το σήμα των σκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων) από την επιφάνεια του δείγματος συλλέχθηκε από ειδικό ανιχνευτή, που αποτελεί ένας ημιαγωγός στερεάς κατάστασης (solid state semiconductor), ειδικά προσδεδεμένος στην έξοδο της της στήλης του μικροσκοπίου. Τέλος, η απεικόνιση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3.7 Μελέτη απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ένωσης από τα νανοσυστήματα

Για τη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα λιπιδικά νανοσωματίδια, αρχικά προστέθηκε ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος KHPO₄ - KH₂PO₄, με pH=7,4 (125 mL) σε ποτήρι ζέσεως των 125 mL και θερμάνθηκε μέχρι σταθερής θερμοκρασίας ίσης με 36.6° C, σε θερμαντική πλάκα. Ακολούθως, προστέθηκε σε ειδική διαπερατή μεμβράνη διάλυσης (Dialysis membrane) κυτταρίνης, πόρων διαμέτρου 24 Å, καθορισμένος όγκος υδατικής διασποράς νανοσωματιδίων, αναλόγως το σύστημα που μελετάται. Η ποσότητα διασποράς που προστέθηκε προκύπτει από την υπολογιζόμενη απόδοση εγκλεισμού (βλ. Υποκεφάλαιο 3.3.1).

Αφότου πραγματοποιήθηκε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διασποράς, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄-KH₂PO₄, το οποίο ταυτοχρόνως τέθηκε υπό ήπια ανάδευση. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h και 24 h), έγινε λήψη ποσότητας 2 mL του ρυθμιστικού διαλύματος και ακολούθως λήψη φάσματος απορρόφησης UV-VIS. Κάθε χρονική στιγμή που αφαιρούνταν 2 mL δείγματος από το σύστημα, αναπληρώνονταν 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος.





Εικόνα 37. Σχηματική αναπαράσταση απελευθέρωσης της κουμαρινικής ένωσης με τη βοήθεια μεμβράνης διάλυσης (dialysis membrane). Οι συνθήκες σταθεροποιήθηκαν στους 36.6° C και pH=7.4.

3.8 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρικικών αναλόγων και λιπιδικών νανοσωματιδίων – Δοκιμασία DPPH

Για το χαρακτηρισμό αντιοξειδωτικής δράσης της επιθυμητής κουμαρινικής ένωσης, είτε σε ελεύθερη είτε σε εγκλεισμένη μορφή, επιλέχθηκε η δοκιμασία DPPH.

Η κατασκευή του πρότυπου διαλύματος DPPH πραγματοποιήθηκε με τη διάλυση ποσότητας στερεού DPPH (1.25 mg) σε ποσότητα καθαρής αιθανόλης (50 mL) σε ογκομετρική φιάλη τελικού όγκου 50 mL. Το διάλυμα DPPH αφέθηκε προς ανάδευση σε συνθήκες σκότους για περίπου 20min.

Η δοκιμασία DPPH έγινε με τη βοήθεια πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate), όπως διαφαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Με την πλήρωση κάθε πηγαδιού με συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος DPPH (195 μL), προστέθηκε καθορισμένη ποσότητα διαλύματος του επιθυμητού δείγματος κουμαρινικής ένωσης (5 μL) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Εξετάστηκαν τόσο τα 3 κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη (DMSO), όσο και η υδατική διασπορά των λιπιδικών νανοσωματιδίων (SLNs, NLCs, Niosomes) με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση. Ακόμη, παρασκευάστηκαν δείγματα αναφοράς «control», τα οποία περιέχουν 195μL DPPH και 5μL DMSO.



Εικόνα 38. Πλακίδιο τοποθέτησης δείγματος για ανάπτυξη δοκιμασίας DPPH

Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε Plate reader με χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος 515 nm, σε δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα, των 30 λεπτών και της 1 ώρας. Οι απορροφήσεις των δειγμάτων εξετάζονται ως προς τα δείγματα «control».

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στο παρόν κεφάλαιο της εργασίας παρατίθεται το σύνολο αποτελεσμάτων των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Αρχικά, παρατίθενται φάσματα ¹Η NMR των κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν, με σκοπό την ταυτοποίηση της δομής των προϊόντων. Ακολούθως, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αξιολόγησης βιοδραστικότητας (δοκιμασίας DPPH) των τριών διαφορετικών κουμαρινικών αναλόγων, σε ελεύθερη μορφή.

Εν συνεχεία, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δομικού, μορφολογικού και θερμικού χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της πειραματικής τεχνικής DLS, υπολογίζονται το ζ-δυναμικό, το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς και του δείκτη πολυδιασποράς PDI. Επίσης, μελετήθηκαν οι θερμικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων. Παράλληλα, λήφθηκαν φάσματα FTIR με σκοπό τον προσδιορισμό λειτουργικών ομάδων, τόσο των κουμαρινικών αναλόγων, όσο και των λιπιδικών νανοσυστημάτων. Τέλος, ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ολοκληρώνεται με την μελέτη μορφολογίας νανοσωματιδίων

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται και αναλύεται το προφίλ απελευθέρωσης της κουμαρινικής ένωσης, η οποία επιλέχθηκε για τον εγκλεισμό της στα λιπιδικά νανοσυστήματα. Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αξιολόγησης βιοδραστικότητας (δοκιμασίας DPPH) των λιπιδικών νανοσωματιδίων SLNs, NLCs, και Νιοσωμάτων.

Ι. ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ

4.1Φασματοσκοπική μελέτη ¹Η NMR

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα φάσματα ¹Η NMR για τα τρία διαφορετικά κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν.



4.1.1 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



Το φάσμα που παρουσιάζεται παραπάνω αποτελεί ένα φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης.

Σε χημική μετατόπιση 6.13 ppm συναντάται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H3. Σε χημική μετατόπιση 6.76 ppm (d), J= 9.9Hz, και 6.79 ppm (d) J=10.2Hz και για ολοκλήρωση 2 πρωτονίων εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές που αποδίδονται στα πρωτόνια H5 και H6, αντίστοιχα. Η πολλαπλή κορυφή σε χημικές μετατοπίσεις 7.50 ppm έως 7.55 ppm και για ολοκλήρωση 5 πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου (H2'έως H6').

Τέλος, οι κορυφές σε χημικές μετατοπίσεις 9.42 ppm και 10.19 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων 8 και 7 αντιστοίχως.

4.1.2 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



Διάγραμμα 6. Φάσμα NMR ένωσης 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (300 MHz, DMSO-d₆).

Η απλή κορυφή που ανιχνεύεται σε χημική μετατόπιση 5.74 ppm και ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, αποδίδεται στο H3. Ακολούθως, σε χημικές μετατόπισεις 6.16 ppm και 6.27 ppm ανιχνεύονται 2 διπλές κορυφές (d), με J=2.1 Hz, J=2.4Hz, για ολοκλήρωση 2 πρωτονίων που αντιστοιχούν σε meta αλληλεπίδραση των πρωτονίων H6 και H8. Σε χημική μετατόπιση 7.34 έως 7.37 ppm και για ολοκλήρωση 5 πρωτονίων (2 διπλές, 3 τριπλές) συναντάται μία πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στα πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου (H2' έως H6').

Τέλος, σε χημική μετατόπιση 10.12 ppm και 10,40 ppm ανιχνεύονται τα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων 7 και 5 αντιστοίχως.

4.1.3 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



Διάγραμμα 7. Φάσμα NMR ένωσης 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (600 MHz, DMSO-d₆).

Η απλή κορυφή που ανιχνεύεται σε χημική μετατόπιση 6.15 ppm και ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο, οφείλεται στο H3. Προχωρώντας, σε χημική μετατόπιση 6.78 ppm και ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια παρατηρείται μία διπλή διπλών κορυφή (dd) με J=2.4 Hz, J=9 Hz, που οφείλεται στην ortho αλληλεπίδραση του H6 με το H5 και στη meta αλληλεπίδραση με το H8. Σε χημική μετατόπιση 6.81 ppm που ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο εμφανίζεται μια διπλή κορυφή (d) με J=1.8Hz που οφείλεται στο H8 και προκύπτει από τη meta αλληλεπίδραση με το H6. Ακολούθως, σε χημική μετατόπιση 7.27 ppm που ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο αντιστοιχεί μια διπλή κορυφή (d) με J=9Hz του πρωτονίου στη θέση H5, λόγω της ortho αλληλεπίδρασης με το πρωτόνιο H6. Σε χημική μετατόπιση 7.50 έως 7.56 ppm που ολοκληρώνεται για 5 πρωτόνια συναντάται μία πολλαπλή κορυφή (2 διπλές, 3 τριπλές) των πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου (H2' έως H6').

Τέλος, σε χημική μετατόπιση 10,66 ppm και για ολοκλήρωση 1 πρωτονίου ανιχνεύεται το πρωτόνιο του υδροξυλίου στη θέση 7.

4.2 Αξιολόγηση βιοδραστικότητας Κουμαρινικών Αναλόγων-Δοκιμασία DPPH

Στην παρούσα ενότητα μελετάται η βιοδραστικότητα των κουμαρινικών αναλόγων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η αντιοξειδωτική τους δράση, ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Σκοπό αυτής της δοκιμασίας αποτελεί ο υπολογισμός της τιμής IC₅₀ (Inhibitory Concentration at 50%), η οποία χαρακτηρίζεται ως η συγκέντρωση της υπό μελέτη ένωσης, η οποία προκαλεί δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH κατά 50%. Ο υπολογισμός της πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism, με τον ακριβή υπολογισμό του μέσου του σημείου καμπής της καμπύλης ποσοστού δέσμευσης DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης της ένωσης, έπειτα από Non-linear Fitting.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το IC₅₀ του κουμαρινικού παραγώγου (a) λαμβάνει τιμές 20.1 μΜ στην μέτρηση των 30 min και 12.7 μΜ στην περίπτωση της 1 ώρας. Το φαινόμενο αυτό μας φανερώνει ότι με το πέρας της ώρας η συγκέντρωση που απαιτείται για τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας μειώνεται σημαντικά.

Με όμοια διαδικασία προσδιορίστηκε η ικανότητα δέσμευσης της ελέυθερης ρίζας και στην κουμαρινική ένωση 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (b). Σε αυτήν την περίπτωση δεν παρουσιάστηκε αξιόλογη δέσμευση, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ένωση να μην επιδεικνύει αντιοξειδωτική δράση. Ομοίως και η ένωση 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (c).

Εν κατακλείδι, η ένωση που παρουσίασε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και καθίσταται κατάλληλη για την μετέπειτα ενσωμάτωση της σε λιπιδικά νανοσωματίδια και μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης είναι η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη, ή αλλιώς ένωση (a). Ακολούθως, παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας αντιστοίχησης κουμαρινικών αναλόγων με την τιμή IC₅₀.

Κουμαρινική ένωση	Χρόνος	IC₅₀(μM)
(a) 7,8-διυδροξυ-4- φαινυλο- κουμαρίνη/DMSO	30 min	20.1 ± 0.3
	1 h	12.7 ± 0.8
(b) 5, 7-διυδροξυ-4- φαινυλο- κουμαρίνη/DMSO	30 min	NO
	1 h	NO
(c) 7-υδρόξυ-4- φαίνυλο-	30 min	NO
κουμαρίνη/DMSO	1 h	NO

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας αντιστοίχησης κουμαριικών αναλόγων με την τιμή IC₅₀, για χρονικές στιγμές 30 min και 1h.

Ακολούθως, παρατίθεται ραβδόγραμμα αναπαράστασης μείωσης ποσοστού δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH της κουμαρινικής ένωσης (a).



Διάγραμμα 8. Ραβδογράμματα ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος διαλύματος 7, 8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη/DMSO και για χρονικές στιγμές 30 min και 1h.

ΙΙ. ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

4.3 Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού, Μέγεθος, δείκτης PDI και ζ-δυναμικό

Η τεχνική DLS παρέχει πληροφορίες για την διασπορά νανοσωματιδίων σε κάποιο μέσο. Οι κύριες πληροφορίες είναι το ζ-δυναμικό, μέγεθος που κρίνει τη σταθεροποίηση των σωματιδίων στη μορφή του γαλακτώματος, το μέγεθος των σωματιδίων (υδροδυναμική διάμετρος) και τέλος τον δείκτη πολυδιασποράς PDI, μέγεθος υπεύθυνο για την ομοιογένεια μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Μελετήθηκαν ως προς τις παραπάνω ιδιότητες και τα τρία λιπιδικά νανοσυστήματα (SLNs, NLCs, Niosomes) με και χωρίς εσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a).

4.3.1 Υδατική διασπορά SLNs

Στο παρόν υποκεφάλαιο παρουσιάζονται οι μετρήσεις ζ-δυναμικού,υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη PDI της υδατικής διασποράς SLNs με και χωρίς ενσωματωμένης κουμαρινικής ένωσης (a). Ακολούθως, παρατίθενται πίνακας και ενδεικτικά διαγράμματα.

Πίνακας 6. Αριθμητικά δεδομένα μετρήσεων ζ-δυναμικού, υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη PDI υδατικής διασποράς κενών-SLNs και SLNs-(a).

Νανοσωματίδια	Ζ-Δυναμικό (mV)	Size (μέγεθος) (nm)	PDI
SLNs-(a)	-26.1 ± 1.0	265.2 ±	0.368 ± 0.05
Κενών-SLNs	-22.8 ± 4.9	219.4 ± 18.9	0.398 ± 0.06



Διάγραμμα 9. ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς SLNs-(a), με μέγιστο στα -25.7 mV.



Διάγραμμα 10. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου SLNs -(a), με μέγιστο 256.1 nm και PDI ίσο με 0.332.

Η υδατική διασπορά των SLNs, με μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 265.2 nm, παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα σε υδατικό μέσο όπως υποδεικνύει η αρκετά υψηλή κατ' απόλυτο τιμή του ζ-δυναμικού (-26 mV). Επιπλέον, η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων, με την τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να παρουσιάζει μέση τιμή PDI = 0.368, υποδεικνύει μέτρια προς καλή ομοιογένεια νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθός τους, επαρκή σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [43].



Διάγραμμα 11. ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς κενώνbl-SLNs , με μέγιστο στα -30.4 mV.



Διάγραμμα 12. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου κενών-SLNs, με μέγιστο 209.2 nm και PDI ίσο με 0.337.

Η υδατική διασπορά των SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), με μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 219.4 nm, παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα σε υδατικό μέσο όπως υποδεικνύει η μετρίως υψηλή κατ' απόλυτο τιμή του ζ-δυναμικού (-22.8 mV). Επιπλέον, η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων, με την μέση τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να ισούται με PDI = 0.398, υποδεικνύει μέτρια προς καλή ομοιογένεια νανοσωματιδίων ως προς το μέγεθός τους.

4.3.2 Υδατική διασπορά NLCs

Ακολούθως, παρατίθενται σχετικός πίνακας με δεδομένα αντίστοιχων μετρήσεων με την ενότητα 4.3.2.1 και ενδεικτικά διαγράμματα αναπαράστασης κατανομών ζδυναμικού και υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων NLCs με και χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), που παρασκευάστηκαν κατά την επικρατέστερη αναλογία 85:15, καθώς η αναλογία 70:30 επέδειξε ελαιώδη μορφή, έναντι υδατικής διασποράς, με αποτέλεσμα την απόρριψη του συγκεκριμένου πειράματος.

Πίνακας 7. Αριθμητικά δεδομένα μετρήσεων ζ-δυναμικού, υδροσυναμικής διαμέτρου και δείκτη πολυδιασποράς της υδατικής διασποράς κενών-NLCs και NLCs-(a).

Νανοσωματίδια	Z-	Size	PDI (δείκτης
	Δυναμικό	(μέγεθος)	πολυδιασποράς)
	(mV)	(nm)	
NLCs-(a)	-29.5 ±	260 ±	0.436 ± 0.036
	1.0	10.8	
κενών-NLCs	-28.6 ±	277.2 ±	0.459 ± 0.081
	0.4	9.6	

Temperature (°C): Count Rate (kcps):	25.0 Zeta Runs:					12 2.00		
Cell Description:	Clear disposable z	reta cell		Attenuator:				
			Mean (mV)	Area (%)	St De	v (mV)		
Zeta Potential (mV):	-30.4	Peak 1:	-30.4	100.0	4.85			
Zeta Deviation (mV):	4.85	Peak 2:	0.00	0.0	0.00			
Conductivity (mS/cm):	0.00442	Peak 3:	0.00	0.0	0.00			
Result quality : Good Zeta Potential Distribution								
300000 T · · · ·								
_문 200000 - · · · ·								
80000 명 100000								
_								
0+	· ·	100		 	100		200	

Διάγραμμα 13. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς NLCs- (a), με μέγιστο στα -30.4 mV



Διάγραμμα 14. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου NLCs -(a), με μέγιστο 248.1 nm και PDI ίσο με 0.395.

Η υδατική διασπορά των NLCs παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα στο υδατικό μέσο της διασποράς με την τιμή του ζ-δυναμικού (-29.5 mV). Επιπλέον, η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων παρουσιάζει μία ελαφρώς εκτενή κατανομή, με την τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να παρουσιάζει μέση τιμή PDI = 0.436. Τέλος, η υδροδυναμική διάμετρος NLCs παρουσιάζει μέση τιμή ίση με 260 nm.

Temperature (°C):	25.0				Zeta Runs:	12	
Count Rate (kcps):	50.6 Measurement Position (mm):					2.00	
Cell Description:	Clear disposable zeta o	ell		1	Attenuator:	8	
		Me	ean (mV)	Area (%)	St De	v (mV)	
Zeta Potential (mV):	-28.9 Pe	ak 1: -20	8.9	100.0	4.83		
Zeta Deviation (mV):	4.83 Pe	a k 2: 0.0	00	0.0	0.00		
Conductivity (mS/cm):	0.00875 Pe	ak 3: 0.0	00	0.0	0.00		
Result quality :	Good						
		Zeta	Potential Disti	ribution			
250000 T · · · ·	·····						•••:
†				-			
200000 T			1				
불 150000 ·····			····{·}·				
۲ ه			11				
₽ 100000 T							
50000 - · · · ·	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				••••••		·}
			$\int \langle \cdot \rangle$				
U+	-100			 D	100	1	200
Apparent Zeta Potential (mV)							

Διάγραμμα 15. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς κενών-NLCs, με μέγιστο στα -28.9 mV



Διάγραμμα 16. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροσυναμικής διαμέτρου κενών-NLCs, με μέγιστο 281.3 nm και PDI ίσο με 0.498.

Η υδατική διασπορά των NLCs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα (-28.6 mV). Επιπλέον, η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων παρουσιάζει μία ελαφρώς εκτενή κατανομή, με την μέση τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να ισούται με PDI = 0.549. Τέλος, η τιμή υδροδυναμικής

διαμέτρου NLCs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζει μέση τιμή ίση με 277.2 nm.

4.3.3 Υδατική διασπορά Νιοσωμάτων

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται αντίστοιχα δεδομένα για την υδατική διασπορά Νιοσωμάτων. Από τις συνθετικές αναλογίες που δοκιμάστηκαν (βλ. Πίνακα 3), η συνθετική αναλογία που επέδειξε Νιοσώματα με επιθυμητές ιδιότητες, τόσο ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, δείκτη PDI, ζ-δυναμικού, αλλά και βέλτιστη απόδοση εγκλεισμού ήταν η συνθετική αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/Κουμαρίνη 100:200:20 (w/w/w) σε όγκο 10 mL υδατική φάσης.

Οι υπόλοιπες αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής, α) Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:100:10 (w/w/w) σε υδατική φάση ποσότητας των 45 mL, β) Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:10 (w/w/w) σε υδατική φάση 45 mL, γ) Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε όγκο 45 mL H2O και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Οι συγκεκριμένες αναλογίες επέδειξαν νανοσωματίδια με ανώμαλο προφίλ κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου, με μεγάλο δείκτη PDI και σαφή ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών νανοσωματιδίων. Στο παράρτημα παρατίθενται διαγράμματα DLS προς προσδιορισμό αντίστοιχων ιδιοτήτων μη αποδεκτής κατανομής [Π1-3].

Νιοσώματα	Μέγεθος (nm)	PDI Ζ- Δυναμικι (mV)		Απόδοση διεργασί ας	Απόδοση εγκλεισμού
α)	310.5±15.2	584.2± 0.08	-25.7±1.1	47%	35%
В)	238.2±13.8	0.507± 0.06	-28.1±0.8	33%	33%
r)	430.9 ± 4.6	340.9 ± 1.1	-26.5 ± 0.05	46%	77%

Πίνακας 8. Συγκεντρωτικός πίνακας αριθμητικών δεδομένων μετρήσεων ζ-δυναμικού, υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη πολυδιασποράς Νιοσωμάτων με και χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), που επέδειξαν ανώμαλο προφίλ κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου.

Ακολούθως, παρατίθεται σχετικός πίνακας αριθμητικών δεδομένων μετρήσεων ζδυναμικού, υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη PDI που παρασκευάστηκαν με αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/Κουμαρίνη 100:200:20 (w/w/w) σε όγκο 10 mL υδατικής φάσης. Ακολουθούν ενδεικτικά διαγράμματα αναπαράστασης κατανομών ζ-δυναμικού και υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων Νιοσωμάτων με επιθυμητό προφίλ κατανομής μεγέθους.

Πίνακας 9. Αριθμητικά δεδομένα μετρήσεων ζ-δυναμικού, υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη πολυδιασποράς της υδατικής διασποράς κενών-Νιοσωμάτων και Νιοσωμάτων-(a).

Νανοσωματίδια	Ζ- Δυναμικό (mV)	Size (μέγεθος) (nm)	ΡDI (δείκτης πολυδιασποράς)	
Νιοσώματα-(a)	-28.7 ±	232.8 ±	0.333 ± 0.046	
	1.6	23		
Κενών-	-27.1 ±	241.9 ±	0.480 ± 0.05	
Νιοσώματα	0.9	17.1		

Temperature (°C):	25.0			Zet	a Runs:	12		
Count Rate (kcps):	100.7 Measurement Position (mm): 2.00					2.00		
Cell Description:	Clear disposable z	eta cell		Atte	enuator:	9		
			Mean (mV)	Area (%)	St Dev	v (mV)		
Zeta Potential (mV):	-30.4	Peak 1:	-30.4	100.0	4.85			
Zeta Deviation (mV):	4.85	Peak 2:	0.00	0.0	0.00			
Conductivity (mS/cm):	0.00442	Peak 3:	0.00	0.0	0.00			
Result quality :	Good							
Zeta Potential Distribution								
300000 T · · · ·			·····;····;		•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••			
+			A					
월 200000 -····								
ਸ਼ੁੱ ⊢ 100000 -····								
-								
U+	-1	00			100	200		

Διάγραμμα 17. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς Νιοσωμάτων -(a), με μέγιστο στα -30.4 mV



Διάγραμμα 18. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου Νιοσωμάτων-(a), με μέγιστο 206.4 nm και PDI ίσο με 0.280.

Η υδατική διασπορά των Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα (-28.7 mV). Επιπλέον, η κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου των Νιοσωμάτων παρουσιάζει μία αρκετά στενή κατανομή, με μέση υδροδυναμική ακτίνα ίση με 232.8 nm και με μέση τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να ισούται με PDI = 0.333.

Temperature (°C):	25.0			Zeta I	Runs:	12		
Count Rate (kcps):	100.5		Measur	ement Position (mm):	2.00		
Cell Description:	Clear disposable zet	a cell		Attenu	ator:	7		
			Mean (mV)	Area (%)	St De	v (mV)		
Zeta Potential (mV):	-28.0	Peak 1:	-28.0	100.0	4.18			
Zeta Deviation (mV):	4.18 I	Peak 2:	0.00	0.0	0.00			
Conductivity (mS/cm):	0.0117	Peak 3:	0.00	0.0	0.00			
Result quality :	Result quality : Good							
		z	eta Potential Distributio					
		-						
200000 T								
150000								
월 -			- <u> </u>					
<u></u> 100000								
- 10tal								
50000 - · · · ·			·····/··{···i···		••••			
+					-			
0+	-100)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•	i 100	i 200		
			Apparent Zeta Poter	ntial (mV)				

Διάγραμμα 19. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς κενών-Νιοσωμάτων, με μέγιστο στα -28 mV



Διάγραμμα 20. Ενδεικτικό διάγραμμα αναπαράστασης κατανομής υδροδυναμικής διαμέτρου κενών-Νιοσωμάτων, με μέγιστο 259.2 nm και PDI ίσο με 0.528.

Η υδατική διασπορά των Νιοσωμάτων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα (-27.1 mV). Επιπλέον, η κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου των Νιοσωμάτων παρουσιάζει μία σχετικά ευρεία

κατανομή με μέση υδροδυναμική διάμετρο ίση με 241.9 nm και με μέση τιμή του δείκτη πολυδιασποράς να ισούται με PDI = 0.480.

Ακολούθως, παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας αριθμητικών μετρήσεων ζδυναμικού, υδροδυναμικής διαμέτρου και δείκτη PDI κατ'αντιστοιχία με την απόδοση διεργασία και εγκλεισμού κουμαρινικής ένωσης στα διαφορετικά είδη λιπιδικών νανοσωματιδίων.

Πίνακας 10. Συγκεντρωτικός πίνακας αντιστοίχισης των συνθετικών διεργασιών των τριών λιπιδικών συστημάτων SLNs, NLCs και Νιοσωμάτων με τις ιδιότητες ζ-δυναμικού, υδροδυναμικής ακτίνας και δείκτη πολυδιασποράς PDI. Κάθε λιπιδικό σύστημα αντιστοιχίζονται με την απόδοση διεργασίας και εγκλεισμού κουμαρινικής ένωσης (a).

Σύστημα λιπιδικού φορέα	Αναλογία σύνθεσης ΤΜ:PC:Tween 80:Κουμαρινική ένωση (a)	Μέγεθος (nm)	PDI	Ζ- Δυναμικό (mV)	Απόδοση διεργασί ας	Απόδοση εγκλεισμού
Κενά-SLNs	200 (TM):50 (PC):100(TWEEN 80)	219.4 ± 18.9	0.398 ± 0.06	-22.8 ± 4.9	39%	-
SLNs-(a)	200 (TM):50 (PC):100(TWEEN 80):20(a)	265±12.6	0.368±0 .05	-26.1±1	49%	79%
κενά-NLCs	170 (TM):37(A):50 (PC):100(TWEEN 80)	277.2 ± 9.6	0.459 ± 0.081	-28.6 ± 0.4	63%	-
NLCs-(a)	170 (TM):37(A):50 (PC):100(TWEEN 80):20(a)	260±10.8	0.436±0 .036	-29.1±1	52%	84%
κενά- Νιοσώματα	100 (CHOLESTEROL):200(SPA N 60)	241.9 ± 17.1	0.480 ± 0.05	-27.1 ± 0.9	48%	-
Νιοσώματα- (a)	100 (CHOLESTEROL):200(SPA N 60):20(a)	232.8 ± 23	0.333 ± 0.046	-28.7 ± 1.6	43%	30%

4.4 Μελέτη θερμικών ιδιοτήτων με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα θερμικής μελέτης μέσω της τεχνικής TGA. Αναλυτικότερα, παρουσιάζεται η μελέτη της κουμαρινικής ένωσης (a) και τριμυριστίνης-TM, καθώς και των λιπιδικών νανοσωματιδίων (SLNs, NLCs, Niosomes) με και χωρίς ενσωματωμένη την κουμαρινική ένωση.

4.4.1 Θερμική μελέτη κουμαρινικής ένωσης (a)

Ακολούθως, παρατίθεται το θερμογράφημα TGA για την κουμαρινική ένωση (a).



Εικόνα 39. Γράφημα TGA κουμαρινικής ένωσης (a)

Στο παραπάνω γράφημα TGA παρατηρούνται δύο διαφορετικά σημεία απώλειας μάζας. Το πρώτο σημείο παρουσιάζεται σε θερμοκρασία 84° C με απώλεια μάζας 0.27 mg (-5.3%) και φανερώνει την απομάκρυνση υγρασίας από τη στερεά κατάσταση της κουμαρινικής ένωσης, που πιθανώς προήλθε από την αποθήκευσή της.

Το δεύτερο σημείο, όπου παρουσιάζεται και η μεγαλύτερη απώλεια μάζας ίση με 4.64 mg (-89.9%), εντοπίζεται στους 320°C και φανερώνει τη θερμική αποδιάταξη της ένωσης. Το στερεό υπόλειμμα που παραμένει ισούται με 0.24 mg (4.6%).

4.4.2 Θερμική μελέτη λιπιδικών νανοσωματιδίων

Αρχικώς, παρουσιάζεται γράφημα TGA για την καθαρή τριμυριστίνη-TM. Ακολούθως, παρατίθενται γραφήματα TGA λιπιδικών νανοσωματιδίων χωρίς και με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a).



Εικόνα 40. Διάγραμμα TGA τριμυριστίνης-TM

Στην παραπάνω καμπύλη παρατηρείται ένα σημείο απώλεια μάζας, το οποίο αποδίδεται στην θερμική αποδιάταξη της τριμυριστίνης-TM. Παρουσιάζεται μεγάλου ποσού απώλειας μάζας, ίση με 5.32 mg (-98.2%) και εντοπίζεται στους 390°C, αφήνοντας στερεό υπόλειμμα 0.18 mg (3.28%). Το στερεό λιπιδίο παρουσιάζει σημαντική θερμική σταθερότητα, καθιστώντας το κατάλληλο για διεργασίες και εισαγωγή στο εσωτερικό ζώντος οργανισμού, ακολουθώντας συνθετική πορεία που απαιτεί θερμοκρασία που δεν ξεπερνά τους 70-80° C κατά τη διαδικασία τήξης του.

<u>Λιπιδικά νανοσωματίδια χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)</u>



Εικόνα 41. Διάγραμματα TGA για το σύστημα a)SLNs, b)NLCs, c) Νιοσωμάτων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Το παραπάνω γράφημα παρουσιάζει τις τρεις διαφορετικές καμπύλες λιπιδικών νανοσωματιδίων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a). Και στις τρεις καμπύλες παρατηρείται ένα σημείο απώλειας μάζας. Αναλυτικότερα, υποδεικνύει το φαινόμενο θερμικής αποδιάταξης του υλικού.

Στην περίπτωση των SLNs (βλ. Εικόνα 41a) παρατηρείται απώλεια μάζας 4.37 mg (-91.3%) σε θερμοκρασία 361°C. Το στερεό υπόλειμμα που παραμένει ισούται με 0.4 mg (8.3%). Ακολούθως, στην περίπτωση των NLCs (βλ. Εικόνα 41b), παρατηρείται απώλεια μάζας 5.92 mg (-90.9%) σε θερμοκρασία 372°C, αφήνοντας στερεό υπόλειμμα ίσο με 0.91 mg (5.9%). Η απώλεια μάζας ενδεχομένως να οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην TM, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό της σύστασης. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις παρατηρείται ότι υπάρχει αρκετά μεγάλη θερμοκρασιακή σταθερότητα του συστήματος, με αυτή των NLCs (372°C) να παρουσιάζει βέλτιστη τιμή, έναντι των SLNs (361°C). Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί ότι συγκριτικά με την θερμοκρασία θερμικής αποδιάταξης της τριμυριστίνης, τα λιπιδικά νανοσωματίδια που συντίθενται με αυτή παρουσιάζουν φανερώς μειωμένη θερμική σταθερότητα, φαινόμενο που ενδεχομένως οφείλεται στην διαφορετική κρυσταλλικότητα των λιπιδικών νανοσωματιδίων.

Στην περίπτωση των Νιοσωμάτων (βλ. Εικόνα 41c), παρατηρείται απώλεια μάζας 5.32 mg (-94.6%) σε θερμοκρασία 305°C, αφήνοντας στερεό υπόλειμμα ίσο με 0.35 mg (6.3%). Η απώλεια μάζας ενδεχομένως να οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην χοληστερόλη, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό σύστασης [48]. Τέλος, παρατηρείται επαρκής θερμοκρασιακή σταθερότητα του συστήματος Νιοσωμάτων, αρκετά μειωμένη συγκριτικά με τα συστήματα SLNs (361°C) και NLCs (372°C) [49].

<u>Θερμική μελέτη λιπιδικών νανοσωματιδίων με ενσωματωμένη</u> κουμαρινική ένωση (a)



Εικόνα 42. Διάγραμματα TGA για το σύστημα a)SLNs, b)NLCs, c) Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Το παραπάνω γράφημα παρουσιάζει τις τρεις διαφορετικές καμπύλες λιπιδικών νανοσωματιδίων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a). Και στις 3 καμπύλες παρατηρείται ένα σημείο απώλειας μάζας του συστήματος.

Στην περίπτωση των SLNs (βλ. Εικόνα 42a) παρατηρείται απώλεια μάζας 5.57 mg (-93.1%) σε θερμοκρασία 366° C. Το στερεό υπόλειμμα ισούται με 0.37 mg (6.3%). Ακολούθως, στην περίπτωση των NLCs (βλ. Εικόνα 42b), παρατηρείται απώλεια μάζας 15.75 mg (-93.5%) σε θερμοκρασία 375° C, αφήνοντας στερεό υπόλειμμα 0.7 mg (4.2%). Η απώλεια μάζας ενδεχομένως να οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην TM, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό της σύστασης. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις παρατηρείται ότι υπάρχει αρκετά μεγάλη θερμοκρασιακή σταθερότητα του συστήματος, με αυτή των NLCs να παρουσιάζει βέλτιστη τιμή (375° C), έναντι των SLNs (366°C) [49, 50].Αξίζει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία θερμικής αποδιάταξης τόσο των SLNs, όσο και των NLCs, παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές με τα αντίστοιχα νανοσωματίδια χωρίς κουμαρινική ένωση, πράγμα που υποδηλώνει ότι ο εγκλεισμός αυτής δεν επηρεάζει τις θερμικές ιδιότητες των λιπιδικών νανοσωματιδίων-φορέων.

Στην περίπτωση των Νιοσωμάτων (βλ. Εικόνα 42c), παρατηρείται απώλεια μάζας 3.99 mg (-93.4%) σε θερμοκρασία 316° C. Το στερεό υπόλειμμα που παραμένει ισούται με 0.39 mg (7.1%). Η απώλεια μάζας ενδεχομένως να οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην χοληστερόλη, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό σύστασης. Τέλος, παρατηρείται επαρκής θερμοκρασιακή σταθερότητα του συστήματος Νιοσωμάτων, αρκετά μειωμένη ωστόσο συγκριτικά με τα συστήματα SLNs (366°C) και NLCs (375° C).

Καταλήγοντας, τα συστήματα των SLNs (366°C) και NLCs (375°C) με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα, έναντι των Νιοσωμάτων (316°C). Επιπλέον, η ύπαρξη ενός σημείου απώλειας μάζας, σε θερμμοκρασίες θερμικής αποδιάταξης ανώτερες των 320°C, η οποία χαρακτηρίζει την αποδιάταξη της κουμαρινικής ένωσης (a), φανωρώνει την προστασία της κουμαρινικής ένωσης με την ενσωμάτωσή της στους λιπιδικούς νανοφοερείς SLNs και NLCs.

4.5 Δομικός χαρακτηρισμός λιπιδικών συστημάτων με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας FTIR

Στην παρούσα ενότητα παρατίθενται φάσματα Υπερύθρου FTIR με σκοπό τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων. Τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι η κουμαρινική ένωση (a) και τα λιπιδικά νανοσυστήματα που συντέθηκαν, SLNs,NLCs και Νιοσώματα. Για κάθε λιπιδικό σύστημα λήφθηκε φάσμα FTIR με και χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a). Το εύρος κυματαρίθμων που μελετήθηκε ήταν 400-4000 cm⁻¹. Κουμαρινική ένωση (a)



Διάγραμμα 21. Φάσμα FTIR κουμαρινικής ένωσης (a)

Αρχικά παρατηρείται η κορυφή στα 3410.49 cm⁻¹, που αποτελεί δόνηση τάσης των ομάδων -OH της κουμαρινικής ένωσης (a), που αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή των υδροξυλίων των κουμαρινικών ενώσεων. Ακολούθως, στα 1684.16 cm⁻¹ αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης της χαρακτηριστικής ομάδας του πυρονικού δακτυλίου, καθώς η κορυφή στα 1454.06 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση κάμψης αλειφατικών C-H. Τέλος, η κορυφή στους 1356.68 cm⁻¹αποδίδεται σε δόνηση κάμψης της ομάδας OH.

<u>Λιπιδικά νανοσωματίδια χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)</u>

SLNs



Διάγραμμα 22. Φάσμα FTIR συστήματος SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος των SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) εμφανίζονται στα 3436.53 cm⁻¹, που αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης του Tween 80, στα 2915.84 cm⁻¹ και 2849.31 cm⁻¹, που αποδίδονται στην C-Η δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της TM, της PC και του Tween 80, στα 1736.58 cm⁻¹, που αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης της TM και του Tween 80, και στα 1112.73 cm⁻¹ που αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της TM και του Tween 80, ενώ η κορυφή στα 1472.38 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-H δόνηση κάμψης και αυτή στα 1392.35 cm⁻¹ στην Ο-H δόνηση κάμψης.

NLCs



Διάγραμμα 23. Φάσμα FTIR συστήματος NLCs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Αντιστοίχως, κορυφές του φάσματος των NLCs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζουν ομοιότητες με τις αντίστοιχες του Διαγράμματος 22. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 3415.31 cm⁻¹ αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης του Tween 80. Ακολούθως, οι κορυφές στα 2915.84 cm⁻¹ και 2858.27 cm⁻¹, που αποδίδονται στην C-Η δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της TM, της PC και του Tween 80. Στα 1736.58 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-Ο δόνηση τάσης της TM και του Tween 80, ενώ η κορυφή στα 1471.42 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-Η δόνηση κάμψης και αυτή στα 1471.42 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-Η δόνηση κάμψης.

Νιοσώματα



Διάγραμμα 24. Φάσμα FTIR συστήματος Νιοσωμάτων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Αντιστοίχως, κορυφές του φάσματος των Νιοσωμάτων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) παρουσιάζουν ομοιότητες με τις αντίστοιχες του Διαγράμματος 22. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 3413.39 cm⁻¹ αποδίδεται στην Ο-Η δόνηση τάσης του Span 60. Ακολούθως, οι κορυφές στα 2918.73 cm⁻¹ και 2849.31 cm⁻¹, που αποδίδονται στην C-H δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της Χοληστερόλης και του Span 60. Στα 1738.51 cm⁻¹ αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, και στα 1177.33 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, και στα 1177.35 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, και στα 1177.33 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, και στα 1177.33 cm⁻¹ αποδίδεται στην C-O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, και στα 1467.56 cm⁻¹ στην O-H δόνηση κάμψης.

<u>Λιπιδικά συστήματα με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)</u>

SLNs



Διάγραμμα 25. Φάσμα FTIR συστήματος SLNs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

NLCs



Διάγραμμα 26. Φάσμα FTIR συστήματος NLCs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Νιοσώματα



Διάγραμμα 27. Φάσμα FTIR συστήματος Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Οι κορυφές και στα τρία φάσματα παρουσιάζουν ομοιότητες, όπως αναλύθηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση του συστήματος Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη ένωση παρατηρείται μετατόπιση της βασικής κορυφής της ομάδας ΟΗ σε μεγαλύτερους κυματάριθμους, παρουσιάζοντας κορυφή στα 3486.67 cm⁻¹. Η μετατόπιση αυτή αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης της ένωσης με τη λιπιδική μήτρα. Στα συστήματα SLNs και NLCs που παρατηρείται μικρότερη μετατόπιση, πιθανώς να αιτιολογείται από την υψηλή αναλογία της TM έναντι της κουμαρινικής ένωσης (a).

4.6 Μορφολογικός χαρακτηρισμός λιπιδικών νανοσωματιδίων με την τεχνική SEM

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SEM. Οι απεικονίσεις που λήφθηκαν αφορούν τα λιπιδικά νανοσυστήμα SLNs με και χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a). Η λήψη απεικονίσεων μέσω SEM για τα υπόλοιπα λιπιδικά συστήματα (NLCs, Νιοσώματα) κατέστη αδύνατη, λόγω αύξησης τοπικής θερμοκρασίας και τήξης των λιπιδίων. Επομένως, ακολούθως παρατίθενται απεικονίσεις των SLNs, σε διαφορετικές μεγεθύνσεις, X130, X500, X1000, 2000 και X2400.



Εικόνα 43. Απεικονίσεις SEM δείγματος SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), μεγεθύνσεων αντιστοίχως X130 (43a), X500 (43b), X500(43c) και X1000(43d).

Το δείγμα SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) χαρακτηρίζεται από ασύμμετρο και ανομοιογενές σχήμα και μορφολογία νανοσωματιδίων (βλ. Εικόνα 43 a). Μάλιστα, παρατηρείται η ύπαρξη κοιλοτήτων κυκλικών διατομών (βλ. Εικόνα 43 b,c) καθώς και επιφανειών, οι οποίες εμφανίζουν ασυνέχειες και προεξοχές (βλ. Εικόνα 43 c,d).



С

d

Εικόνα 44. Απεικονίσεις SEM δείγματος SLNs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), μεγεθύνσεων αντιστοίχως X1000 (44a), X500 (44b), X2000(44c) και X2400(44d).

Τα SLNs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) χαρακτηρίζονται από μεγάλη ομοιογένεια στην μορφολογία τους. Παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ομοιογενούς και δομημένου δικτύου με συμπαγή δομή (βλ. Εικόνα 44 a,b), ενώ εντός του δικτύου αυτού παρατηρείται η ύπαρξη μικρότερων, επίσης συμπαγών, σφαιρικών δομών (βλ. Εικόνα 44 c,d) που αποδίδονται πιθανώς στα νανοσωματίδια που έχουν σχηματιστεί.

Μεγαλύτερες μεγεθύνσεις απορρίφθηκαν, λόγω αύξησης τοπικής θερμοκρασίας δείγματος από την πηγή ηλεκτρονίων (electron gun), έχοντας ως αποτέλεσμα την τήξη των νανοσωματιδίων, οδηγώντας έτσι σε αλλοίωση της μορφολογίας και της δομής τους [42].

4.7 Μελέτη απελευθέρωσης κουμαρινικής ένωσης (a)

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μελέτης του φαινομένου απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ένωσης από τα συστήματα SLNs, NLCs και Νιοσωμάτων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της απελευθέρωσης ποσότητας της κουμαρινικής ένωσης από το εσωτερικό των νανοσωματιδίων στο υδατικό περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος (ΚΗΡΟ₄ - KH₂PO₄) συναρτήσει του χρόνου, σε θερμοκρασία 36.6 °C και pH 7.4.

Σημαντικό ρόλο στην λειτουργία αυτού του συστήματος επιτελεί η παρουσία διαπερατής μεμβράνης κυτταρίνης, με διάμετρο πόρων περίπου 24 Å επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ελεύθερη εισροή - εκροή χημικών οντοτήτων της τάξης των χημικών ενώσεων, αποκλείοντας την διαρροή υπερμοριακών χημικών οντοτήτων μεγαλύτερης τάξης μεγέθους, τα οποία στην παρούσα πειραματική διάταξη είναι τα λιπιδικά νανοσωματίδια. Καθίσταται σημαντικό να διευκρινιστεί ότι τον παρόν σύστημα μελέτης παρομοιάζει τις τις φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH (T = 36.6° C, pH = 7.4) στο ανθρώπινο σώμα.

4.7.1 Μελέτη απελευθέρωσης κουμαρινικής ένωσης (a) σε σύστημα SLNs-Κινητικό μοντέλο

Αρχικά μελετήθηκε η υδατική διασπορά των SLNs. Στην ειδική μεμβράνη έγινε εισαγωγή υδατικής διασποράς, η οποία μεμβράνη εν συνεχεία εμβαπτίστηκε σε 125 mL ρυθμιστικού διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση και τη θερμοκρασία να ανέρχεται σε 36.6° C.

Ακολούθως, παρατίθεται διάγραμμα αθροιστικής απελευθέρωσης συναρτήσει του χρόνου, παρουσιάζοντας το προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης (a) σε σύστημα SLNs.



Διάγραμμα 28. Διάγραμμα αναπαράστασης ποσοστιαίας αθροιστικής απελευθέρωσης της κουμαρίνης (a) από το σύστημα SLNs συναρτήσει του χρόνου (h).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα, καθώς και το διάγραμμα αρχικά παρατηρείται ομαλή απελευθέρωση της βιοδραστικής ένωσης σε χρονικό διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, ενώ η απελευθέρωση αυξάνεται με σταθερό ρυθμό έως τις 6 ώρες, φτάνοντας ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 84% γεγονός που υποδεικνύει φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης (burst effect) τις πρώτες 6 ώρες.

Με το πέρας των 6 ωρών παρουσιάζεται πλατώ σταθεροποίησης έως τις 24 ώρες. Το φαινόμενο αυτό αποδεικνύει τη αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος και διασποράς στο εσωτερικό της μεμβράνης, καθώς και σταθεροποίηση του ποσοστού απελευθέρωσης, με μέγιστο ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 86%.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα απελευθέρωσης της ένωσης (a) έγινε μελέτη κινητικής μοντελοποίησης της απελευθέρωσης, με προσαρμογή των δεδομένων στα κινητικά μοντέλα μηδενικής, πρώτης τάξης, "Hiquchi" και "Korsmeyer-Peppas". Ακολούθως παρατίθεται η τιμή γραμμικής προσαρμογής R² των αριθμητικών δεδομένων σε κάθε κινητικό μοντέλο [33].

Πίνακας 11. Συσχετισμός κινητικών μοντέλων μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, "Higuchi" και "Korsmeyer-Peppas" με την αντίστοιχη γραμμική προσαρμογή των αριθμητικών δεδομένων για το λιπιδικό σύστημα SLNs.

Μοντέλο	Μηδενικής Τάξης	Πρώτης Τάξης	"Higuchi"	"Korsmeyer- Peppas"
R ²	0.5311	0.3824	0.8175	0.9091

Η μελέτη μοντελοποίησης της κινητικής απελευθέρωσης υπέδειξε το κινητικό μοντέλο "Korsmeyer-Peppas" (R² 0.9091), το οποίο ωστόσο 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" (R² 0.7472). Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα "Higuchi" και "Korsmeyer-Peppas", καθώς και οι αντίστοιχες εξισώσεις που προέκυψαν.





Η εξίσωση της κινητικής απελευθέρωσης σύμφωνα με το κινητικό μοντέλο "Higuchi" είναι η εξής:

Y=17.151x+0.8175 (4)

Ωστόσο, η τιμή του εκθέτη διάχυσης n, που αποτελεί τον εκθέτη της εξίσωσης "Korsmeyer-Peppas" υποδεικνύει το μηχανισμό απελευθέρωσης. Επομένως, καθίσταται απαραίτητη η αναπαράσταση κινητικής μοντελοποίησης σύμφωνα με το μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".



Διάγραμμα 30. Διάγραμμα αναπαράστασης λογαρίθμου αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος SLNs συναρτήσει του λογαρίθμου του χρόνου (h). Η αναπαράσταση αναγνωρίζεται και ως μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".

Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου "Korsmeyer-Peppas" είναι:

Επομένως, η τιμή του εκθέτη διάχυσης, 0.6862, (>0.5 και <1) υποδεικνύει την ανώμαλη – μη Fickian διάχυση της κουμαρινικής ένωσης ως μηχανισμό απελευθέρωσης.

4.7.2 Μελέτη απελευθέρωσης ένωσης (a) σε σύστημα NLCs-Κινητικό μοντέλο

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται αντιστοίχως το προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης (a) σε σύστημα NLCs.


Διάγραμμα 31. Διάγραμμα αναπαράστασης ποσοστιαίας αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος NLCs συναρτήσει του χρόνου (h).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα και το αντίστοιχο διάγραμμα αρχικά παρατηρείται ομαλή απελευθέρωση της βιοδραστικής ένωσης σε χρονικό διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, ενώ η απελευθέρωση αυξάνεται με σταθερό ρυθμό έως τις 5 ώρες, φτάνοντας ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 60%, γεγονός που υποδεικνύει φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης (burst effect) τις πρώτες 5 ώρες.

Με το πέρας των 5 ωρών παρατηρείται ελάχιστη αύξηση αθροιστικής απελευθέρωσης, με τάση σταθεροποίησης έως τις 24 ώρες. Το φαινόμενο αυτό αποδεικνύει την προσεγγιστική αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος και διασποράς στο εσωτερικό της μεμβράνης, καθώς και τη σταθεροποίηση του ποσοστού απελευθέρωσης, με μέγιστο ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 74%.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα απελευθέρωσης της ένωσης (a) έγινε μελέτη κινητικής μοντελοποίησης της απελευθέρωσης, με προσαρμογή των δεδομένων στα κινητικά μοντέλα μηδενικής, πρώτης τάξης, "Hiquchi" και "Korsmeyer-Peppas". Ακολούθως παρατίθεται η τιμή γραμμικής προσαρμογής των αριθμητικών δεδομένων σε κάθε κινητικό μοντέλο.

Πίνακας 12. Συσχετισμός κινητικών μοντέλων μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, "Higuchi" και "Korsmeyer-Peppas" με την αντίστοιχη γραμμική προσαρμογή των αριθμητικών δεδομένων για το λιπιδικό σύστημα NLCs.

Μοντέλο	Μηδενικής Τάξης	Πρώτης Τάξης	"Higuchi"	"Korsmeyer- Peppas"
R ²	0.6281	0.3758	0.8175	0.7378

Η μελέτη μοντελοποίησης της κινητικής απελευθέρωσης υπέδειξε τα κινητικό μοντέλο "Higuchi" (R² 0.8175). Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα "Higuchi" και "Korsmeyer-Peppas", καθώς και οι αντίστοιχες εξισώσεις που προέκυψαν.



Διάγραμμα 32. Διάγραμμα αναπαράστασης λογαρίθμου αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος NLCs συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου (h). Η αναπαράσταση αναγνωρίζεται και ως μοντέλο "Higuchi".

Η εξίσωση ευθείας της κινητικής μοντελοποίησης "Higuchi" είναι η εξής:

Y=17.151x+0.8376 (6)

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης n, που αποτελεί τον εκθέτη της εξίσωσης "Korsmeyer-Peppas" υποδεικνύει το μηχανισμό απελευθέρωσης. Επομένως, καθίσταται απαραίτητη η αναπαράσταση κινητικής μοντελοποίησης σύμφωνα με το μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".



Διάγραμμα 33. Διάγραμμα αναπαράστασης λογαρίθμου αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος NLCs συναρτήσει του λογαρίθμου του χρόνου (h). Η αναπαράσταση αναγνωρίζεται και ως μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".

Η εξίσωση ευθείας της κινητικής μοντελοποίησης "Korsmeyer-Peppas" είναι η εξής:

Y=0.4791x+0.6419 (7)

Επομένως, η τιμή του εκθέτη διάχυσης, 0.4791, (>0.5 και <1) υποδεικνύει την ανώμαλη – μη Fickian διάχυση της κουμαρινικής ένωσης ως μηχανισμό απελευθέρωσης.

4.7.3 Απελευθέρωση ένωσης (a) σε σύστημα Νιοσωμάτων-Κινητικό μοντέλο

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται αντιστοίχως το προφίλ απελευθέρωσης της ένωσης (a) σε σύστημα Νιοσωμάτων συναρτήσει του χρόνου (h).



Διάγραμμα 34. Διάγραμμα αναπαράστασης ποσοστιαίας αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος Νιοσωμάτωνσυναρτήσει του χρόνου (h).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα, καθώς και το διάγραμμα αρχικά παρατηρείται ομαλή απελευθέρωση της βιοδραστικής ένωσης σε χρονικό διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, ενώ η απελευθέρωση αυξάνεται με σταθερό ρυθμό έως τις 5 ώρες, φτάνοντας ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 59%, γεγονός που υποδεικνύει φαινόμενο απότομης απελευθέρωσης (burst effect) των πρώτων 5 ωρών.

Με το πέρας των 5 ωρών παρατηρείται παρουσιάζεται ελάχιστη αύξηση αθροιστικής απελευθέρωσης, με τάση σταθεροποίησης έως τις 24 ώρες. Το φαινόμενο αυτό αποδεικνύει την τάση προς αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος και διασποράς στο εσωτερικό της μεμβράνης, που εκδηλώνεται με σταθεροποίηση του ποσοστού απελευθέρωσης, με μέγιστο ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης 76%.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αριθμητικά δεδομένα απελευθέρωσης της ένωσης (a) έγινε μελέτη κινητικής μοντελοποίησης της απελευθέρωσης, με προσαρμογή των δεδομένων στα κινητικά μοντέλα μηδενικής, πρώτης τάξης, "Hiquchi" και "Korsmeyer-Peppas". Ακολούθως παρατίθεται η τιμή γραμμικής προσαρμογής των αριθμητικών δεδομένων σε κάθε κινητικό μοντέλο.

Πίνακας 13. Συσχετισμός κινητικών μοντέλων μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, "Higuchi" και "Korsmeyer-Peppas" με την αντίστοιχη γραμμική προσαρμογή των αριθμητικών δεδομένων για το λιπιδικό σύστημα των Νιοσωμάτων.

Μοντέλο	Μηδενικής Τάξης	Πρώτης Τάξης	"Higuchi"	"Korsmeyer- Peppas"
R ²	0.6277	0.255	0.8243	0.901

Η προσπάθεια μοντελοποίησης της κινητικής απελευθέρωσης επέδειξε το κινητικό μοντέλο "Higuchi". Ακολούθως, παρατίθεται η διαγραμματική αναπαράσταση αυτού.



Διάγραμμα 35. Διάγραμμα αναπαράστασης λογαρίθμου αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος Νιοσωμάτων συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου (h). Η αναπαράσταση αναγνωρίζεται και ως μοντέλο "Higuchi".

Η εξίσωση ευθείας της κινητικής μοντελοποίησης "Higuchi" είναι η εξής:

Y=17.897x+0.3811 (8)

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης n, που αποτελεί τον εκθέτη της εξίσωσης "Korsmeyer-Peppas" υποδεικνύει το μηχανισμό απελευθέρωσης. Επομένως, καθίσταται απαραίτητη η αναπαράσταση κινητικής μοντελοποίησης σύμφωνα με το μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".



Διάγραμμα 36. Διάγραμμα αναπαράστασης λογαρίθμου αθροιστικής απελευθέρωσης του συστήματος Νιοσωμάτων συναρτήσει του λογαρίθμου του χρόνου (h). Η αναπαράσταση αναγνωρίζεται και ως μοντέλο "Korsmeyer-Peppas".

Η εξίσωση ευθείας της κινητικής μοντελοποίησης "Korsmeyer-Peppas" είναι η εξής:

Y=0.7868x+0.3494 (9)

Επομένως, η τιμή του εκθέτη διάχυσης, 0.7868, (>0.5 και <1) υποδεικνύει την ανώμαλη – μη Fickian διάχυση της κουμαρινικής ένωσης ως μηχανισμό απελευθέρωσης.

- 4.8 Αξιολόγηση συστημάτων λιπιδικών νανοσωματιδίων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)
- 4.8.1 Αξιολόγηση βιοδραστικότητας λιπιδικών νανοσωματιδίων με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)-Δοκιμασία DPPH

Ακολούθως, παρατίθεται μελέτη βιοδραστικότητας (ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH) για τα τρία διαφορετικά είδη λιπιδικών νανοσωματιδίων (SLNs, NLCs, Niosomes), τα οποία δρουν ως φορείς της κουμαρινικής ένωσης (a).

Στόχος αυτής της δοκιμασίας είναι η σύγκριση των λιπιδικών συστημάτων με εγκλεισμένη ένωση (a) ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (IC₅₀), καθώς και η σύγκριση τους με την αντίστοιχη δράση της κουμαρινικής ένωσης (a) σε επιδιαλυτωμένη μορφή. Το γεγονός αυτό πρόκειται να αποσαφηνίσει την αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει η ένωση (a) ενσωματωμένη σε διαφορετικούς λιπιδικούς φορείς και μεταξύ άλλων, το ενδεχόμενο βελτίωσης αντιοξειδωτικής δράσης αυτής σε περιβάλλον υδατικής διασποράς, φαινόμενο που καθίσταται δυσχερές λόγω της λιπόφιλης ιδιότητάς της.

4.8.1.1 Υδατική διασπορά SLNs με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Στο παρόν τμήμα της εργασίας παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH υδατικής διασποράς SLNs, στα οποία έχει ενσωματωθεί η κουμαρινική ένωση (a).

Ακολούθως, παρατίθενται ραβδογράμματα των δεδομένων απορρόφησης και ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης του κάθε μελετηθέντος δείγματος και για τις δύο χρονικές στιγμές (30 λεπτών, 1 ώρας). Τέλος, υπολογίζεται το IC₅₀ του συστήματος (SLNs-(a)).



Διάγραμμα 37. Ραβδογράμματα ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης της υδατικής διασποράς SLNs με εγκλεισμένη ένωση 7, 8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη για χρονικές στιγμές 30 min και 1h

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η υδατική διασπορά SLNs με ενσωματωμένη ένωση (a) παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Αντιθέτως, η υδατική διασπορά SLNs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), παρουσιάζει μηδενική αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με αυτό συμπεραίνεται ότι η η αντιοξειδωτική δράση της υδατικής διασποράς SLNs με ενσωματωμένη ένωση οφείλεται στην κουμαρίνη (α).

Στην περίπτωση της υδατικής διασποράς SLNs με ενσωματωμένη ένωση (a) παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ειδικότερα σε υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων. Μάλιστα, παρατηρείται εξάρτηση του ποσοστού δέσμευσης της ρίζας DPPH από τη συγκέντρωση αυτών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται βαθμιαία μείωση του ποσοστού δέσμευσης σε ολοένα μειούμενες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων.

Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη δέσμευση της ρίζας στη χρονική στιγμή της 1 ώρας, φαινόμενο που υποδεικνύει ότι η ένωση απελευθερώνεται σταδιακά και η αντιοξειδωτική δράση του νανοσυστήματος είναι παρατεταμένη.

Τέλος, συγκριτικά με τα αντίστοιχα δεδομένα που πάρθηκαν για την ένωση (a) σε διαλύτη DMSO (IC₅₀=12.7 μM), παρουσιάζεται υψηλότερο IC₅₀ στην περίπτωση της εγκλεισμένης μορφής της σε νανοσωματίδια που βρίσκονται σε υδατική διασπορά (IC₅₀=15.7 μM).

4.8.1.2 Υδατική διασπορά NLCs με εγκλεισμένη ένωση (a)

Παράλληλα με τη μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης των SLNs με ενσωματωμένη ένωση (a), πραγματοποιήθηκε όμοια μελέτη για την υδατική διασπορά των NLCs με ομοίως ενσωματωμένη ένωση (a). Ακολούθως, παρουσιάζονται σχετικά ραβδογράμματα των δεδομένων απορρόφησης και ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης του κάθε μελετηθέντος δείγματος και για τις δύο χρονικές στιγμές (30 λεπτών, 1 ώρας). Τέλος, υπολογίζεται το IC₅₀ του συστήματος (NLC-(a)).



Διάγραμμα 38. Ραβδογράμματα ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης της υδατικής διασποράς NLCs με εγκλεισμένη ένωση 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και για χρονικές στιγμές 30 min και 1h

Όπως διαφαίνεται από τα παραπάνω, η υδατική διασπορά NLCs με εγκλεισμένη ένωση (a) παρουσιάζει σημαντική αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH, ενώ και σε αυτή την περίπτωση, τα NLCs χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a), παρουσιάζουν αμελητέα αντιοξειδωτική δράση.

Από τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι μετά από χρονικό διάστημα 1 ώρας παρουσιάζεται αυξημένη αντιοξειδωτική δράση, φαινόμενο που παρουσιάζεται και στην αντίστοιχη μελέτη των SLNs. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ότι η ένωση

απελευθερώνεται σταδιακά και η αντιοξειδωτική δράση του νανοσυστήματος είναι παρατεταμένη.

Το υπολογιζόμενο IC₅₀ των NLCs είναι χαμηλότερο από το αντίστοιχο των SLNs, αποδεικνύοντας ότι τα NLCs παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, οι τιμές IC₅₀ του παρόντος συστήματος NLCs (IC₅₀=13.2 μ M) προσεγγίζουν τις τιμές της της ένωσης (a) σε διαλύτη DMSO (IC₅₀=12.7 μ M). Το πλεονέκτημα που αναδύεται είναι ότι σε υδατικό περιβάλλον, επιτυγχάνεται προσεγγιστικά ίδιου ποσού αντιοξειδωτική δράση χωρίς την απαραίτητη προσθήκη οργανικού διαλύτη.

4.8.1.3 Διασπορά Νιοσωμάτων σε διαλύτη DMSO με ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a)

Το τρίτο λιπιδικό σύστημα μεταφοράς κουμαρινικής ένωσης (a) που συντέθηκε ήταν το σύστημα των Νιοσωμάτων. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται η μελέτη βιοδραστικότητας αυτών σε διασπορά σε διαλύτη DMSO, καθώς οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της υδατικής διασποράς του συστήματος παρουσίαζαν χαμηλή επαναληψιμότητα πιθανώς λόγω υψηλής ανομοιογένειας της διασποράς. Ακολούθως, παρουσιάζονται σχετικά ραβδογράμματα των δεδομένων απορρόφησης και ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης του κάθε μελετηθέντος δείγματος και για τις δύο χρονικές στιγμές (30 λεπτών, 1 ώρας). Τέλος, υπολογίζεται το IC₅₀ του συστήματος (Niosomes-(a)).



Διάγραμμα 39. Ραβδογράμματα ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του υδατικής διασποράς Νιοσωμάτων με εγκλεισμένη ένωση διαλύματος 7, 8 διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και για χρονικές στιγμές 30 min και 1h

Όπως διαφαίνεται από τα παραπάνω, η διασπορά Νιοσωμάτων με ενσωματωμένη ένωση (a) παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Κατ'αντιστοιχία, η αντιοξειδωτική δράση των νιοσωμάτων χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωσης (a) είναι αμελητέα.

Όπως είναι εμφανές μάλιστα, μετά από χρονικό διάστημα 1 ώρας παρουσιάζεται υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, φαινόμενο που παρουσιάζεται και στην αντίστοιχη μελέτη των προηγούμενων λιπιδικών συστημάτων. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ότι η ένωση απελευθερώνεται σταδιακά και η αντιοξειδωτική δράση του νανοσυστήματος είναι παρατεταμένη.

Το υπολογιζόμενο IC₅₀ των Νιοσωμάτων (IC₅₀=19.7 μM) παρουσιάζει υψηλότερη τιμή από τα προηγούμενα λιπιδικά συστήματα και απότην μη εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a) (IC₅₀=12.7 μM), καθιστώντας το παρόν σύστημα λιγότερο δραστικό ως προς τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Ακολούθως, παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας αξιολόγισης τιμής IC₅₀ για την κουμαρινική ένωση (a), τόσο σε επιδιαλυτωμένη, όσο και σε εγκλεισμένη μορφή στα συστήματα λιπιδικών φορέων που συντέθηκαν (SLNs, NLCs, Niosomes)

Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH									
IC₅₀ (μM)									
Χρονική Μέτρηση	Ένωση (a)	Κενά- SLNs	SLNs-(a)	Κενά- NLCs	NLCs- (a)	Κενά- Niosomes	Niosomes-(a)		
30 min	20.1 ± 0.3	NO	26.8± 1.4	NO	23.8 ± 2.5	NO	30.2± 0.5		
1 h	12.7 ± 0.7	NO	15.7 ± 1.0	NO	13.2 ± 0.8	NO	19.7± 0.8		

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας προσδιορισμού τιμής IC₅₀ για την κουμαρινική ένωση (a) σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή στους λιπιδικούς φορείς που συντέθηκαν (SLNs-(a), NLCs-(a), Niosomes-(a)).

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, τα λιπιδικά νανοσωματίδια χωρίς ενσωματωμένη κουμαρινική ένωση (a) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Αντιθέτως, τα λιπιδικά νανοσωματίδια με ενσωματωμένη ένωση (a) παρουσιάζουν μεγαλύτερη τιμή IC₅₀ συγκριτικά με την ένωση (a) σε επιδιαλυτωμένη μορφή. Το σύστημα που προσεγγίζει την τιμή IC₅₀ της επιδιαλυτωμένης ένωσης (12.7 μM) είναι εκείνο των NLCs (13.2 μM), καθώς τα υπόλοιπα συστήματα παρουσιαζουν μεγαλύτερες τιμές. Ως εκ τούτου, το σύστημα των NLCs αποτελεί βέλτιστο φορέα της ένωσης (a), παρουσιάζοντας επιθυμητή αντιοξειδωτική δράση σε περιβάλλον υδατικής διασποράς.

Το φαινόμενο αυτό προσδίδει νέα ιδιότητα στην ένωση (a), η οποία χαρακτηρίζεται κατά βάση ως λιπόφιλη. Η ιδιότητα αυτή έγκειται στο ότι η ένωση (a) παρουσιάζει παρόμοια αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την επιδιαλυτωμένη της μορφή σε

οργανικό διαλύτη (DMSO) και σε υδατικό περιβάλλον, χάρη στην ύπαρξη λιπιδικού σχηματισμού ττου συτήματος φορέα NLCs.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μία ολοκληρωμένη μελέτη σύνθεσης κουμαρινικών ενώσεων και μετέπειτα εγκλεισμού αυτών σε λιπιδικά νανοσυστήματα. Αναλυτικότερα, συντέθηκαν τρία διαφορετικά κουμαρινικά ανάλογα (a, b, c) με όμοια συνθετική πορεία, σύμφωνα με τον μηχανισμό συμπύκνωσης Pechmann. Από τις τρεις διαφορετικές ενώσεις μόνο η κουμαρινική ένωση (a) επέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση (IC₅₀=12.7 μM). Η ένωση (a) εντέλει επιλέχθηκε για την ακόλουθη ενσωμάτωσή της σε λιπιδικά νανοσωματίδα, όπως τα SLNs, NLCs και τα Νιοσώματα.



Μοριακοί τύποι κουμαρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Απεικονίζονται a) 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνη, b) 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη και c) 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη.

Στην περίπτωση του συστήματος SLNs, χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση η αναλογία 200(TM):50 (PC):100(Tween 80):20(κουμαρινικής ένωσης (a)), η οποία παρουσίασε σταθερή διασπορά και βέλτιστη διαχωριστική ικανότητα. Στη περίπτωση του συστήματος NLCs βέλτιστη αναλογία βρέθηκε η συνθετική 85(TM):15(αμυγδαλέλαιο):50(PC):100(Tween 80):20(a), η οποία και επέδειξε σταθερότερη δομή και επιλέχθηκε για περαιτέρω στάδια αξιολόγησης και χαρακτηρισμού. Για το σύστημα των Νιοσωμάτων κρίθηκε βέλτιστη η αναλογία 100(Χοληστερόλη):200(Span 60):20(a) σε ποσότητα υδατικής φάσης των 10 mL.

Εν συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη μεγέθους, δείκτη PDI και ζ-δυναμικού, η οποία επέδειξε για το κάθε λιπιδικό σύστημα διαφορετικές διακυμάνσεις. Το σύστημα SLNs επέδειξε μέγεθος 265.2 nm, PDI = 0.368 και ζ-δυναμικό ίσο με -26.1 mV. Το σύστημα NLCs αντίστοιχα μέγεθος 260 nm, PDI = 0,436 και ζδυναμικό ίσο με -29.5 mV. Τέλος, το σύστημα των Νιοσωμάτων επέδειξε μέγεθος 238.2 nm, δείκτη PDI = 0.333 και ζ-δυναμικό ίσο με -28.7 mV.

Ακολούθως, η μελέτη θερμικών ιδιοτήτων των λιπιδικών νανοσυστημάτων επέδειξε βέλτιστους φορείς τα SLNs και NLCs, με θερμοκρασία θερμικής αποδιάταξης 366°C και 375°C αντιστοίχως, έναντι των Νιοσωμάτων που επέδειξαν χαμηλή θερμοκρασία θερμικής αποδιάταξης, ίση με 316° C. Με αυτό τον τρόπο αποδείχθηκε θερμική προστασία της κουμαρινικής ένωσης (a) (θερμοκρασία θερμικής αποδιάταξης 320° C), στην εγκλεισμένη μορφή της.

Η μορφολογική μελέτη με τη βοήθεια του SEM πραγματοποιήθηκε μόνο για την περίπτωση των SLNs, λόγω ότι οι υπόλοιπες δομές (NLCs, Νιοσώματα) τήχθηκαν από την υψηλή προκύπτουσα θερμοκρασία της ανάλυσης. Η απεικόνιση των SLNs επέδειξε μία συμπαγής δομή με τη μορφή δικτύου και υπάρχουσες προεξοχές, καθιστώντας αδύνατη την απεικόνιση αυτοτελών νανοσωματιδίων.

Πέρα από τη μορφολογική μελέτη των λιπιδικών νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση (a), υπολογίστηκε η απόδοση εγκλεισμού για το κάθε σύστημα. Για το σύστημα SLNs υπολογίστηκε στα 79%, στο σύστημα NLCs 85% και στα Νιοσώματα 30%. Εμφανώς, βέλτιστη απόδοση εγκλεισμού επέδειξε το σύστημα των NLCs. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε μελέτη βιοδραστικότητας των λιπιδικών συστημάτων με σκοπό τον υπολογισμό της τιμής IC₅₀. Στο σύστημα των SLNs υπολογίστηκε IC₅₀ 15.7 μM, στο σύστημα NLCs 13.2 μM, ενώ στο σύστημα των Νιοσωμάτων υπολογίστηκε στα 19.7 μM. Σύμφωνα με το γεγονός αυτό αποδείχτηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση των νανοσωματιδίων NLCs με εγκλεισμένη την κουμαρίνη (α) είναι βέλτιστη μεταξύ των τριών τύπων νανοσυστημάτων.

Επίσης, μελετήθηκε το προφίλ απελευθέρωσης της κουμαρινικής ένωσης από το κάθε λιπιδικό σύστημα. Στο σύνολό τους τα λιπιδικά νανοσωματίδια παρουσίασαν ομαλό προφίλ απελευθέρωσης, με μέγιστο ποσοστό αθροιστικής απελευθέρωσης να φτάνει στην τιμή 85.9% στην περίπτωση του συστήματος SLNs. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη κινητικής μοντελοποίησης που επέδειξε ότι η απελευθέρωση της κουμαρινικής ένωσης (a) και από τα τρια λιπιδικά νανοσωματίδια αποτελεί η ανώμαλη-μη Fickian διάχυση.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μελλοντικοί πειραματικοί στόχοι που θα μπορούσαν να αποτελέσουν συνέχεια της παρούσας εργασίας είναι οι εξής:

- Επισταμένη μελέτη και διερεύνηση βέλτιστων αναλογιών και πειραματικής διαδικασίας σύνθεσης λιπιδικών νανοσυστημάτων
- Διερεύνηση περαιτέρω συνθετικών διαδικασιών λιπιδικών νανοσωματιδίων,
 όπως ενυδάτωση λεπτού φιλμ
- Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των λιπιδικών νανοσωματιδίων με περισσότερες in vitro μεθόδους, π.χ. αναστολή του ενζύμου τυροσινάσης, η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη μελανών κηλίδων στο δέρμα
- Μελέτη απελευθέρωσης κουμαρινικής ένωσης από λιπιδικά νανοσωματίδια και σε συνθήκες διαφορετικού pH(π.χ pH=5.5, συνθήκες δέρματος)
- 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.
- Η αξιολόγηση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων σε βάθος χρόνου προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία αλλοίωσής τους κατά την μεταφορά και την αποθήκευση
- Εισαγωγή σε φαρμακοτεχνική μορφή

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

[1] Feuer G., "The Metabolism and Biological Actions of Coumarins", *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 85-158, (1974).

[2] Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., Yordi E. G., "Coumarins, An Important Class of Phytochemicals", *IntexOpen*, (2015).

[3] Mathias J. E. E. Voges, Yang Bai, Paul Schulze-Lefert, and Elizabeth S. Sattely, "Plant-derived coumarins shape the composition of an Arabidopsis synthetic root microbiome", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, pp. 12558-12565, (2019).

[4] Xu L., Wu Y.L., Zhao X.Y., Zhang W., "The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins", *Springer Nature- In Proceedings of the 2015 Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference*, pp. 135-138, (2015).

[5] Kostova I., Bhatia S., Grigorov P., Balkansky S., Parmar V.S., Prasad A.K. and Saso L., "Coumarins as Antioxidants", *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, pp. 3929-3951, (2011).

[6] Payá M., Halliwell B., Hoult J.R.S., "Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals", *Biochem Pharmacol*, vol. 44, pp. 205-214, (1992).

[7] Lin W.L., Wang C.J., Tsai Y.Y., Liu C.L., Hwang J.M., Tseng T.H., "Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver", *Arch Toxicol*, vol. 74, pp. 467-472, (2000).

[8] Kumar A., Singh B.K., Tyagi R., "Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylcoumarins. Comparison of the specificities of acetoxy derivatives of 4-methylcoumarin and 4-phenylcoumarin to acetoxy coumarins: protein transacetalase" *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 13, pp. 4300-4306, (2005).

[9] Rohini K., Srikumar P., "Therapeutic role of coumarins and coumarin-related compounds", *Journal of Thermodynamics & Catalysis*, vol. 5, (2014).

[10] Hadjipavlou D.J., Litinasb K.E., Kontogiorgis C., "The Anti-inflammatory Effect of Coumarin and its Derivatives", vol. 6, pp. 293-306, (2007).

[11] Fylaktakidou K., Hadjipavlou-Litina D., Litinas K., Nicolaides D., "Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory / Antioxidant activities", *Current Pharmaceutical Design*, vol.10, pp. 3813-3833, (2004).

[12] Mohd Shahnawaz K., Ranu A., Mohd U., Imtaiyaz H., Nazia T., "Design, synthesis and validation of anti-microbial coumarin derivatives: An efficient green approach", *Heliyon*, vol. 5, Issue 10, (2019).

[13] Montagner C., M de Souza S., Groposoa C., Delle Monache F., Smânia F., Smânia Jr A., "Antifungal activity of coumarins", *Z. Naturforch C. J. Biosci.*, vol. 63, pp. 65-76 (2008).

[14] Thornes R.D., Daly L., Lynch G., Breslin B., "Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma", J. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 12, pp. 32-38, (1994)

[15] Wang B.H., Ternai B., Polya G., "Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid", *Phytochemistry*, vol.44, pp. 787-796, (1997)

[16] Podbielkowska M., Piwocka M., Waszkowska E., Waleza M., Zobela M., "Effect of coumarin and its derivatives on mitosis and ultrastructure of meristematic cells", *Int. J. Pharmacog*, vol. 33, pp.156-164, (1995).

[17] Mehnert W., Mäder K., "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 83-101, (2012)

[18] Mehnert W., Mäder K., "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 83-101, (2012)

[19] Bharat B. and Scott R. Schricker, "A review of block copolymer-based biomaterials that control protein and cell interactions", *Journal of Biomaterial Sciences*, vol.102, pp. 2467-2480, (2014)

[20] Bozzuto G. and Molinari A., "Liposomes as nanomedical devices", Int J Nanomedicine, vol. 10, pp. 975–999 (2015).

[21] 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*, vol. 86, pp.7-22, (2014).

[22] Deepthi S., Zenab A., Sreenivasa M. Reddy, Atmakuri D., Balasundara K., Gupta K., "Solid lipid nanoparticles of irbesartan: preparation, characterization, optimization and pharmacokinetic studies", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 53, pp. 53-43, (2017)

[23] Deshpande A., Mohamed M., Daftardar B.S., Patel M., H.S. Boddu S., Nesamony J., "Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges", Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices, pp. 291-330, (2017)

[24] 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*, vol. 86, pp.7-22, (2014).

[25] Gordillo-Galeano A, and Mora-Huertas C. E., "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release", *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 133, pp, 285-308, (2018)

[26] Chahinez H., David A., Kamalinder.K. Singh, "Impact of liquid lipid on development and stability of trimyristin nanostructured lipid carriers for oral delivery of resveratrol", *Journal of Molecular Liquids*, (2020).

[27] Vedanti R. Salvi and Pawar P., "Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier", *Journal of Drug Delivery Sciences and Technology*, vol. 51, pp. 255-267, (2019)

[28] Moghassemi S., Hadjizadeh A., "Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review", *Journal of Controlled Release*, vol. 185, pp. 22-36, (2014).

[29] Hamid Saeed S., Fazala K., Sajid B., Javed I., "Emulsion-templated synthesis and in vitro characterizations of niosomes for improved therapeutic potential of hydrophobic anti-cancer drug: tamoxifen", *J Nanopart. Rev.*, pp. 21-31, (2019)

[30] Kaur D., Kumar S., "Niosomes: present scenario and future aspects", *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 5, pp. 35-43, (2018).

[31] Swati D., Rikta K., Abhijit B., "Synthesis of gold nanoparticles in niosomes", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 386, pp. 9-15, (2012).

[32] Gylvanda S. Nunes, Danilo B. Ribeiro, Francisco E. P. S. Silva, Gaëlle Catanante, Jean-Louis Marty, "Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays", J. Braz. Chem. Soc., vol.30, no.5, (2019)

[33] Radhakant G., Himankar B., Zhao Q., "Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets", Journal of Developing Drugs, vol. 6, Issue 2, pp. 12-20, (2017)

[34] McMurry J., "Οργανική Χημεία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (2012).

[35] Ozkan D., Basak Yuce D., Cihan G., Ayse O., Goksel S., Bulut M., Yarat A., "Synthesis of 3-amino-4-hydroxy coumarin and dihydroxy-phenyl coumarins as novel anticoagulants", *Arzneimittelforschung*, vol. 10, pp. 617-620, (2010).

[36] Roussaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D., Hamilakis S., Detsl A., "A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity", Bioinorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 20, pp. 3889-3892, (2010).

[37] Roussaki M., Zelianaios K., Kavetsou E., Hamilakis S., Hadjipavlou-Litina D., Kontogiorgis C., Liargkova T., Detsl A., "Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity", *Bioinorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (2014) [38] Kavetsou E., Katopodi A., Letta A., Chainoglou C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Chroni A., Detsi A., "Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile", *Drug Dev. Res.*, pp. 1-14, (2020).

[39] Youssef Wahib N., Leticia R., Xinran Li, Stephen D. Hursting, Robert O. Williams, Zhengrong Cui, "Solid Lipid Nanoparticle Formulations of Docetaxel Prepared with High Melting Point Triglycerides: In Vitro and in Vivo Evaluation", Molecular Pharmaceutics, vol.11, pp. 1239-1249, (2014).

[40] Robert J. Soto, Yang L., Schoenfisch M., "Functionalized Mesoporous Silica via an Aminosilane Surfactant Ion Exchange Reaction: Controlled Scaffold Design and Nitric Oxide Release", ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 8, pp. 2220-2231, (2016)

[41] Scoog, Holler, Crouch, "Αρχές ενόργανης ανάλυσης", Εκδόσεις Κωσταράκη, (2007)

[42] Kathe N., Henriksen B. Chauhan H., "Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: Principles and limitations", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 40, pp. 1565-1575, (2014)

[43] 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*, vol. 140, pp. 317-323, (2016)

[44] Lacatusu I., Badea N., Murariu A., Oprea O., Bojin D., Meghea A., "Antioxidant activity of solid lipid nanoparticles loaded with Umbelliferone", *Soft Materials*, vol. 11, pp. 75-84, (2013).

[45] Bahramnezhad B., Ghazanfari D., Enayatollah S., M. Reza Akhgar, Sayed Ali A., "MnSb2O6-chitosan nanocomposite: An efficient catalyst for the synthesis of coumarins via Pechmann reaction", *Journal of Heterocyclic Chemistry*, vol. 57, pp. 173-181, (2020)

[46] Moradi L., "Meglumine sulfate catalyzed solvent-free one-pot synthesis of coumarins under microwave and thermal conditions", *Synthetic Communications*, vol. 46, pp. 123-135, (2016).

[47] Santosh Kumar P. and S. Prakash Rao, "B(C6F5)3-catalyzed synthesis of coumarins via Pechmann condensation under solvent-free conditions", *Metrics*, vol. 152, pp. 469-473, (2021).

[48] Jitinder S W., Defang O., Kirchmeier M., Anderson D., Perrie Y., "Investigating the role of cholesterol in the formation of non-ionic surfactant based bilayer vesicles: thermal analysis and molecular dynamics", *Int J Pharm*, vol. 461, pp. 331-338, (2014)

[49] Huaixiang T., Zhuoyan L., Danfeng L., Jing H., "Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles", *Food Chem*, vol. 48, pp. 78-85, (2018)

[50] Battaclini M., Tapeinos C., Attilo M., "Design, Fabrication, and In Vitro Evaluation of Nanoceria-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for the Treatment of

Neurological Diseases", ACS Biomaterials Science and Engineering, vol. 55, pp. 670-682, (2019).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Μελέτη μορφολογίας μεγέθους και δείκτη PDI Νιοσωμάτων

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αναλογίες, α)100(Χοληστερόλη):100(Span 60) σε υδατική φάση ποσότητας των 45 mL, η αναλογία β)100(Χοληστερόλη):200(Span 60) σε υδατική φάση 45 mL, και γ) 100(Χοληστερόλη):200(Span 60):20(a)/45 mL H2O.

Π1. 100(Χοληστερόλη):100(Span 60)/45 mL H2O



Size (d.nm)

10

100

1000

10000

Π2. 100(Χοληστερόλη):200(Span 60) / 45 mL H20

0.1



Π3. 100(Χοληστερόλη):200(Span 60):20(a)/45 mL H2O

